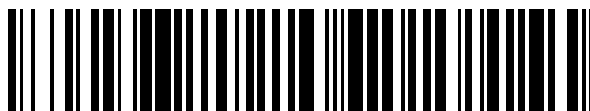


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 629**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2010** **PCT/US2010/037390**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010** **WO10141811**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2010** **E 10784143 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016** **EP 2437768**

54 Título: **Compuestos y métodos para tratar trastornos de los huesos y controlar el peso**

30 Prioridad:

04.06.2009 US 184209 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2017

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (50.0%)
308 Bynum Hall, Campus Box 4105
Chapel Hill, NC 27599-4105, US y
MAINE MEDICAL CENTER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CLEMMONS, DAVID, R. y
ROSEN, CLIFFORD, J.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 602 629 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

Compuestos y métodos para tratar trastornos de los huesos y controlar el peso

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un péptido, a formulaciones farmacéuticas que lo contienen, y a la utilización de los mismos en el control de peso, el tratamiento de trastornos de los huesos y la mejora de la reconstitución de la médula ósea.

Antecedentes de la invención

La proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulínico 2 (IGFBP-2) es una proteína de 36.000 dalton que es miembro de la familia de IGFBP. Existen seis formas de proteínas de unión a IGF de alta afinidad. Además de unirse a los factores de crecimiento de tipo insulínico I y II y de actuar como proteínas de transporte, se ha demostrado que estas proteínas tienen algunas acciones que son independientes de su capacidad para unirse a los IGF.

La IGFBP-2 es la segunda proteína de unión más abundante en suero. Circula en los seres humanos a concentraciones que varían entre 100 y 600 ng/ml. Las concentraciones de proteína son elevadas durante la vida fetal y en el nacimiento y caen progresivamente durante la infancia y la adolescencia. Hay un ligero aumento, un incremento de aproximadamente 25%, que se produce entre los 60 y 80 años. Las concentraciones en suero de IGFBP-2 están reguladas por las hormonas y los nutrientes. El ayuno provoca un aumento significativo de IGFBP-2 y la alimentación (en particular la alimentación de proteína) restaura las concentraciones a la normalidad. Las concentraciones también se suprimen mediante la administración de insulina u hormona de crecimiento, y se incrementan mediante factor de crecimiento de tipo insulínico 1. Esto es probablemente debido en parte a la supresión de la hormona del crecimiento y la insulina, ambos las cuales son suprimidas por la administración de IGF-1.

El documento WO 2009/059011 describe el uso de péptidos para el diagnóstico del cáncer y entre ellos dos péptidos de 15 aminoácidos, los fragmentos de IGFBP-2. Silke et al. (Biochemistry 2005) describen largos fragmentos de IGFBP-2 por su capacidad para unirse a IGF. El documento WO 2005/014635 describe una firma biológica para las enfermedades cardiovasculares que consiste en un grupo de más de 300 péptidos pequeños que se encuentran en el suero de pacientes que tienen una enfermedad coronaria. Se identifican dos péptidos de 9 y 10 aminoácidos con una secuencia correspondiente a un fragmento de IGFBP-2.

La escisión proteolítica de IGFBP-2 da como resultado fragmentos pequeños que incluyen el dominio de unión a heparina (HBD). Se ha sintetizado una molécula pequeña que contiene el HBD presente en la región conectora de IGFBP-2. De los dos HBD de esta molécula, el sintetizado es único para IGFBP-2 y no está representado en otras IGFBP.

La presente invención supera las deficiencias anteriores de la técnica proporcionando péptidos de IGFBP-2 y métodos para su uso en el tratamiento de trastornos de los huesos, el control del peso y la mejora de la reconstitución de la médula ósea.

Compendio de la invención

Un primer aspecto de la invención es un compuesto que comprende, o consiste en el fragmento KHHLGLEEPKKLR de IGFBP-2 (en lo sucesivo referido a veces como "compuesto activo").

Un segundo aspecto de la invención es una composición que comprende el compuesto activo como se describe en la presente memoria, que puede estar combinado con un portador farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente incluye al menos un agente activo adicional (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) tal como un inhibidor de la resorción ósea o un agente de control del peso.

Un aspecto adicional de la invención es el compuesto para su uso en una terapia para inducir el depósito y la maduración de hueso en un sujeto que tiene una afección ósea comprometida, en una cantidad eficaz para inducir el depósito y la maduración de hueso en el sujeto. Adicionalmente comprende la administración simultánea de un inhibidor de la resorción ósea al sujeto en una cantidad eficaz.

Un aspecto adicional de la invención es el compuesto para su uso en una terapia para controlar el peso corporal en un sujeto que lo necesita, en una cantidad eficaz para controlar el peso corporal. El método puede comprender adicionalmente la administración concurrente al sujeto de un agente de control del peso adicional.

Otro aspecto de la invención es el compuesto para su uso en una terapia para la mejora de la reconstitución de la médula ósea en un sujeto que lo necesite, en una cantidad eficaz para mejorar la reconstitución de médula ósea.

La presente invención se explica con mayor detalle a continuación.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. El dominio de unión a heparina de IGFBP2 mejora la osteoblastogénesis *in vitro*. a. Se llevó a cabo la tinción de Von Kossa utilizando tibia de ratón macho *Igfbp2*^{+/+} y *Igfbp2*^{-/-} de 8 semanas de edad. b. Se cosecharon osteoblastos de bóveda craneal (COB) de ratón macho *Igfbp2*^{+/+} y *Igfbp2*^{-/-} de 7 días de edad, y se trataron con medios osteogénicos en presencia de FCS al 2,5%. El día 7, se llevó a cabo una tinción con fosfatasa alcalina (ALP). c y d. Los COB y células estromales de médula ósea (BMSC) de ratón *Igfbp2*^{-/-} fueron tratados con medios osteogénicos con péptido de dominio de unión a heparina pegilado (PEG-HBD) en presencia de FCS a 10%. Se realizaron la tinción con ALP (día 7) y la tinción con Rojo Alizarina (día 14) (c). Se aisló el ARN el día 14 de las BMSC y se analizó la expresión de *ALP*, *osteocalcina* (OC) y *Runx2* por medio de PCR en tiempo real. Las figuras representan al menos 3 experimentos independientes (n = 3). La diferencia estadística se analizó mediante el test de la t de Student; p < 0,05.

Figura 2. El dominio de unión a heparina de IGFBP2 mejora la expansión del periostio de los metacarpianos *ex vivo*. Se recogieron los metacarpianos de un ratón macho de 1 día, y se trataron con medios osteogénicos con IGFBP2 (200 ng/ml) o el péptido del dominio de unión a heparina (HBD-péptido) (2 µg/ml) en presencia o ausencia de IGF-1 (20 ng/ml) durante 10 días. Los huesos fueron marcados con calceína (500 ng/ml) y el área que incorporaba la calceína se visualizó (a) y se cuantificó la dimensión longitudinal del área que había incorporado la calceína (b). Se realizó una doble tinción con azul Alcian y de Von Kossa (c) y se cuantificaron la longitud y la anchura de los metacarpianos (d). La diferencia estadística se analizó mediante ANOVA seguido de un test *post-hoc* de Bonferroni. Las figuras mostradas representan al menos 3 experimentos independientes. Los valores se expresan como la media ± ETM (n = 3-4). ^a; <0,05 vs PBS, ^b; <0,01 vs PBS, ^c; <0,001 vs PBS, ^d; <0,01 vs HBD, ^e; <0,05 vs IGF-1, ^f; <0,05 vs HBD.

Figura 3. El dominio de unión a heparina de IGFBP5 no muestra ningún efecto sobre la osteoblastogénesis *in vitro* o la expansión del periostio de metacarpianos *ex vivo*. a. Se recogieron osteoblastos primarios de bóveda craneal de ratón macho *Igfbp2*^{-/-} y se trataron con medios osteogénicos con o sin el dominio de unión a heparina de IGFBP-5 (HBD-BP5) (2 µg/ml). La osteoblastogénesis se evaluó por medio de tinción con Rojo Alizarina. b y c. Se recogieron los metacarpianos de un ratón macho de 1 día, y se trataron con medios osteogénicos con o sin HBD-BP5 (2 µg/ml) durante 10 días. Los huesos fueron marcados con calceína (500 ng/ml) y el área que había incorporado la calceína se visualizó (a). Se cuantificó la dimensión longitudinal del área que había incorporado la calceína (b). Se realizó una doble tinción con azul Alcian y de Von Kossa (c) y se cuantificaron la longitud y la anchura de los metacarpianos (d). Las Figuras mostradas representan al menos 3 experimentos independientes. Los valores se expresan como la media ± ETM. La diferencia estadística se analizó por medio del test de la t de Student (n = 3-4).

Figura 4. El dominio de unión a heparina de IGFBP2 rescata parcialmente el fenotipo de osteopenia de ratones *Igfbp2*^{-/-}. Se trataron ratones *Igfbp2*^{-/-} con PBS o dominio de unión a heparina pegilado (PEG-HBD) de 6 a 9 semanas de edad. a. Imagen de MicroCT del fémur distal. b. Se muestran los parámetros de un estudio de flexión de tres puntos. c. Se determinaron el número de osteoblastos/perímetro del hueso (NobBPm), la superficie de osteoblastos/superficie del hueso (ObSBS), el número de osteoclastos/parámetro óseo (NocBPm) y la superficie de erosión/superficie del hueso (ES/BS) por histomorfometría (n = 5). d. Se contó el número de adipocitos (N.Ad) inmediatamente próximos a la placa de crecimiento distal del fémur y se normalizó para el área total (T.Ar) (n = 6). e. Se trataron osteoblastos de bóveda craneal *Igfbp2*^{-/-} con PBS o PEG-HBD durante 24 horas en medio libre de suero. Se analizó la expresión de *Pparg* por medio de PCR en tiempo real (n = 3). f. Se analizaron los niveles en suero de Trap5b por medio de ELISA (Immunodiagnosics Inc.) (n = 6-9). g y h. Se trataron COB *Igfbp2*^{-/-} con o sin PEG-HBD durante 2 horas (h). Se cultivaron BMSC *Igfbp2*^{-/-} con medio osteogénico con PBS o PEG-HBD durante 2 semanas (i). Se analizó la expresión de *Opg* y *Rankl* por medio de PCR en tiempo real (n = 3). Las figuras mostradas representan al menos 3 experimentos independientes. Los valores se expresan como la media ± ETM. La diferencia estadística se analizó por el test de la t de Student*; <0,001, **; <0,01, †; <0,05, ††; <0,06.

Figura 5. El dominio de unión a heparina de IGFBP2 suprime la expresión de PTEN. a y b. Se aislaron osteoblastos de bóveda craneal *Igfbp2*^{-/-} (COB), y se trataron con PBS, IGFBP-2 o péptido de dominio de unión a heparina pegilado (PEG-HBD) en MEMα que contenía BSA al 0,1% durante la noche. Se recogió el producto lisado de células enteras y se analizó la expresión de PTEN y α-actina por medio de análisis de transferencia Western. Los niveles de expresión de PTEN se cuantificaron mediante la normalización a los niveles de expresión de α-actina. c y d. Los COB preincubados con PBS, IGFBP-2 o PEG-HBD durante la noche se trataron con IGF-1 (100 ng/ml) durante 15 minutos. Se recogió el producto lisado de células enteras y se analizó la expresión de pSer473-Akt y Akt por medio de análisis de transferencia Western. Los niveles de expresión de pSer473-Akt se cuantificaron mediante la normalización a los niveles de expresión de Akt. Las figuras mostradas representan al menos 3 experimentos independientes. Los valores se expresan como la media ± ETM (n = 3-4). La diferencia estadística se analizó mediante el test de la t de Student. *; <0,001, **; <0,01, †; <0,05.

Figura 6. El dominio de unión a heparina de IGFBP-2 estimula la acumulación citosólica y la fosforilación de Ser552 de β-catenina por IGF-1. a. Se privaron de suero células MC3T3-E1 durante la noche y se trataron con IGF-1

a la concentración indicada durante 6 horas. Se analizó la expresión de β -catenina y α -actina mediante análisis de transferencia Western con la fracción de membrana y la citosólica. **b.** Se privaron de suero osteoblastos de bóveda craneal *Igfbp2*^{-/-} (COB) durante la noche con PBS o péptido de dominio de unión a heparina pegilado (PEG-HBD) y después se trataron con IGF-1 (100 ng/ml) durante 6 horas. Se analizó la expresión de la β -catenina por medio de análisis de transferencia Western con la fracción citosólica y se cuantificó mediante la normalización a α -actina (n = 3). **c.** Se privaron de suero las células MC3T3-E1 durante la noche y se trataron con IGF-1 (100 ng/ml) durante 15 min. Se analizó la expresión de pSer552- β -catenina, β -catenina, pSer473-Akt, Akt y α -actina mediante análisis de transferencia de Western con productos lisados de células enteras. **d.** Se privaron de suero COB *Igfbp2*^{-/-} durante la noche con PBS o PEG-HBD y luego se trataron con IGF-1 (100 ng/ml) durante 15 min. Se analizó la expresión de pSer552- β -catenina por medio de análisis de transferencia de Western con productos lisados de células enteras y se cuantificó mediante la normalización a β -catenina (n = 3). Las figuras mostradas representan al menos 3 experimentos independientes. Los valores se expresan como la media $\pm$ ETM. La diferencia estadística se analizó mediante el test de la t de Student. *, <0,001, **, <0,01, †, <0,05.

Figura 7. El péptido de control para el péptido de dominio de unión a heparina no tiene ningún efecto anabólico sobre la osteoblastogénesis *in vitro*. Se cultivaron osteoblastos de bóveda craneal (COB) *Igfbp2*^{-/-} con medio osteogénico con PBS, péptido de control (2 μ g/ml) o péptido de dominio de unión a heparina (HBD-péptido) (2 μ g/ml). Se evaluó la osteoblastogénesis por tinción con Rojo Alizarina.

Figura 8. El péptido de control para el péptido de dominio de unión a heparina no tiene ningún efecto anabólico sobre los metacarpianos *ex vivo*. Se recogieron los metacarpianos de ratón macho de 1 día *Igfbp2*^{+/+}, y se cultivaron en DMEM (1 g/L de glucosa) que contenía β -glicerofosfato 1 mM y 50 μ g/mL de ácido ascórbico. Se añadieron PBS o péptido de control (2 μ g/ml) al medio. El día 10, los huesos se trataron con 500 ng/ml de calceína durante dos horas. Se visualizó el área que había incorporado la calceína (b) y se cuantificó la dimensión longitudinal de la zona incorporada (c). Se fijaron los metacarpianos con PFA al 4% y se sometieron a doble tinción con Azul Alcian y de von Kossa (d). Se cuantificaron la longitud y anchura de los metacarpianos (e). Los valores se expresaron como la media $\pm$ ETM (n = 3). La significación estadística se analizó mediante el test de la t de Student. ns; no significativo.

Figura 9. El péptido de control para el péptido de dominio de unión a heparina no suprime la expresión de PTEN en osteoblastos *Igfbp2*^{+/+} de la bóveda craneal. Se trataron osteoblastos *Igfbp2*^{+/+} de bóveda craneal con PBS, péptido de control, o péptido de dominio de unión a heparina (péptido HBD) durante la noche, y se recogió el producto lisado de células enteras. Se analizó la expresión de PTEN mediante análisis de transferencia Western (a), y se realizó un análisis cuantitativo (b). Los valores se expresaron como la media $\pm$ ETM (n = 3). La significación estadística se analizó por ANOVA seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. ^a; p <0,01 vs. PBS, ^b; p <0,01 vs. péptido de control.

Figura 10. El HBD de IGFBP-2 aumentó la proliferación celular de los osteoblastos y las células estromales de la médula ósea en comparación con IGFBP-2 (BP2) de longitud completa (FL) y péptido de control y como se observa por el aumento de la fosfatasa alcalina y la tinción con rojo de alizarina, respectivamente.

Figura 11. El HBD de IGFBP-2 rescató el fenotipo de baja masa ósea de ratones *Igfbp2*^{-/-} *in vivo*, como se muestra por medio del análisis de μ CT.

Figura 12. HBD revirtió el aumentó el fenotipo hematopoyético linfoide y mieloide de ratones *Igfbp2*^{-/-}.

Figura 13. En trasplantes de médula ósea por re-población competitiva, las células del donante de médula ósea *Igfbp2*^{-/-} repoblaron la médula ósea de los receptores de la misma cepa con una eficacia 30% menor que las células de donante *Igfbp2*^{+/+}.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se explica con mayor detalle a continuación.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los péptidos de IGFBP-2, (p. ej., el dominio de unión a heparina (HBD)) se pueden emplear en métodos de tratamiento de trastornos de los huesos, métodos de control del peso y métodos para mejorar la reconstitución de médula ósea.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona el compuesto para su uso en la terapia para la mejora de la formación de hueso (es decir, aumentando la cantidad de hueso nuevo que se deposita) y la inhibición de la resorción ósea (es decir, reduciendo la cantidad de hueso que se disuelve) simultáneamente en un sujeto que lo necesite, que comprende la administración al sujeto de un compuesto activo de esta invención en una cantidad eficaz para mejorar la formación de hueso e inhibir la resorción ósea simultáneamente en dicho sujeto. Los ejemplos no limitantes de los sujetos para los cuales estaría indicado dicho tratamiento y/o sería beneficioso, incluyen mujeres (p. ej., después de la menopausia; premenopáusicas) con osteoporosis o baja masa ósea, hombres con osteoporosis o baja masa ósea, sujetos con una fractura en curación, sujetos sometidos a inmovilización prolongada, sujetos que han sido o están inmovilizados durante un período prolongado, sujetos propensos a sufrir o experimentar una inmovilización prolongada, sujetos con deficiencia de estrógenos, etc., como

se conoce en la técnica.

También se proporciona en la presente memoria el compuesto para su uso en terapia para inducir el depósito y la maduración de hueso en un sujeto que lo necesite (p. ej., un sujeto que tiene una afección ósea comprometida), que comprende la administración al sujeto de un compuesto activo de esta invención en una cantidad eficaz para inducir el depósito y la maduración de hueso en el sujeto. Los métodos de esta invención pueden comprender además al mismo tiempo la administración de un inhibidor de la resorción ósea al sujeto en una cantidad eficaz.

En algunas realizaciones, una afección ósea comprometida se encuentra en un sitio diana del sujeto. El sitio puede ser un espacio intervertebral, una articulación facetaria, un sitio de una fractura ósea, huesos de la boca, la barbilla y la mandíbula, o un lugar de implantación.

También se proporciona en la presente memoria el compuesto para su uso en la terapia para la mejora de la reconstitución de la médula ósea en un sujeto que lo necesite, que comprende la administración a dicho sujeto de un compuesto activo de esta invención en una cantidad eficaz para mejorar la reconstitución de la médula ósea (es decir, la restauración (p. ej., parcialmente o totalmente) de las células de la médula ósea en un sujeto, que puede ser, por ejemplo, un sujeto que ha recibido quimioterapia, radiación u otros tratamientos que agotan las células de la médula ósea. Por ejemplo, un sujeto sometido a quimioterapia con o sin radiación se beneficiaría de un restablecimiento más rápido de las células de la médula ósea con el fin de prevenir las infecciones oportunistas. Un objeto de estos métodos también puede ser un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno hematológico (p. ej., anemia aplásica; mielodisplasia) que agota las células de la médula ósea. Tal mejora o potenciación o aumento de la reconstitución de médula ósea es en comparación con un sujeto al que no se ha administrado el compuesto activo.

La administración del compuesto o la composición de esta invención se puede realizar por cualquier vía adecuada, incluyendo la inyección intratecal, subcutánea, cutánea, oral, intravenosa, intraperitoneal, inyección intramuscular, en un implante, en una matriz, en un gel, o cualquier combinación de los mismos.

Una afección ósea que puede ser tratada con el compuesto de esta invención puede ser uno o más de huesos rotos, defectos óseos, trasplante de hueso, injertos de hueso, cáncer de hueso, prótesis articulares, reparación de las articulaciones, fusión, reparación de las facetas, degeneración ósea, implantes y reparaciones dentales, déficits de médula ósea y otras afecciones asociadas con el hueso y el tejido óseo. Los defectos óseos pueden ser un hueco, una deformación y/o una fractura sin unión en un hueso.

La degeneración ósea puede ser debida a la osteopenia u osteoporosis (p. ej., el paciente está afectado por osteoporosis geriátrica o senil, por osteoporosis postmenopáusica, etc.), o ser debida a enanismo.

Las prótesis articulares que se pueden tratar incluyen vértebra, rodilla, cadera, tarso, falange, codo, tobillo y/u otras articulaciones o prótesis de las mismas. Las reparaciones de articulaciones incluyen, pero no se limitan a, vértebra, rodilla, cadera, tarso, falange, codo, tobillo, y las reparaciones de la articulación sacroilíaca.

Un aspecto adicional de la invención es el compuesto para su uso en la terapia para el control del peso corporal en un sujeto que lo necesite, que comprende la administración al sujeto de un compuesto activo como se describe en la presente memoria en una cantidad eficaz para controlar el peso corporal. El método puede comprender adicionalmente al mismo tiempo la administración al sujeto de un agente de control del peso adicional.

En algunas realizaciones, el sujeto es obeso.

En algunas realizaciones, el compuesto para su uso en terapia se administra en una cantidad eficaz para reducir el aumento de peso o inducir la pérdida de peso (o concretamente la pérdida de grasa) en el sujeto.

En algunas realizaciones, el compuesto para su uso en terapia se administra en una cantidad eficaz para reducir el índice de masa corporal del sujeto.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene un índice de masa corporal de 25 o 30 kg/m² o superior.

En algunas realizaciones, el compuesto para su uso en terapia se administra durante un período de al menos 16 o 24 semanas, y/o hasta que el individuo ha alcanzado al menos una pérdida de peso de 5% o el índice de masa corporal del individuo se reduce a menos de 25 kg/m².

En algunas realizaciones, el compuesto activo se utiliza en la terapia para ser administrado en una cantidad eficaz para inhibir la diferenciación de las células de grasa (p. ej., la inhibición de la diferenciación de células precursoras de grasa en adipocitos maduros) en el sujeto.

En algunas realizaciones el compuesto para su uso en terapia comprende adicionalmente la administración concurrente al sujeto de una agente de control del peso adicional.

La dosificación terapéuticamente eficaz de cualquier compuesto activo específico de esta invención variará de compuesto a compuesto, y de paciente a paciente, y dependerá, entre otras cosas, del efecto o resultado que se

deba conseguir, del estado del paciente y de la ruta de suministro. En algunas realizaciones, se puede utilizar una dosis de aproximadamente 0,001 (es decir, 1 µg/kg), 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 mg/kg, hasta aproximadamente 30, 40 o 50 mg/kg (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 mg/kg), o más.

A. Definiciones.

"Sujetos" según se utiliza en la presente memoria son generalmente sujetos humanos e incluyen, pero no se limitan a, sujetos post-menopáusicos. Los sujetos pueden ser machos o hembras, y pueden ser de cualquier raza o grupo étnico, incluyendo, pero no limitados a, Europeos, Afro-Americanos, Africanos, Asiáticos, Hispanos, Indios, etc. Los sujetos pueden ser de cualquier edad, incluyendo recién nacidos, neonatos, lactantes, niños, adolescentes, adultos y geriátricos. En algunas realizaciones, los sujetos son sujetos de sexo femenino postmenopáusicos, o sujetos que sufren osteoporosis senil. Los sujetos también pueden incluir sujetos animales, en particular sujetos mamíferos, tales como caninos, felinos, bovinos, caprinos, equinos, ovinos, porcinos, roedores (p. ej. ratas y ratones), lagomorfos, primates (incluyendo primates no humanos), etc., para la medicina veterinaria o para propósitos de desarrollo de fármacos farmacéuticos.

"Tratar", "tratando" o "tratamiento" según se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier tipo de tratamiento que confiere un beneficio a un paciente aquejado de una enfermedad, incluyendo la mejora en la condición del paciente (p. ej., en uno o más síntomas), el retraso en la progresión de la enfermedad, etc.

"Farmacéuticamente aceptable" según se utiliza en la presente memoria significa que el compuesto o composición son adecuados para la administración a un sujeto para lograr los tratamientos descritos en la presente memoria, sin efectos secundarios indebidamente perjudiciales teniendo en cuenta la gravedad de la enfermedad y la necesidad de tratamiento.

"Administando concurrentemente" o "administrar concurrentemente" según se utiliza en la presente memoria significa que los dos o más compuestos o composiciones se administran lo suficientemente próximos en el tiempo como para producir un efecto combinado (es decir, concurrentemente puede ser simultáneamente, o puede haber dos o más eventos que ocurren dentro de un corto período de tiempo antes o después del otro, p.ej., sucesivamente). La administración concurrente simultánea se puede llevar a cabo mezclando los compuestos antes de la administración, o administrando los compuestos en el mismo punto temporal pero en diferentes sitios anatómicos y/o mediante el uso de diferentes vías de administración.

"Inhibidor de la resorción ósea", según se utiliza en la presente memoria puede ser cualquier inhibidor de la resorción ósea adecuado, incluyendo pero no limitado a un bisfosfonato, un modulador selectivo del receptor de estrógeno, calcitonina, un análogo de la vitamina D, y una sal de calcio. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.507.715. Se conocen varios de estos compuestos. Véanse, p. ej., las Patentes de los Estados Unidos Núms. 7.018.982; 6.723.696; 6.284.730; y 5.039.669.

"Agente de control del peso", según se utiliza en la presente memoria incluye cualquier agente activo de control del peso adicional, incluyendo pero no limitado a los supresores del apetito tales como sibutramina, fentermina, dietilpropión, fendimetrazina, etc.; inhibidores de lipasa tales como orlistat; antidepresivos tales como bupropión; agentes anticonvulsivos como topiramato, zonisamida, y metformina, etc.

Los "poli(óxidos de alquileo)" según se utilizan en la presente memoria son conocidos (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.462.687) e incluyen poli(etilenglicol) o "PEG". Otros ejemplos pueden contener heteroátomos tales como S ó N, y son típicamente poli(óxidos de alquileo) lineales, tales como: O- (CH₂CH₂O)_x-, -O-C(O)CH₂-O-(CH₂CH₂O)_x-CH₂C(O)-O-, -NRCH₂CH₂-O-(CH₂CH₂O)_x-CH₂CH₂NR-, y SHCH₂CH₂-O-(CH₂CH₂O)_x-CH₂CH₂SH-, en donde R es H o alquilo inferior (preferiblemente metilo), y x es un número entero que proporciona o produce un peso molecular promedio en número total para la molécula de aproximadamente 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 15.000, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000 o 100.000 dalton o más.

B. Compuestos activos.

El compuesto activo de esta invención es el péptido KHHLGLEEPKLR (SEQ ID NO: 1)

Otros ejemplos de compuestos de la presente invención incluyen el péptido, con un peso molecular de 10.000 a 30.000 de radical de poli(etilenglicol) (o "PEG") acoplado a cualquiera de los extremos N o C del mismo.

"Polialquilenglicol" se refiere a polímeros de polialquilenglicol lineales o ramificados, incluyendo, pero no limitados a, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG), y el polibutilenglicol (PBG), así como co-polímeros de PEG, PPG y PBG en cualquier combinación, e incluye monoalquiléter de polialquilenglicol. Por lo tanto, en diversas realizaciones de esta invención, el polialquilenglicol de las composiciones de esta invención puede ser, pero no se limita a, polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol, y cualquier combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, el polialquilenglicol de la composición es polietilenglicol o "PEG". El término "subunidad de PEG" se refiere a una unidad de polietilenglicol solo, es decir, $-(CH_2CH_2O)-$.

En algunas realizaciones, el polialquilenglicol (p. ej., PEG) puede ser no polidisperso, monodisperso, sustancialmente monodisperso, puramente monodisperso, o sustancialmente puramente monodisperso.

- 5 "Monodisperso" se usa para describir una mezcla de compuestos en donde aproximadamente 100 por ciento de los compuestos en la mezcla tienen el mismo peso molecular.

"Sustancialmente monodisperso" se usa para describir una mezcla de compuestos en donde al menos aproximadamente 95 por ciento de los compuestos de la mezcla tienen el mismo peso molecular.

- 10 "Puramente monodisperso" se usa para describir una mezcla de compuestos en los que aproximadamente 100 por cien de los compuestos de la mezcla tienen el mismo peso molecular y tienen la misma estructura molecular. De este modo, una mezcla puramente monodispersa es una mezcla monodispersa, pero una mezcla monodispersa no es necesariamente una mezcla puramente monodispersa.

- 15 "Sustancialmente puramente monodisperso" se utiliza para describir una mezcla de compuestos en donde al menos aproximadamente 95 por ciento de los compuestos de la mezcla tienen el mismo peso molecular y tienen la misma estructura molecular. Por lo tanto, una mezcla sustancialmente puramente monodispersa es una mezcla sustancialmente monodispersa, pero una mezcla sustancialmente monodispersa no es necesariamente una mezcla sustancialmente puramente monodispersa.

C. Formulaciones farmacéuticas.

- 20 Los compuestos activos descritos anteriormente se pueden formular para la administración en un portador farmacéutico de acuerdo con técnicas conocidas. Véase, p. ej., Remington, The Science And Practice of Pharmacy (9ª Ed. 1995). En la fabricación de una formulación farmacéutica de acuerdo con la invención, el compuesto activo (incluyendo las sales fisiológicamente aceptables del mismo) se mezcla típicamente, entre otras cosas, con un portador aceptable. El portador debe, por supuesto, ser aceptable en el sentido de ser compatible con cualquier otro ingrediente de la formulación y no debe ser perjudicial para el paciente. El portador puede ser un sólido o un líquido, o ambos, y se formula preferiblemente con el compuesto en forma de una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, un comprimido, que puede contener de 0,01 o 0,5% a 95% o 99% en peso del compuesto activo. Se pueden incorporar uno o más compuestos activos a las formulaciones de la invención, que se pueden preparar por cualquiera de las técnicas farmacéuticas bien conocidas que comprenden mezclar los componentes, incluyendo opcionalmente uno o más ingredientes accesorios.

- 30 Las formulaciones de la invención incluyen aquellas adecuadas para la administración oral, rectal, tópica, bucal (p. ej., sublingual), vaginal, parenteral (p. ej., subcutánea, intramuscular, intradérmica o intravenosa), tópica (es decir., tanto la piel como las superficies mucosas, incluyendo superficies de las vías respiratorias) y la administración transdérmica, aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección que se esté tratando y de la naturaleza del compuesto activo particular que se esté utilizando.

- 35 Las formulaciones adecuadas para la administración oral se pueden presentar en unidades discretas, tales como cápsulas, sellos, grageas o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del compuesto activo; en forma de polvo o gránulos; en forma de una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o en forma de una emulsión de aceite-en-agua o de agua-en-aceite. Tales formulaciones se pueden preparar por cualquier método farmacéutico adecuado que incluye la etapa de asociar el compuesto activo y un portador adecuado (que puede contener uno o más ingredientes accesorios como se ha señalado más arriba). En general, las formulaciones de la invención se preparan mezclando uniforme e íntimamente el compuesto activo con un portador líquido o sólido finamente dividido, o ambos, y luego, si es necesario, conformando la mezcla resultante. Por ejemplo, se puede preparar un comprimido comprimiendo o moldeando un polvo o gránulos que contienen el compuesto activo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos se pueden preparar comprimiendo, en una máquina adecuada, el compuesto en una forma de flujo libre, tal como un polvo o gránulos opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, y/o uno o varios agentes activos/dispersantes. Los comprimidos moldeados se pueden elaborar por moldeo, en una máquina adecuada, el compuesto en polvo humedecido con un aglutinante líquido inerte.

- 50 Las formulaciones adecuadas para la administración bucal (sublingual) incluyen grageas que comprenden el compuesto activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; y pastillas que comprenden el compuesto en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia.

- 55 Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración parenteral comprenden soluciones inyectables acuosas y no acuosas estériles del compuesto o los compuestos activos, cuyas preparaciones son preferiblemente isotónicas con la sangre del receptor previsto. Estas preparaciones pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto. Las suspensiones acuosas y no acuosas estériles pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitarias o de múltiples dosis, por ejemplo ampollas

5 selladas y viales, y se pueden almacenar en un estado secado por congelación (lío­filizado) que requiere sólo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua para inyectables inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente. Por ejemplo, en un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición inyectable, estable, estéril que comprende uno o varios compuestos activos, o una sal de los mismos, en una forma de dosificación unitaria en un recipiente sellado. El compuesto o la sal se proporcionan en forma de un producto liofilizado que es susceptible de ser reconstituido con un portador adecuado farmacéuticamente aceptable para formar una composición líquida adecuada para su inyección en un sujeto. La forma de dosificación unitaria típicamente comprende de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 10 gramos del compuesto o la sal. Cuando el compuesto o la sal son sustancialmente insolubles en agua, se puede emplear una cantidad suficiente de agente emulsionante que sea fisiológicamente aceptable en cantidad suficiente para emulsionar el compuesto o sal en un portador acuoso. Uno de tales agentes emulsionantes útiles es la fosfatidilcolina.

15 Las formulaciones adecuadas para la administración rectal se presentan preferiblemente en forma de supositorios de dosis unitaria. Estos se pueden preparar mezclando el compuesto activo con uno o más portadores sólidos convencionales, por ejemplo, manteca de cacao, y luego conformando la mezcla resultante.

Las formulaciones adecuadas para la aplicación tópica a la piel adoptan preferiblemente la forma de un ungüento, crema, loción, pasta, gel, pulverización, aerosol, o aceite. Los portadores que se pueden utilizar incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, potenciadores transdérmicos, y combinaciones de dos o más de los mismos.

20 Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica se pueden presentar en forma de parches discretos adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período prolongado de tiempo. Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica también se pueden suministrar por medio de iontoforesis (véase, por ejemplo, *Pharmaceutical Research* 3 (6):318 (1986)) y típicamente adoptan la forma de una solución acuosa opcionalmente tamponada del compuesto activo. Las formulaciones adecuadas comprenden tampón citrato o bis­tris (pH 6) o etanol/agua y contienen ingrediente activo de 0,1 a 0,2 M.

Adicionalmente, la presente invención proporciona formulaciones liposomales de los compuestos descritos en la presente memoria y sus sales. La tecnología para formar suspensiones liposomales es bien conocida en la técnica. Cuando el compuesto o sal del mismo con una sal soluble en agua, utilizando la tecnología de liposomas convencional, los mismos se pueden incorporar en vesículas lipídicas. En tal caso, debido a la solubilidad en agua del compuesto o la sal, el compuesto o la sal serán arrastrados sustancialmente dentro del centro hidrófilo o el núcleo de los liposomas. La capa lipídica empleada puede ser de cualquier composición convencional y puede contener colesterol o puede estar libre de colesterol. Cuando el compuesto o la sal de interés son insolubles en agua, de nuevo empleando la tecnología de formación de liposomas convencional, la sal puede ser arrastrada sustancialmente dentro de la bicapa lipídica hidrófoba que forma la estructura del liposoma. En cualquier caso, los liposomas que se producen pueden tener un tamaño reducido, a través de la utilización de técnicas de sonicación y homogeneización convencionales.

Por supuesto, las formulaciones liposomales que contienen los compuestos descritos en la presente memoria o las sales de los mismos, se pueden liofilizar para producir un producto liofilizado que puede reconstituirse con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua, para regenerar una suspensión liposomal.

40 Se pueden preparar otras composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos insolubles en agua descritos en la presente memoria, o de las sales de los mismos, tales como emulsiones de base acuosa. En tal caso, la composición contendrá una cantidad suficiente de agente emulsionante farmacéuticamente aceptable para emulsionar la cantidad deseada del compuesto o la sal del mismo. Los agentes emulsionantes particularmente útiles incluyen fosfatidilcolinas y lecitina.

45 Además del compuesto o los compuestos activos, las composiciones farmacéuticas pueden contener otros aditivos, tales como aditivos de ajuste del pH. En particular, los agentes de ajuste del pH útiles incluyen ácidos, tales como ácido clorhídrico, bases o tampones, tales como lactato de sodio, acetato de sodio, fosfato de sodio, citrato de sodio, borato de sodio, o gluconato de sodio. Además, las composiciones pueden contener conservantes microbianos. Los conservantes microbianos útiles incluyen metilparabeno, propilparabeno, y alcohol bencílico. El conservante microbiano se emplea típicamente cuando la formulación se coloca en un vial diseñado para su uso de múltiples dosis. Por supuesto, como se indica, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden liofilizar utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica.

La presente invención se ilustra en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

55 Los estudios iniciales demostraron que cuando algunos tipos de células eran expuestas a IGFBP-2, se podía mejorar la capacidad de IGF-1 para estimular la síntesis de ADN y el crecimiento. En contraste otros laboratorios demostraron que las altas concentraciones de la proteína nativa a menudo inhiben la capacidad de IGF-1 para estimular el crecimiento.

Los estudios descritos en el presente documento se han centrado en las acciones independientes de IGF de IGFBP-2 que son independientes de su capacidad para inhibir la unión de IGF-1 a su receptor e inhibir el crecimiento. Específicamente se ha demostrado en ratones en los que se ha suprimido el gen de la IGFBP-2 que presentaban una reducción del recambio óseo como se refleja por el examen histológico de los huesos siguiente a un marcaje con tetraciclina y que el espesor cortical y el grosor trabecular también se redujeron como se evidencia por el barrido DEXA, el barrido PIXI y el análisis microCT. Una explicación molecular de este fenómeno fue proporcionada por la observación de que tanto las células musculares de la musculatura lisa aórtica como de hueso retiradas de estos animales mostraban altas concentraciones del inhibidor del crecimiento PTEN y que la adición exógena de IGFBP-2 o del péptido de 13 aminoácidos descrito en la presente memoria podría suprimir las concentraciones de PTEN, lo que conduce a la activación mejorada de la vía de la quinasa PI-3/AKT que es necesaria para la estimulación del crecimiento. Otros trabajadores han sugerido también que IGFBP-2 puede estimular las células madre. Lodish y Zhang demostraron que IGFBP-2 era un potente factor de crecimiento de células madre y que podría estimular la reconstitución de células madre hematopoyéticas después de la ablación de la médula ósea con la terapia de radiación. Estos investigadores no investigaron si los fragmentos de IGFBP-2 o cualquier porción de la proteína tenían esta propiedad.

Ejemplo 1

Secuencias peptídicas

La secuencia de aminoácidos de un péptido de 13 aminoácidos de la invención es la siguiente:

KHHLGLEEPKKLR (SEQ ID NO: 1).

La razón fundamental para escoger esta región particular de la proteína IGFBP-2 se basó principalmente en ciertos factores. El primero es su densidad de carga; es decir, el péptido contiene 6 residuos alcalinos en 13 posiciones y 2 residuos ácidos. Esto le confiere una densidad de carga extremadamente alta. En segundo lugar, está flanqueado por una secuencia de poliprolina, lo que indica que se mantiene en posición rígida por la proteína parental. En tercer lugar, esta secuencia es única para IGFBP-2. La familia de IGFBP contiene 6 miembros que tienen un alto grado de conservación de la secuencia en los extremos N terminal y C terminal de las proteínas. Sin embargo, la región media de cada proteína muestra la divergencia de secuencias. Esta secuencia de 13 aminoácidos es completamente única para IGFBP-2 y no está contenida en ninguna de las otras 6 proteínas de unión a IGF. La importancia de esto es que la desactivación del gen IGFBP-2 en ratones proporciona un fenotipo único: bajo recambio óseo y elevado contenido de masa grasa. La desactivación de cualquiera de las otras 5 proteínas de unión a IGF no proporciona este fenotipo. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que había una región dentro de IGFBP-2 que justificaba estos efectos.

Ejemplo 2

Preparación de péptido pegilado

El péptido de 13 aminoácidos del SEQ ID NO: 1 descrito en la presente memoria se preparó por medio de síntesis en fase sólida, se purificó mediante HPLC y, a continuación se evaluó la pureza mediante espectrometría de masas. El poli(etilenglicol) ("PEG") se adquirió de JenKem Technology USA (2033 W. McDermott Dr., Suite 320 núm. 188, Allen, TX 75013-4675). Se disolvieron 10,3 mg del péptido en 1,0 ml de fosfato sódico 50 mM pH 6,5. Se disolvieron 406 mg de metoxiPEG propionaldehído de peso molecular 20 kDa en 4 ml de fosfato de sodio 50 mM. Se añadieron 120 µl de una solución 1 M de cianoborohidruro de sodio, y tetrahidrofurano (Aldridge) a la solución de PEG. A continuación, se añadió 1 ml de péptido a la solución de PEG, seguido de 1 ml adicional de fosfato de sodio. La mezcla de reacción se hizo girar después en un tubo cónico de 15 ml durante 24 horas a 4°C. Después de la incubación, se añadió base Tris a una concentración final de 6,8 mM para bloquear los sitios que no habían reaccionado. La pegilación N-terminal se verificó por medio de SDS-PAGE seguido de tinción de Coumassie, que proporcionó un peso molecular que era compatible con 1 molécula de PEG añadida por molécula de péptido. El compuesto también se analizó por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo que se había preparado específicamente contra la secuencia de 13 aminoácidos. Las moviidades electroforéticas de la proteína sometida a tinción de Coumassie y la proteína inmunotransferida eran idénticas, lo que indica que el péptido inmunorreactivo se había pegilado.

Ejemplo 3

Análisis de células grasas

En algunos análisis, se obtuvieron los datos de células grasas mediante el uso de la línea de células 3T3L1, que se utiliza para estudiar la diferenciación de células grasas. Estas células se cultivan como precursores de células grasas. Estas células se mantienen en Hams F12 con suero de ternera fetal y glutamina 15 mM. Para estimularlas a entrar en la ruta de diferenciación de las células grasas, se añadieron isometilbutilxantina, dexametasona e insulina usando concentraciones de IBMX 0,5 mM, insulina 16,7nM y dexametasona 0,1µM. En algunos casos se añadieron 100 ng/ml de IGF-1 en lugar de insulina. Tres días después de la adición, la diferenciación en adipocitos es evidente y se detecta mediante tinción con Rojo Oleoso O.

Para determinar los efectos del péptido del SEQ ID NO: 1, éste se añadió a concentraciones de 20 ng/ml, 200 ng/ml y 2 µg/ml. Se detectó una inhibición detectable de la diferenciación de adipocitos, tal como se determina por una disminución en el número de células positivas para Rojo Oleoso O, utilizando 20 ng/ml de péptido. La respuesta fue máxima a 200 ng/ml y no aumentó más mediante la adición de 2 mcg/ml. Se sometió a ensayo IGFBP-2 de tipo salvaje en paralelo y se encontró que también inhibía la diferenciación de adipocitos utilizando concentraciones entre 50-500 ng/ml.

Para la tinción con Rojo Oleoso O, se prepara una solución de partida de 0,5 ml/100 ml de isopropanol. Se mezclan 60 ml de solución con 40 ml de agua y se dejan reposar a temperatura ambiente durante una hora y después se filtran. El medio se aspira de los cultivos de adipocitos y las células se fijan en formaldehído al 1%. El formaldehído se aspira y se añade la solución de Rojo Oleoso O en una cantidad necesaria para cubrir las células, que luego se dejan a temperatura ambiente durante una hora. A continuación se elimina el colorante y se lavan las placas con agua destilada y se secan. Por lo general 60-70% de las células se tiñen de manera positiva después de 3 días.

El efecto máximo del péptido fue la inhibición de la diferenciación a un nivel en donde <20% de las células fueron positivas. Estos hallazgos fueron reconfirmados utilizando preadipocitos primarios de ratón. Se sacrificaron ratones de 35-50 días de edad y se eliminaron de forma aséptica las almohadillas de grasa inguinales. El tejido graso se lavó y se disolvió en solución salina alcalina de Hanks que contenía glucosa al 0,1% y 2 mg/ml de collagenasa, (tipo 3 Worthington) y BSA al 4%. Después de 15 min de digestión a 37°, el tejido se separó por medio de dispersión y pipeteado y después se filtró a través de un filtro de nailon estéril de 80 micras. Después las células se cultivaron en placa en DMEM F12 que contenía suero de ternera fetal al 10% y luego se centrifugaron a 700 x g para separar las células vasculares estromales de los adipocitos, que flotan. Se desechó el sobrenadante y el sedimento celular, que contenía las células vasculares del estroma, se resuspendió en DMEM F12 con FCS al 10% y se cultivó en placa a una densidad de 15.000 células/cm². Se aspiró el medio 24 horas más tarde y el medio de nueva aportación se reemplazó cada 3 días hasta que las células alcanzaron una confluencia de 80-90%. Se indujo la diferenciación mediante la adición de medio libre de suero que contenía glucosa 25 mM, 10 µg/ml de transferrina, T3 10 nM, dexametasona 10⁻⁷, 5 µg/ml de HDL e insulina 16,7nM. Esto se añadió a los cultivos que estaban entre 30-50% de confluencia. El medio se sustituyó cada 3 días hasta que se observaron gotitas de grasa, por lo general 6-8 días. Después se confirmaron por medio de tinción con Rojo Oleoso O como se ha descrito anteriormente. El péptido se sometió a ensayo a concentraciones entre 2 ng y 2 µg/ml de proteína IGFBP-2 nativa entre 50-500 ng/ml. La IGFBP-2 se había purificado a partir de medio celular acondicionado y se determinó que era homogénea por medio de análisis de la secuencia de aminoácidos.

Ejemplo 4

Medición de la diferenciación de los osteoclastos

El método para la diferenciación de los osteoclastos es el siguiente: se anestesiaron ratones BALB/c en los que se había suprimido el gen de IGFBP-2 (véase V. DeMambro et al., Endocrinology, 149(5): 2051-2061 (2007)) y se sacrificaron por dislocación cervical. Los fémures de cada ratón se diseccionaron libres de tejido blando y la médula ósea se aspiró por medio de punción con aguja. Las células se eliminaron en condiciones estériles y se resuspendieron en DMEM con suero de ternera fetal al 10%. Las células se centrifugaron a 700 x g y el sedimento de células se resuspendió en medio y se sembró en placas de 24 pocillos a una concentración de 5000 células/cm². Las placas que se utilizan son placas de baja adherencia que no tienen aditivos para facilitar la adherencia de las células. En estas condiciones, los macrófagos se adherirán mientras que otras células no lo harán. El medio se complementó con mCSF de 20 ng/ml. Después de 3 días las células se retiraron de la placa y los macrófagos adherentes se expusieron a medio de nueva aportación que contenía FBS al 10% y mCSF. Esto se repitió de nuevo después de 3 días y luego después de otros 3 días las células se trataron con tripsina y se volvieron a sembrar en placas nuevas a 6 x 10⁴ células/cm. En este momento se añadió el ligando RANK, 50 ng/ml, aunque en algunos experimentos se utilizaron concentraciones tan bajas como 10 ng/ml. El medio se cambió a los 3 y 6 días y el día 7 las células se tiñeron para determinar la fosfatasa ácida resistente a tartrato, un marcador de diferenciación de los osteoclastos. Se añadió IGFBP-2 a concentraciones entre 50 ng/ml y 500 mcg/ml. El péptido se añadió a 20 o 200 ng/ml.

Los resultados mostraron que las células no se diferenciaban en osteoclastos sin la adición del péptido o de la IGFBP-2 nativa. Además, en presencia del péptido, la concentración en suero podra reducirse hasta un mínimo de 0,5% y todavía se detectaba diferenciación de los osteoclastos. Además, si se utilizaba suero al 2%, se podía suprimir mCSF del medio y el ligando RANK disminuía tanto como 30 ng/ml. Sin embargo, no fue posible eliminar la IGFBP-2. Es decir, los cultivos mantenidos sin IGFBP-2 o péptido no se diferenciaban en osteoclastos.

Para la tinción para determinar la fosfatasa ácida resistente al tartrato, se preparó una solución al 1% y se incubó con las células durante 30 min a temperatura ambiente. Los cultivos se lavaron a continuación y el número de células se determinó por recuento manual. En algunos experimentos, el péptido de 13 aminoácidos pegilado se comparó con el péptido no pegilado y se encontró que tenían una actividad biológica equivalente.

Ejemplo 5

Medición de la diferenciación de osteoblastos

Para la medición de la diferenciación de osteoblastos, las células también se obtienen de los mismos aspirados de médula ósea. Sin embargo, en algunos experimentos se obtuvieron de bóveda craneal obtenida a partir de animales recién nacidos. Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos a 20×10^6 células/pocillo en medio alfa MEM con suero bovino fetal al 10%. El medio se cambió los días 1 y 3. El día 3 las células recibieron medio de diferenciación, que es alfaMEM que contiene suero de ternera fetal al 10%, fosfato de glicerol 8 mM y 50 µg/ml de ácido ascórbico. El medio se cambió con posterioridad cada 2 días hasta la terminación del experimento, en general, a los 18 días. En algunos experimentos la concentración de suero de ternera fetal se redujo un 5% o un 2%. Se añadieron 200 ng/ml de IGFBP-2 a algunos cultivos o el péptido IGFBP-2 a concentraciones entre 2 ng/ml y 2 mcg/ml. Para determinar la diferenciación de osteoblastos, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y luego se tiñeron para determinar la fosfatasa alcalina. Después las células se contratiñeron con tinción de von Kossa para detectar la mineralización. En algunos experimentos, el péptido de 13 aminoácidos pegilado se comparó con el péptido no pegilado y se encontró que tenían actividad biológica equivalente.

Ejemplo 6

Estudios de crecimiento óseo y mineralización

Este sistema utiliza un sistema de explante *ex vivo*, por lo tanto es una transición entre las células cultivadas y los experimentos *in vivo*. El tejido de formación de hueso se elimina directamente de un ratón y luego se cultiva en cultivo de órganos durante varios días. Los aditivos de ensayo se pueden añadir directamente al medio a cualquier concentración con el fin de someter a ensayo la actividad biológica. El método es el siguiente: se aislaron huesos metatarsianos de ratones recién nacidos entre los días 0 y 3 después del nacimiento utilizando el microscopio de disección. Se utilizaron los tres metatarsianos medios para todos los experimentos. Se incubaron tres metatarsianos por pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos en medio DMEM que contenía suero bovino al 0,5%, ácido ascórbico 0,5 M, beta glicerol fosfato 1 mM a 37°C. El medio fue reemplazado un día después y los metatarsianos se cultivaron hasta durante 10 días. El crecimiento se midió por aumento cuantitativo del tamaño, longitud y anchura de los huesos utilizando un microscopio de fase invertida con una escala micrométrica incorporada para las mediciones. La mineralización fue evaluada por la adición de calceína (500 ng/ml) al medio durante 2 horas antes de la fijación del tejido. Las imágenes fluorescentes se capturaron con una cámara digital conectada a un microscopio invertido y cuantificando la fluorescencia de la calceína bajo un estímulo de longitud de onda adecuada. La histología del hueso y el cartílago se midió mediante la fijación de los huesos en PFA al 4% durante la noche y almacenamiento en etanol del 70%, seguido de la inclusión en Parafilm seccionamiento y tinción. Las secciones fueron teñidas con H y E, Rojo Alizarina o fosfatasa alcalina. Para el análisis de proteínas, el tejido se homogeneizó en tampón de muestra de Laemmli y los geles se hicieron circular utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida SDS convencional y transferencia Western.

Los resultados demostraron que la adición de IGFBP-2 intacta o del péptido de IGFBP-2 a una concentración de 20-200 ng/ml estimulaba el crecimiento óseo y la calcificación en metatarsianos derivados de ratones IGFBP-2 *-/-*. El péptido también tenía un efecto estimulante adicional modesto sobre metatarsianos con respecto a animales normales, pero el porcentaje de incremento fue mucho mayor en los metatarsianos derivados de animales con el gen de IGFBP-2 desactivado.

Ejemplo 7

Rescate *in vivo* del fenotipo de hueso en ratones IGFBP-2 *-/-*

Los ratones IGFBP-2 *-/-* tienen una densidad mineral ósea reducida, un espesor cortical y trabecular reducido y un recambio óseo reducido, tanto en la formación como en la resorción. Para determinar si el péptido de 13 aminoácidos era activo sistémicamente, se preparó una preparación pegilada con el fin de prolongar la semivida. A continuación, se inyectó esta preparación en los ratones. Se utilizaron ratones con edades entre 16 y 20 semanas. Se sabe que estos ratones tienen un fenotipo de hueso importante. El péptido se inyectó a una dosis de 50 mcg de péptido más producto conjugado, que es el peso molecular total del PEG más el péptido, que es un peso molecular de aproximadamente 23.000, que se inyectó por vía intraperitoneal cinco días por semana durante tres semanas. Se inyectó a seis ratones en cada grupo. La medida principal de la densidad ósea es el volumen de hueso sobre el volumen total calculado por análisis microCT. Este mide la cantidad de hueso total dentro de un espacio determinado. Los animales de control reciben inyecciones de PBS.

Los valores de BV/TV fueron los siguientes: Para los ratones normales, el valor del volumen ocupado por el hueso fue de 0,22 (22%); para los ratones con la delección del gen IGFBP-2, el valor fue de 0,12; y para los ratones que recibieron el péptido, fue de 0,18. Por lo tanto, la inyección del péptido rescató el fenotipo de hueso dentro del 70% del normal incluso aunque estos ratones hubieran pasado las primeras 6 semanas de vida sin exposición a esta proteína. La medición del espesor cortical también demostró que este aumentó sustancialmente mediante la administración del péptido. El análisis de los huesos bioquímicamente mostró que PTEN estaba regulado a la baja. Por lo tanto, parece que el péptido es totalmente capaz de rescatar un fenotipo de hueso en un modelo de animal

entero.

Ejemplo 8

El dominio de unión a heparina de IGFBP2 es anabólico para el esqueleto y funciona a través de un mecanismo que es independiente de la unión a IGF-1

5 Ratones. La generación de la cepa original de origen mixto, B6; 129-*Igfbp2*<*tm1Jep*>, que se refiere a ratones *Igfbp2*^{-/-} ratones, se ha descrito previamente^{10,52}. Los ratones originales se retrocruzaron sobre un origen C57BL/6J durante al menos 10 generaciones. Todos los estudios experimentales *in vivo* y *ex vivo* se realizaron con ratones macho. Todos los estudios con animales fueron revisados y aprobados por el AnimalCare and Use Committee of
10 Maine Medical Center Research Institute. Los ratones tenían libre acceso a agua y dieta durante la duración del estudio. Las condiciones medioambientales de las colonias incluían ciclos de luz:oscuridad de 14:10 horas.

Cultivo de células. Se recogieron osteoblastos de bóveda craneal neonatal de ratones de 7-10 días como se ha descrito anteriormente⁵³. Brevemente, las bóvedas craneales fueron digeridas 5 veces con colagenasa P y tripsina. Las células liberadas de los productos digeridos 2 a 5 se recogieron como osteoblastos primarios de bóveda craneal, y se mantuvieron en DMEM con un suplemento de FCS al 10% y aminoácidos no esenciales. La osteoblastogénesis
15 de los osteoblastos primarios de bóveda craneal se llevó a cabo por tratamiento de las células con β -glicerofosfato 4 mM y 50 μ g/ml de ácido ascórbico en α MEM. Las células estromales de la médula ósea (BMSC) se recogieron de los fémures y las tibias de ratones de 8 semanas de edad como se describió previamente¹⁰. La osteoblastogénesis de BMSC fue inducida por el tratamiento con medio osteogénico que consistía en α MEM que contenía FCS al 10%, β -glicerofosfato 8 mM, y 50 μ g/ml de ácido ascórbico.

20 Cultivo de metacarpianos. Se aislaron los metacarpianos de ratones *Igfbp2*^{-/-} de 1 día de edad y se incubaron en DMEM que contenía BSA al 0,5%, 50 μ g/ml de ácido ascórbico y β -glicerofosfato 1 mM durante 10 días⁵⁴. Los estimulantes se añadieron al medio de cultivo a partir del día 1. El día 10, se incubaron los metacarpianos en medio que contenía calceína (500 ng/ml) durante 2 horas para la tinción del depósito de calcio, y se obtuvieron imágenes. Después, los huesos se fijaron con PFA al 4%, se incluyeron en parafina, y se procesaron para la doble tinción con
25 azul Alcian y von Kossa.

PCR en tiempo real. El ARN total se preparó utilizando RNeasy Mini Kit (Qiagen) y se trató con ADNasa (Qiagen). El ADNc se generó utilizando un hexámero al azar y transcriptasa inversa (SuperScript III, Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la expresión del ARNm se llevó a cabo utilizando un iQ SYBR Green Supermix en un ciclador térmico iQ5 y un sistema de detección (Bio-Rad). Se utilizó ARNr de 18S Gapdh
30 como un gen de control convencional interno para toda la cuantificación.

Análisis de transferencia Western. Para preparar productos lisados de células enteras, las células se solubilizaron en tampón RIPA⁵⁵. Por fracción citosólica, las células se solubilizaron con tampón hipotónico que contenía inhibidores de proteasa y de fosfatasa (Tris 10 mM, MgCl₂ 0,2 mM, pH 7,4) y se mantuvieron en hielo durante 10 min. Los productos lisados celulares se mezclaron con tampón de sacarosa (concentración final; sacarosa 25 mM, EDTA 0,1 mM) y se centrifugaron a 20.000 x g durante 1 hora. El sobrenadante se utilizó como fracción citosólica. Para
35 preparar la fracción de membrana, las células se solubilizaron con PBS que contenía inhibidores de proteasa y fosfatasa. Los productos lisados se congelaron a -80°C durante 1 h y se descongelaron a temperatura ambiente. Después de tres ciclos, se centrifugaron a 13.000 x g durante 25 min. El sedimento se suspendió con tampón de aislamiento de proteína de membrana (Tris-HCl 20 mM; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; y Triton X-100 al 1%, pH 7,5) que contenía inhibidores de proteasa y fosfatasa. La concentración de proteína se evaluó mediante el kit de análisis de proteína BCA (Thermo Scientific) y se separaron cantidades iguales de la muestra mediante SDS-
40 PAGE y se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas en BSA al 5% en solución salina tamponada con Tris. A continuación, las membranas se sometieron a inmunotransferencia con anti-PTEN (Señalización celular, Núm. 9559), anti-Akt (Señalización celular, Núm. 9272), anti-pSer473-Akt (Señalización celular, Núm. 9271), anti- β -catenina (BD Transduction Laboratories, 610153), anti-pSer552- β -catenina (Señalización celular, Núm. 9566P), o anti- α -actina (Santa Cruz, sc-47778), y se revelaron con anticuerpos anti-IgG de conejo o ratón acoplados con peroxidasa de rábano picante, seguido de intensificación con SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate Antibodies (Pierce Chemical Co.).
45

Generación del péptido de dominio de unión a heparina. El péptido sintético que contiene el homólogo de ratón del dominio de unión a heparina (AA246-249) y 9 aminoácidos adicionales de IGFBP2 de ratón, ²³⁷KHLSLEEPKKLRP²⁵⁰ (en adelante referido como péptido HBD), y el péptido de control para el péptido HBD (AALSLEPPAALAP) fueron sintetizados por Protein Chemistry Core Facility at the University of North Carolina en Chapel Hill. El péptido sintético para el dominio de unión a heparina de IGFBP5 (²⁰¹RKGFYYKRKQCKPSRGKRK²¹⁸) fue generado de la misma manera. La pureza y la confirmación de la secuencia se determinaron por espectrometría de masas. El péptido HBP
55 de IGFBP-2 se pegiló como sigue: se mezclaron 10 mg de péptido con 380 μ g de metoxi PEG maleimida (20.000 kDa) (razón molar de péptido con respecto a PEG 1:3) (Jenkem Biotechnology) en 4,0 ml de NaH₂P0₄ 0,05 M, pH 7,0. Después de una incubación durante la noche a 4°C, se añadió cisteína a una concentración final de 17 mM para bloquear los sitios que no habían reaccionado. Para eliminar el péptido no pegilado y la cisteína, la mezcla fue desalinizada usando una columna de centrifugación Zebra Desalt (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del

fabricante. La pegilación se verificó mediante análisis SDS-PAGE con tinción de Coomassie.

Tratamiento in vivo de ratones *Igfbp2*^{-/-} con péptido de unión a heparina pegilado (PEG-HBD-péptido). Se administraron a ratones *Igfbp2*^{+/+} y *Igfbp2*^{-/-} PBS o PEG-HBD-péptido (50 µg/día) por vía intraperitoneal 5 veces por semana desde las 6 hasta las 9 semanas de edad. La absorciometría con rayos X de doble energía se realizó antes del inicio del tratamiento. A los ratones se les inyectaron 20 mg de calceína/kg por vía intraperitoneal 7 días y 2 días antes de la recogida de muestras.

Absorciometría con rayos X de doble energía (DXA). La absorciometría con rayos X de doble energía (DXA) para la densidad mineral ósea de todo el cuerpo y de la zona femoral (aBMD) y la composición corporal excluida de la cabeza se realizaron con el PIXImus (GE-Lunar)¹⁰. El PIXImus se calibró diariamente con un fantasma de ratón proporcionado por el fabricante.

MicroTC. La microarquitectura del hueso trabecular distal y del hueso cortical de la diáfisis se analizó con fémures y vértebras (L5) por medio de MicroTC (MicroCT40)¹⁰. Se midieron aproximadamente 100 secciones inmediatamente proximales a la placa de crecimiento distal, con un tamaño de píxel isotrópico de 12 µm y un grosor de la sección de 12 µm. El espesor del hueso cortical de la diáfisis fue analizado de una manera similar utilizando aproximadamente 18 secciones obtenidas en el punto medio exacto del fémur.

Histomorfometría ósea. Se analizaron las diferencias histomorfométricas *in vivo* entre los ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PBS o PEG-HBD-péptido a las 9 semanas de edad. A los ratones se les inyectaron 20 mg/kg de calceína por vía intraperitoneal 7 días y 2 días antes de la recogida de muestras. Los fémures se analizaron como se ha descrito previamente¹⁰.

Biomecánica femoral. Se compararon las propiedades biomecánicas femorales mediante la flexión en tres puntos entre los ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PBS o PEG-HBD-péptido a las 9 semanas de edad. La carga se aplicó a una velocidad constante (0,05 mm/seg) hasta la rotura. Se midieron la carga de rotura (newton), la rigidez a la flexión (newton por milímetro) y el trabajo de rotura (newton-milímetros) de la curva de carga-desplazamiento y se midieron el módulo elástico aparente (megapascal) y la resistencia última (gigapascal) utilizando la geometría de la sección transversal de la parte media femoral correspondiente medida desde µCT.

Análisis estadístico. Todos los datos se expresan como la media ± Error Típico de la Media (ETM). Los resultados se analizaron para las diferencias estadísticamente significativas utilizando el test de la t de Student o ANOVA seguido del test de comparación múltiple *post hoc* de Bonferroni. Se analizó el ensayo de tolerancia a la glucosa usando medidas repetidas ANOVA. La significación estadística se fijó en *p*<0,05.

El dominio de unión a heparina de IGFBP-2 estimula la osteoblastogénesis *in vitro*. Se ha informado anteriormente de que los ratones *Igfbp2*^{-/-} mostraban un fenotipo osteopénico con baja formación ósea y deterioro de la osteoblastogénesis en las células estromales de la médula ósea (BMSC) de ratones *Igfbp2*^{-/-} en comparación con células de tipo salvaje (Fig. 1a)¹⁰. Consecuentemente con ello, los osteoblastos de bóveda craneal carentes de *Igfbp2* (COB) mostraron un deterioro de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) durante la osteoblastogénesis en comparación con las células de tipo salvaje (Fig. 1b). Para investigar si el dominio de unión a heparina (HBD) de IGFBP-2 tiene un efecto anabólico sobre el esqueleto, se generó una molécula pequeña (el HBD-péptido), que contiene el HBD de IGFBP-2, y se sometió a ensayo para determinar su efecto sobre la osteoblastogénesis *in vitro*. Para confirmar que el efecto del HBD-péptido era específico, también se elaboró un péptido de control y se analizó para determinar su efecto sobre la osteogénesis. El péptido de control no aumentó la mineralización de los COB *Igfbp2*^{-/-}, en comparación con las células tratadas con PBS, mientras que el HBD-péptido era completamente activo (Fig. 7). Para prolongar la vida media de la molécula pequeña de manera que fuera viable emprender estudios *in vivo*, se realizó la pegilación del HBD-péptido (PEG-HBD). Los COB *Igfbp2*^{-/-} y las BMSC se cultivaron en medio osteogénico (es decir, ácido ascórbico y β-glicerolfosfato) en presencia de PEG-HBD. El PEG-HBD mejoró fuertemente la osteogénesis de COB y BMSC, medida por medio de fosfatasa alcalina y tinción con Rojo Alizarina (Fig. 1c). Consecuentemente con esto, las expresiones de *ALP*, *Runx2* y *osteocalcina* (OC) mejoraron en las BMSC tratadas con PEG-HBD en comparación con las células tratadas de control (Fig. 1d).

El dominio de unión a heparina de IGFBP-2 estimula la expansión del periostio de los metacarpianos *ex vivo*. Para entender aún mejor el efecto anabólico de HBD sobre el esqueleto, se recogieron metacarpianos de ratón de 1 día de edad y se incubaron con medio osteogénico en ausencia de suero de ternera fetal y se analizaron para determinar los efectos del HBD-péptido sobre el crecimiento esquelético. Se evaluó la acumulación de hueso por la dimensión longitudinal del área que incorporaba calceína, así como la anchura y la longitud de los metacarpianos. El péptido de control no tuvo efecto sobre el área que incorporaba calceína, y la longitud y la anchura de los metacarpianos fueron comparables con las de los metacarpianos tratados con PBS. Por lo tanto se utilizó PBS como control posterior para estudios adicionales (Fig. 8). Como se muestra en la Fig. 2a, la IGFBP-2 y el HBD-péptido mejoraron de forma significativa el área que incorporaba calceína de los metacarpianos (Fig. 2a y b). El IGF-1 también estimuló la expansión del área que incorporaba calceína en una medida similar a IGFBP-2 y HBD-péptido (Fig. 2a y b). Cuando los huesos metacarpianos fueron tratados con IGF-1 junto con HBD-péptido los metacarpianos mostraron una mejora adicional del área que incorporaba calceína. Además, la IGFBP-2 y el HBD-péptido también aumentaron la anchura de los metacarpianos, lo que implica que la IGFBP-2 tiene un papel importante en la

expansión del periostio (Fig. 2c y d).

El dominio de unión a heparina de IGFBP-5 no tiene un efecto anabólico sobre el esqueleto *in vitro* y *ex vivo*. Debido a que otras IGFBP poseen regiones HBD como IGFBP-2, se llevaron a cabo análisis para determinar si el efecto osteogénico del péptido de HBD era específico para esta región en IGFBP-2 o si el dominio HBD en otras formas de IGFBP también tenía este efecto. Para este propósito se preparó un péptido que contenía la región HBD en IGFBP-5 (HBD-BP5) y se determinó su efecto sobre la osteoblastogénesis. Los COB carentes de *Igfbp2* se cultivaron en presencia de HBD-BP5, y se determinó que HBD-BP5 no mostraba ninguna mejora de la mineralización en comparación con las células tratadas con PBS (Fig. 3a). En segundo lugar, se recogieron los metacarpianos y se trataron con medios osteogénicos con o sin HBD-BP5. El HBD-BP5 no tuvo ningún efecto sobre el área que incorporaba calceína o sobre la longitud y la anchura de los metacarpianos. Estos datos indican que el efecto del HBD sobre la adquisición esquelética es probablemente específico para IGFBP-2.

El dominio de unión a heparina de IGFBP-2 rescata el fenotipo osteopénico de ratones *Igfbp2*^{-/-} *in vivo* mediante la mejora de la micro-arquitectura del esqueleto. Basándose en estas observaciones *in vitro* y *ex vivo* se realizaron estudios para determinar si el HBD-péptido podría rescatar el fenotipo osteopénico de ratones *Igfbp2*^{-/-}. Para este propósito, se trataron ratones *Igfbp2*^{-/-} con PBS o PEG-HBD. Basándose en el análisis de la semivida de PEG-HBD (datos no mostrados), se administraron 50 µg de PEG-HBD 5 veces por semana durante 3 semanas en ratones de 6 a 9 semanas de edad. La densidad mineral ósea por área corporal (aBMD) y el contenido mineral óseo (aBMC)/peso corporal (PC) analizados por DXA no fueron diferentes antes del inicio del tratamiento entre ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PBS o PEG-HBD (Tabla 3). Como era de esperar debido al crecimiento y la consolidación normales, los ratones *Igfbp2*^{+/+} tratados con PBS mostraron un incremento en el volumen de hueso trabecular por microCT en comparación con los ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PBS. El tratamiento con PEG-HBD mejoró la aBMD de todo el organismo y aBMD/PC en ratones *Igfbp2*^{-/-} (Tabla 4), aunque no alcanzó significación estadística. Por otra parte, el análisis microCT reveló un aumento en el volumen de hueso trabecular tanto en el fémur distal como en las vértebras L5 de los ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PEG-HBD vs los ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PBS. Esto estuvo acompañado por un aumento del grosor trabecular (Fig. 4a, Tabla 1, Tabla 5). El espesor cortical en la diáfisis media del fémur no se vio afectada por la administración de PEG-HBD, pero el área total analizada a nivel de la diáfisis media del fémur se incrementó en los ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PEG-HBD en comparación con los ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PBS. Esto es compatible con un efecto de PEG-HBD sobre la expansión del periostio de una manera similar a lo que se demostró en el análisis con metacarpianos *ex vivo* (Tabla 1 y Fig. 2). Los cambios en la arquitectura esquelética se asociaron con una tendencia similar en la resistencia ósea. En los estudios de tres puntos de flexión del fémur, los ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PEG-HBD tuvieron una rigidez ósea y un módulo de Young estimado ligeramente mayores en comparación con los ratones con el gen desactivado tratados con PBS (Fig. 4b). Por otra parte, la fuerza en el límite elástico y el desplazamiento en el límite elástico fueron menores en los animales tratados con PEG-HBD en comparación con los controles (Fig. 4b).

El análisis histomorfométrico reveló que el número de osteoblastos por perímetro de hueso se incrementó significativamente, mientras que el número de osteoclastos por perímetro del hueso mostró una disminución en ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PEG-HBD vs ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PBS (Fig. 4c, Tabla 6). Curiosamente, el número de adipocitos de médula ósea se redujo en los ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PEG-HBD, aunque PEG-HBD no tuvo efecto directo sobre la adiposidad corporal total (Fig. 4d, Tablas 3 y 4). El aumento en el número de osteoblastos de los ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PEG-HBD coincidente con la reducción en los adipocitos de médula implica que la asignación de las células madre mesenquimales se puede alterar hacia el linaje osteogénico en los ratones tratados con PEG-HBD. Consecuente con esto, la expresión de *Pparg* en COB tratados con PEG-HBD se redujo (Fig. 4e).

En lo que respecta a la reducción en el número de osteoclastos observada en la histomorfometría de los ratones tratados con PEG-HBD, los niveles de TRAP5b en suero también se redujeron significativamente en los ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PEG-HBD (Fig. 4f). Para investigar el mecanismo por el cual PEG-HBD afecta a los osteoclastos, se cultivaron células del estroma de médula ósea de ratones *Igfbp2*^{-/-} y se indujo la osteoclastogénesis en presencia o ausencia de HBD. El PEG-HBD no tuvo un efecto directo sobre la osteoclastogénesis (datos no mostrados). En segundo lugar, se recogieron COB y BMSC *Igfbp2*^{-/-}, y se trataron con PEG-HBD. El PEG-HBD no afectó a la expresión de *opg*, pero suprimió marcadamente la expresión de *RANKL* (Fig. 4 g y h). Estos datos implican que PEG-HBD reduce la osteoclastogénesis indirectamente a través de la regulación a la baja de la expresión de *RANKL* en osteoblastos.

El dominio de unión a heparina de IGFBP-2 suprime la expresión de PTEN y estimula la señalización de IGF-1/Akt. Existe evidencia de una asociación negativa entre IGFBP-2 y la expresión de PTEN en las células cancerosas humanas tales como glioblastoma y cáncer de próstata¹⁸⁻²¹. Además, se ha demostrado que la expresión de PTEN se encuentra reforzada en osteoblastos deficientes en *Igfbp2*¹⁰. Estos hallazgos llevaron a la especulación de que IGFBP-2 regula negativamente la expresión de PTEN y mejora de señalización de IGF-1 en osteoblastos. Los primeros análisis se llevaron a cabo para determinar si IGFBP-2 suprimía la expresión de PTEN utilizando COB *Igfbp2*^{-/-} primarios. Se encontró que la IGFBP-2 completa suprimía considerablemente la expresión PTEN en estas células (Fig. 5a). El péptido de control no tuvo ningún efecto sobre la expresión de PTEN (Fig. 9), pero al igual que IGFBP-2, PEG-HBD indujo una reducción en la expresión de PTEN (Fig. 5b). En segundo lugar, se llevaron a cabo análisis para determinar si la reducción de la expresión de PTEN daba como resultado la señalización

mejorada de IGF-1/Akt. El análisis de transferencia Western para determinar la fosforilación de Akt en la serina 473 (pSer473-Akt) reveló que la activación de Akt estimulada por IGF-1 estaba deteriorada en COB *Igfbp2*^{-/-} en comparación con COB *Igfbp2*^{+/+} (Fig. 5c). Además, pSer473-Akt se intensificó en COB *Igfbp2*^{-/-}, tratados con PEG-HBD vs los controles tratados con PBS (Fig. 5d). Estos datos indican que IGFBP-2 mejora la activación de Akt estimulada por IGF-1 mediante la supresión de la expresión de PTEN en parte a través de HBD.

El dominio de unión a heparina de IGFBP-2 estimula la acumulación de β -catenina citosólica inducida por IGF-1 y la fosforilación de Ser552 de β -catenina. Varias líneas de evidencia demuestran la diafonía entre la señalización de IGF-1 y la señalización de β -catenina en líneas de células tumorales²⁴⁻²⁷. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que la señalización de IGF-1 estimulaba la señalización de β -catenina y de que el HBD-péptido podría mejorar la señalización de β -catenina mediante la supresión de la expresión de PTEN en las células osteoblásticas. Los análisis se llevaron a cabo primero para determinar si IGF-1 afecta a la acumulación de β -catenina en el citosol de las células osteoblásticas. El análisis de transferencia Western reveló que el IGF-1 reduce la expresión de β -catenina unida a la membrana y aumenta la acumulación citosólica de β -catenina en las células MC3T3-E1 (Fig. 6a). Además, la acumulación citosólica de β -catenina en respuesta a IGF-1 estaba intensificada en COB *Igfbp2*^{-/-} tratados con PEG-HBD en comparación con las células de control tratadas con PBS (Fig. 6B). Esto sugiere que el HBD-péptido está implicado en la señalización de IGF-1/ β -catenina, posiblemente, por la supresión de la expresión de PTEN. Se ha demostrado que la fosforilación de la serina 552 (Ser552) de la β -catenina, que puede ser inducida por Akt es importante para la disociación de la β -catenina de la membrana y la re-localización en el citoplasma y el núcleo²⁸⁻³⁰. Basándose en esta observación, se realizaron estudios para determinar si IGF-1 estimulaba la fosforilación de Ser552 en la β -catenina y si el HBD-péptido facilitaba esta respuesta en las células osteoblásticas. Como se muestra en la Fig. 5c y d, el IGF-1 estimulaba la fosforilación de β -catenina en Ser552, y esta respuesta se potenciaba en las células tratadas con PEG-HBD. Debido a que la activación de la β -catenina es importante para la formación de hueso, el efecto osteogénico del HBD-péptido podría estar mediado por la señalización de IGF-1/ β -catenina en los osteoblastos.

Este estudio proporciona evidencia de que el dominio de unión a heparina de IGFBP-2 puede ser crítico para las acciones anabólicas de IGFBP-2 sobre el hueso. La determinación de que el HBD suprime la expresión de PTEN en los osteoblastos proporciona un mecanismo por medio del cual la IGFBP-2 podría regular el destino de la célula. Sin embargo, la clasificación de las actividades dependientes e independientes de IGF-1 de la IGFBP-2 intacta es un reto. La señalización de IGF-1 es un requisito previo para la adquisición de esqueleto y la modulación de esta vía de señalización da como resultado alteraciones en la homeostasis esquelética^{17,34-40}. Por lo tanto, un efecto anabólico de HBD sobre el esqueleto podría, en parte, estar mediado por la mejora de la activación inducida por IGF-1 de la vía PI3K/Akt como resultado de la supresión de PTEN. Además, el aumento en el número de osteoblastos en ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con HBD también podría ser debido a este cambio mecanicista puesto que la señalización PI3K/Akt mejorada en osteoblastos está implicada en la proliferación celular. De hecho, Liu et al. demostraron que la pérdida de PTEN en los osteoblastos *in vivo* daba como resultado una masa ósea muy elevada y un aumento del número de osteoblastos¹⁷.

Aunque el HBD rescató el bajo número de osteoblastos en ratones *Igfbp2*^{-/-}, el número de osteoclastos se vio disminuido aún más mediante la administración de HBD. Esta observación es compatible con el aumento observado en la masa ósea, pero sugiere que el recambio óseo no es acelerado por tratamiento con HBD. De hecho, la tasa de aposición mineral y la tasa de formación ósea mostraron cambios mínimos en los ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con HBD. En contraste con el HBD, se ha demostrado que la señalización de IGF-1 estimula directamente la osteoclastogénesis, y los datos anteriores sugieren que se requieren niveles fisiológicos de IGFBP-2 en el microambiente óseo para la osteoclastogénesis⁴¹. Es posible que la IGFBP-2 actúe manteniendo las concentraciones de IGF-1 dentro del nicho pericelular pero que el HBD, que carece del dominio de unión de IGF-1, pueda jugar un papel distinto mediante la inhibición de la resorción ósea cuando se administran concentraciones suprafisiológicas. Dado que el HBD no suprime directamente la diferenciación de osteoclastos *in vitro*, el mecanismo subyacente mediante el cual el HBD disminuye la resorción ósea es probablemente indirecto y debido a la disminución de la expresión de *RANKL* en los osteoblastos. La expresión de *RANKL* está regulada por numerosos factores, incluyendo la vía de señalización Wnt/ β -catenina⁴². Glass et al. informaron de que los ratones que expresan la forma estabilizada de la β -catenina mostraban un aumento del volumen de hueso trabecular con una reducción en el número de osteoclastos causada principalmente por un aumento de la proporción de *OpglRankl*⁴³. En consonancia con esto, la supresión selectiva de β -catenina en osteoblastos dio como resultado una baja masa ósea con un aumento de la resorción ósea⁴³. Por lo tanto, la estabilización de la β -catenina en osteoblastos aumenta la masa ósea no sólo mediante el aumento de la activación mediada por Wnt, sino también a través de la supresión de la resorción ósea.

Se ha demostrado que una reducción en la expresión de PTEN está asociada con un aumento de la β -catenina en la señalización. Se ha propuesto que la inactivación de GSK3 (glucógeno sintasa quinasa 3) por Akt es la vía clave por el cual la activación de Akt mejora la estabilización de β -catenina, mientras que varias líneas de evidencia demuestran el importante papel de la fosforilación de Ser 552 en la activación de β -catenina²⁸⁻³⁰. La β -catenina es fosforilada directamente por Akt y la fosforilación de Ser552 es importante para la acumulación citosólica y nuclear de β -catenina, dando como resultado el aumento de la actividad transcripcional de la β -catenina²⁸. He et al informaron de que la pérdida de PTEN producía un exceso de células madre intestinales mediante la estimulación de la actividad de la β -catenina, en parte a través de la fosforilación de Ser 552²⁹. El estudio actual demostró que el

IGF-1 aumentaba la acumulación de β -catenina en el citoplasma y fosforilaba la ser552 de la β -catenina en las células osteoblásticas, y esta respuesta se veía reforzada por el HBD. En conjunto, estas líneas de evidencia sugieren que la activación mejorada de la señalización de β -catenina puede contribuir tanto al aumento de la formación de hueso como a la disminución de la resorción ósea en ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PEG-HBD.

En ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PEG-HBD, el número de osteoblastos se incrementó y esto estuvo acompañado de la reducción del número de adipocitos en la médula. La asignación de células mesenquimales es una etapa importante en la regulación de la masa ósea y la adiposidad de la médula. Numerosos factores están involucrados en este proceso, incluyendo la señalización de Wnt/ β -catenina y el factor de transcripción, PPAR-gamma⁴⁴. La activación de la señalización de Wnt/ β -catenina favorece osteoblastogénesis sobre la adipogénesis en parte por el secuestro de PPAR-gamma o por la supresión de la actividad transcripcional de PPAR-gamma⁴⁵⁻⁴⁷. Debido a que HBD mejora la estabilidad de la β -catenina que es inducida por IGF-1, el cambio de las células mesenquimales hacia el linaje osteogénico podría explicar el aumento de osteoblastos y la reducción de adipocitos en la médula ósea de ratones *Igfbp2*^{-/-} tratados con PEG-HBD.

Sin embargo, el mecanismo por el cual el HBD suprime la expresión de PTEN no se ha definido. Una posibilidad reside en la unión de HBD con el receptor de la integrina. Maile et al. informaron de que el dominio de unión a heparina de la vitronectina se unía a una región del bucle de cisteína de la integrina $\beta 3$ y modulaba la señalización de la integrina $\alpha V \beta 3$ en las células de músculo liso⁴⁸. Además, Perks et al. informaron de que la regulación a la baja de PTEN por IGFBP-2 podría estar mediada por un receptor de integrina, a pesar de que no demostraron una interacción entre la IGFBP-2 y un receptor de integrina específico ni que el HBD estuviera implicado en esta interacción²⁰.

La presencia de un motivo de secuencia RGD en el extremo C de IGFBP-2 ha llevado a la especulación de que IGFBP-2 podría unirse a una integrina, independientemente de su unión a IGF³. Schutt et al. informaron de que la unión de IGFBP-2 a la superficie celular estaba mediada por la integrina $\alpha 5 \beta 1$, y bloqueada por un péptido que contenía RGD en líneas celulares de sarcoma de Ewing y cáncer de mama⁴⁹. Wang et al. también demostraron que IGFBP-2 interactuaba con la integrina $\alpha 5$ a través de un motivo RGD en una línea celular de glioblastoma humano⁵⁰. En contraste con estos informes, Russo et al. y Pereira et al. informaron independientemente de que la unión de IGFBP-2 a la matriz extracelular fuera independiente de las secuencias de RGD en células de neuroblastoma y células de cáncer de mama. Además, Hoeflich et al. demostraron que el motivo RGD no está involucrado en la unión de IGFBP-2 a la membrana plasmática en múltiples órganos⁵¹. Por lo tanto, el papel funcional del motivo RGD en ratones *Igfbp2*^{-/-} sigue siendo controvertido y se necesitan más estudios.

No se pueden utilizar los resultados que emplean una concentración suprafisiológica de HBD para llegar a una conclusión definitiva con respecto a la función de las concentraciones fisiológicas de IGFBP-2 en la adquisición de hueso. Sin embargo, sí sugieren que esta proteína de unión tiene propiedades únicas que podrían explicar los altos niveles circulantes de IGFBP-2 durante períodos de crecimiento rápido tales como el primer año de vida y durante la pubertad. En resumen, estos estudios muestran que el HBD en IGFBP-2 tiene un efecto anabólico sobre el esqueleto y este efecto está mediado en parte por la supresión de la expresión de PTEN e implica la activación de la señalización de β -catenina. Estas líneas de evidencia proporcionan nuevos conocimientos sobre el papel fisiológico de la IGFBP-2 en el hueso y sugieren que una pequeña molécula tal como el HBD-péptido podría tener potencial como intervención farmacológica para el tratamiento de la osteoporosis.

Referencias para el Ejemplo 8

1. Hwa, V., Oh, Y. & Rosenfeld, R.G. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20, 761-87 (1999).
2. Jones, J.I. & Clemmons, D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16, 3-34 (1995).
3. Firth, S.M. & Baxter, R.C. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 23, 824-54 (2002).
4. Hu, D. et al. Serum insulin-like growth factor-1 binding proteins 1 and 2 and mortality in older adults: the Health, Aging, and Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc* 57, 1213-8 (2009).
5. Hedbacker, K. et al. Antidiabetic effects of IGFBP2, a leptin-regulated gene. *Cell Metab* 11, 11-22.
6. Wheatcroft, S.B. et al. IGF-binding protein-2 protects against the development of obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 285-94 (2007).
7. Hoeflich, A. et al. Growth inhibition in giant growth hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2. *Endocrinology* 142, 1889-98 (2001).

8. Conover, C.A. et al. Subcutaneous administration of insulin-like growth factor (IGF)-II/IGF binding protein-2 complex stimulates bone formation and prevents loss of bone mineral density in a rat model of disuse osteoporosis. *Growth Horm IGF Res* 12, 178-83 (2002).
- 5 9. Khosla, S. et al. Insulin-like growth factor system abnormalities in hepatitis C-associated osteosclerosis. Potential insights into increasing bone mass in adults. *J Clin Invest* 101, 2165-73 (1998).
10. DeMambro, V.E. et al. Gender-specific changes in bone turnover and skeletal architecture in igfbp-2-null mice. *Endocrinology* 149, 2051-61 (2008).
11. Arai, T., Busby, W., Jr. & Clemmons, D.R. Binding of insulin-like growth factor (IGF) I or II to IGF-binding protein-2 enables it to bind to heparin and extracellular matrix. *Endocrinology* 137, 4571-5 (1996).
- 10 12. Russo, V.C., Bach, L.A., Fosang, A.J., Baker, N.L. & Werther, G.A. Insulin-like growth factor binding protein-2 binds to cell surface proteoglycans in the rat brain olfactory bulb. *Endocrinology* 138, 4858-67 (1997).
- 15 13. Russo, V.C., Rekaris, G., Baker, N.L., Bach, L.A. & Werther, G.A. Basic fibroblast growth factor induces proteolysis of secreted and cell membrane-associated insulin-like growth factor binding protein-2 in human neuroblastoma cells. *Endocrinology* 140, 3082-90 (1999).
14. Russo, V.C. et al. Insulin-like growth factor binding protein-2 binding to extracellular matrix plays a critical role in neuroblastoma cell proliferation, migration, and invasion. *Endocrinology* 146, 4445-55 (2005).
15. Duan, C., Ding, J., Li, Q., Tsai, W. & Pozios, K. Insulin-like growth factor binding protein 2 is a growth inhibitory protein conserved in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15274-9 (1999).
- 20 16. Kawai, M. & Rosen, C.J. Insulin-like growth factor-I and bone: lessons from mice and men. *Pediatr Nephrol* 24, 1277-85 (2009).
17. Liu, X. et al. Lifelong accumulation of bone in mice lacking Pten in osteoblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 2259-64 (2007).
- 25 18. Cohen, P. et al. Elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 in the serum of prostate cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 76, 1031-5 (1993).
19. Mehrian-Shai, R. et al. Insulin growth factor-binding protein 2 is a candidate biomarker for PTEN status and PI3K/Akt pathway activation in glioblastoma and prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 5563-8 (2007).
- 30 20. Perks, C.M., Vernon, E.G., Rosendahl, A.H., Tonge, D. & Holly, J.M. IGF-1I and IGFBP-2 differentially regulate PTEN in human breast cancer cells. *Oncogene* 26, 5966-72 (2007).
21. Levitt, R.J., Georgescu, M.M. & Pollak, M. PTEN-induction in U251 glioma cells decreases the expression of insulin-like growth factor binding protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 1056-61 (2005).
22. Sakata, T. et al. Skeletal unloading induces resistance to insulin-like growth factor-I (IGF-1) by inhibiting activation of the IGF-1 signaling pathways. *J Bone Miner Res* 19, 436-46 (2004).
- 35 23. Shoba, L.N. & Lee, J.C. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase and p70S6 kinase blocks osteogenic protein-1 induction of alkaline phosphatase activity in fetal rat calvaria cells. *J Cell Biochem* 88, 1247-55 (2003).
24. Jin, T., George Fantus, I. & Sun, J. Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. *Cell Signal* 20, 1697-704 (2008).
- 40 25. Desbois-Mouthon, C. et al. Insulin and IGF-1 stimulate the beta-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3beta inhibition and Ras activation. *Oncogene* 20, 252-9 (2001).
26. Playford, M.P., Bicknell, D., Bodmer, W.F. & Macaulay, V.M. Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12103-8 (2000).
- 45 27. Amin, S. et al. High serum IGFBP-2 is predictive of increased bone turnover in aging men and women. *J Bone Miner Res* 22, 799-807 (2007).
28. Fang, D. et al. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *JBiol Chem* 282, 11221-9 (2007).
29. He, X.C. et al. PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet* 39, 189-98 (2007).

30. Taurin, S., Sandbo, N., Qin, Y., Browning, D. & Dulin, N.O. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 281, 9971-6 (2006).
31. Glass, D.A., 2nd & Karsenty, G. Molecular bases of the regulation of bone remodeling by the canonical Wnt signaling pathway. *Curr Top Dev Biol* 73, 43-84 (2006).
- 5 32. Eckstein, F. et al. Insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) overexpression negatively regulates bone size and mass, but not density, in the absence and presence of growth hormone/IGF-1 excess in transgenic mice. *Anat Embryol (Berl)* 206, 139-48 (2002).
33. Palermo, C. et al. Potentiating role of IGFBP-2 on IGF-1-stimulated alkaline phosphatase activity in differentiating osteoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E648-57 (2004).
- 10 34. Fujita, T. et al. Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. *J Cell Biol* 166, 85-95 (2004).
35. Peng, X.D. et al. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev* 17, 1352-65 (2003).
- 15 36. Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J. & Efstratiadis, A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59-72 (1993).
37. Yakar, S. et al. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 110, 771-81 (2002).
38. Zhang, M. et al. Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *J Biol Chem* 277, 44005-12 (2002).
- 20 39. Zhao, G. et al. Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology* 141, 2674-82 (2000).
40. Mukherjee, A. & Rotwein, P. Akt promotes BMP2-mediated osteoblast differentiation and bone development. *J Cell Sci* 122, 716-26 (2009).
- 25 41. Wang, Y. et al. Role of IGF-1 signaling in regulating osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 21, 1350-8 (2006).
42. Kearns, A.E., Khosla, S. & Kostenuik, P.J. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 29, 155-92 (2008).
- 30 43. Glass, D.A., 2nd et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 8, 751-64 (2005).
44. Gesta, S., Tseng, Y.H. & Kahn, C.R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131, 242-56 (2007).
45. Liu, J., Wang, H., Zuo, Y. & Farmer, S.R. Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin. *Mol Cell Biol* 26, 5827-37 (2006).
- 35 46. Bennett, C.N. et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 3324-9 (2005).
47. Ross, S.E. et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289, 950-3 (2000).
48. Maile, L.A. et al. Modulation of integrin antagonist signaling by ligand binding of the heparin-binding domain of vitronectin to the alphaVbeta3 integrin. *J Cell Biochem* 105, 437-46 (2008).
- 40 49. Schutt, B.S., Langkamp, M., Rauschnabel, U., Ranke, M.B. & Elmlinger, M.W. Integrin-mediated action of insulin-like growth factor binding protein-2 in tumor cells. *J Mol Endocrinol* 32, 859-68 (2004).
50. Wang, G.K., Hu, L., Fuller, G.N. & Zhang, W. An interaction between insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP2) and integrin alpha5 is essential for IGFBP2-induced cell mobility. *J Biol Chem* 281, 14085-91 (2006).
- 45 51. Hoeflich, A. et al. Mutation of the RGD sequence does not affect plasma membrane association and growth inhibitory effects of elevated IGFBP-2 in vivo. *FEBS Lett* 523, 63-7 (2002).

52. Wood, T.L., Rogler, L.E., Czick, M.E., Schuller, A.G. & Pintar, J.E. Selective alterations in organ sizes in mice with a targeted disruption of the insulin-like growth factor binding protein-2 gene. *Mol Endocrinol* 14, 1472-82 (2000).

53. Rosen, C.J. et al. Congenic mice with low serum IGF-1 have increased body fat, reduced bone mineral density, and an altered osteoblast differentiation program. *Bone* 35, 1046-58 (2004).

54. Mukherjee, A. & Rotwein, P. Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits osteoblast differentiation and skeletal growth by blocking insulin-like growth factor actions. *Mol Endocrinol* 22, 1238-50 (2008).

55. Kawai, M. et al. Growth hormone stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells through activation of the Stat5A/5B-PPARgamma pathway. *J Mol Endocrinol* 38, 19-34 (2007).

Ejemplo 9

Eficacia del péptido en la inhibición de la acumulación de grasa.

Una variedad de datos de la bibliografía respaldan que la IGFBP-2 inhibe la acumulación de grasa. Estos datos incluyen estudios en los que se sobreexpresa IGFBP-2 en ratones; es decir se crearon ratones transgénicos que producían excesiva IGFBP-2. Estos animales presentaban una disminución de la masa grasa. De manera importante, cuando fueron alimentados con una dieta con alto contenido de grasa que normalmente induce intolerancia a la glucosa, mantenían la tolerancia normal a la glucosa en comparación con los ratones control que fueron alimentados con la misma dieta con alto contenido de grasa y desarrollaron hiperglucemia. Esto sugiere que IGFBP-2 protege contra la resistencia a la insulina. Por el contrario los ratones en los que se ha eliminado el gen de IGFBP-2 tenían el fenotipo opuesto; es decir eran significativamente más gordos que los ratones de control. Después de 24 semanas, los ratones con el gen IGFBP-2 inactivado pesaban $37 \pm 1,5$ g mientras que los animales de control pesaban $32 \pm 1,3$ g. Después de 52 semanas se mantuvo esta diferencia. Esta es una diferencia altamente significativa en el peso corporal total. De manera más importante aún, cuando se analizó la masa de grasa mediante escaneo DEXA casi toda la diferencia en el peso corporal era debida a una diferencia en la masa de grasa. A las 26 semanas, el porcentaje de grasa corporal en los ratones de control fue de $16,1 \pm 1,4\%$ de grasa, mientras que en los ratones con el gen desactivado era de $24,2 \pm 1,1\%$. De nuevo, esta es una diferencia muy significativa e indica que gran parte de la diferencia de peso era debida a una diferencia en la grasa. Los ensayos de tolerancia a la glucosa mostraron que los ratones con supresión del gen IGFBP-2 tenían intolerancia a la glucosa y eran menos sensibles a la administración de insulina. Esto indica que el aumento de la masa grasa causaba una mayor resistencia a la hormona insulina. Los niveles de insulina en sangre fueron mayores en los ratones con el gen IGFBP-2 inactivado demostrando que tenían resistencia a la insulina que daba lugar a concentraciones de insulina en suero elevadas. Otros han demostrado que es un factor de riesgo importante para la enfermedad cardiovascular.

Se han llevado a cabo otros experimentos en los que se ha administrado a ratones con el gen desactivado y a los animales de control el homólogo de ratón del péptido de unión a heparina. El péptido se administró a 8 animales en cada grupo. Los datos de tratamiento de 6 semanas se proporcionan en la Tabla 2. Los animales con el gen desactivado pesaban $30,4 \pm 1,5$ g mientras que los animales de control pesaban $25,2 \pm 1,1$ g. Los animales con el gen desactivado que recibieron el péptido activo pesaban $24,9 \pm 1,3$ g. Esto indicaba claramente que la administración del péptido que se había suministrado a una dosis de 50 mcg administró por vía intraperitoneal tres veces por semana era eficaz en la prevención de la ganancia de peso. De manera más importante aún, cuando la masa grasa absoluta fue analizada por resonancia magnética, también se encontraron diferencias altamente significativas. Los ratones con el gen desactivado tenían $6,21 \pm 0,76$ gramos de grasa. Los ratones de control tenían $3,82 \pm 0,67$ gramos y los ratones con el gen desactivado a los que se había administrado el péptido de unión a heparina tenían $3,67 \pm 0,36$ gramos. Una vez más se trata de diferencias altamente significativas. Los ensayos de tolerancia a la glucosa también se llevaron a cabo en estos animales y demostraron que los animales con el gen desactivado presentaban una tolerancia a la glucosa deteriorada y esto mejoraba significativamente con la administración del péptido y sin una diferencia significativa con los ratones de control.

Ejemplo 10

La delección global de IGFBP-2 interrumpe la hematopoyesis y compromete el injerto de médula ósea en ratones irradiados letalmente.

Se llevaron a cabo estudios para determinar si la delección global de IGFBP2 (BP2) podría alterar la hematopoyesis en estado estacionario e interferir en el injerto de células de donante de médula ósea. Primero se analizaron células de sangre periférica y de bazo de ratones macho (M) y hembra (F) WT y By2 -/- por medio de citometría de flujo para determinar las principales poblaciones de glóbulos blancos (WBC). En la sangre periférica, los ratones BP2 -/-F tenían significativamente menos células T CD3+ en comparación con WT-F y BP2 -/-M ($p = 0,02$), mientras que BP2 -/-M tenían significativamente más células T CD3+ ($p = 0,03$), células B CD19+ ($p = 0,00$), macrófagos F480+ ($p = 0,00$), monocitos CD11b+ ($p = 0,00$) y neutrófilos LY6G+ ($p = 0,02$) en comparación con WT-M y BP2-/- F. La inyección intraperitoneal de péptido de unión de dominio de unión a heparina (HBD) de IGFBP-2 redujo el porcentaje de macrófagos ($p = 0,01$) y neutrófilos ($p = 0,02$) en la sangre periférica de BP2-/-M en comparación con los controles a los que se había inyectado PBS. Las células T CD3+ esplénicas de BP2-/-F aumentaron ($p = 0,0$) y las

células B CD19+ se redujeron ($p = 0,05$) en comparación con WT-F, WT-M y BP2-M. Hubo un aumento significativo en las células progenitoras de células B B220+ en el bazo de BP2-/-M en comparación con WT-M pero no hubo diferencia en los porcentajes de todas las demás poblaciones de WBC maduros. Se llevaron a cabo trasplantes de médula ósea en receptores macho WT y BP2-/- macho letalmente irradiados. En los trasplantes no competitivos, la eficacia del injerto de donante fue la misma para ambas cepas ya que $\geq 75\%$ de las células de repoblación tanto en WT como en BP2-/- tenían su origen en el donante (Ly5.1 +). En los trasplantes de repoblación competitivos, se mezclaron células de donante de apoyo de ratones Ly5.1+ con células de donante competidor, ya sea de WT o de BP2-/- en proporciones de 2:3 y 1:3 y se trasplantaron a receptores específicos de las cepas. A las 8 semanas del trasplante, los receptores WT en los que 2/3 de las células del donante eran WT (Ly5.2+), 75% de las células de médula ósea eran de origen WT (Ly5.2+), mientras que en los receptores BP2 -/- en los que 2/3 de las células del donante eran de BP2-/- (Ly5.2 +) solamente 56% de las células de médula ósea eran Ly5.2+ a las 8 semanas del trasplante representando un 20% menos ($p = 0,01$) de injerto de células de donante BP2-/- en comparación con WT. Estos datos confirman que IGFBP2 puede ser un importante regulador del nicho de células madre hematopoyéticas.

Ejemplo 11

La IGFBP-2 de células estromales mesenquimales (MSC) en el nicho de médula ósea regula la proliferación de células madre hematopoyéticas y el injerto de médula ósea.

La IGFBP2 (BP2) es una de las 6 proteínas de unión a IGF que transportan los IGF a sus respectivos receptores. Se ha demostrado que PTH induce la síntesis de IGFBP-2 en osteoblastos de bóveda craneal y la delección global de BP2 produce bazos pequeños, una formación de hueso muy baja, un deterioro de la resorción ósea y un aumento de la adiposidad ósea. *In vitro*, la médula ósea de ratones BP2-/- muestra un deterioro del reclutamiento tanto de osteoblastos como de osteoclastos. Los machos con el gen BP2 inactivado también tienen un fenotipo hematopoyético en el que se encuentran mayores porcentajes de subpoblaciones linfoides y mieloides tanto en la sangre periférica como en bazo. Se realizaron estudios para determinar si BP2 ejerce un papel fundamental como factor de proliferación en el nicho de médula ósea. Utilizando ARN de células madre mesenquimales de ratón purificadas (Stem Cell Technologies), se determinó primero que los niveles de expresión génica de BP2 eran 6-8 veces mayores que en células B o T purificadas. Los trasplantes de médula ósea no competitivos (BMT) se llevaron a cabo mediante el trasplante de células de donante LY 5.1+ a receptores WT y bp2-/- letalmente irradiados. El injerto de donante no fue diferente entre las cepas como se muestra por más de 70% de células del donante presentes en la sangre periférica de los ratones receptores de ambas cepas. Sin embargo, en el trasplante de repoblación competitivo utilizando los mismos pares de cepa de donante-receptor, las células de donantes bp2-/- injertaron la médula ósea del receptor bp2-/- de una manera 30% menos eficaz ($P = 0,01$) que los trasplantes de WT. Además, hubo significativamente menos células linfoides (CD3, CD19) y mieloides (CD11b, LY6G y F480) maduras en la sangre periférica de los receptores bp2 -/- ($p \leq 0,05$). En respuesta a la administración de un solo componente de la molécula de IGFBP2, el dominio de unión a heparina (HBD), a ratones bp2 -/-, la masa ósea trabecular fue rescatada y número de osteoblastos aumentó. En gran medida, la administración *in vivo* del HBD suprimió los porcentajes de monocitos, macrófagos y neutrófilos maduros en la circulación periférica, en comparación con los encontrados en los ratones WT. Tomados en conjunto estos datos demuestran que BP2, que es sintetizado por las MSC e inducible por la PTH, es un potente regulador de la hematopoyesis y puede controlar específicamente el destino de las células madre de una manera independiente de la unión a IGF dentro del nicho de médula. La regulación del nicho por IGFBP2 puede ser terapéuticamente importante para el trasplante clínico de médula ósea que es actualmente la única opción de tratamiento para muchas enfermedades malignas hematológicas y de tejidos sólidos.

Ejemplo 12

Regulación de células madre hematopoyéticas por el dominio de unión a heparina de IGFBP-2

Se describen los siguientes estudios para determinar el papel de IGFBP-2, a través de su dominio de unión a heparina, en la mejora del éxito del trasplante de médula ósea mediante estimulación de la repoblación de médula ósea hematopoyética.

Razón fundamental. El trasplante de células madre hematopoyéticas se utiliza principalmente en el tratamiento de cánceres hematopoyéticos (leucemias y linfomas), después de la quimioterapia de alta dosis para tumores malignos no hematopoyéticos. También se utiliza para enfermedades que implican disfunción de médula ósea genética o adquirida, tal como anemia aplásica y enfermedades autoinmunitarias. Los resultados positivos del trasplante dependen de (1) la recuperación de un número suficiente de células madre hematopoyéticas (HSC) a partir de médula ósea del donante, sangre del cordón umbilical o sangre periférica y (2) el anidamiento celular exitoso de las HSC a la médula ósea del receptor¹. Se ha demostrado que IGFBP-2 es un factor necesario para la proliferación *in vitro* de células madre hematopoyéticas tanto humanas como murinas^{2,3}. De acuerdo con este resultado, se ha encontrado que la delección global de IGFBP-2 en ratones da como resultado una repoblación comprometida de la médula ósea después de la irradiación letal. Se ha sintetizado un péptido único para el dominio de unión a heparina (HBD) de IGFBP-2 y se ha demostrado que este péptido tiene la capacidad de aumentar el número de osteoblastos y de células del estroma de médula ósea *in vitro* y de mejorar la formación de hueso *in vivo* independientemente de la señalización de IGF. Estos estudios investigan el papel del HBD de IGFBP-2 en el trasplante de células madre

hematopoyéticas, un componente crítico de los regímenes terapéuticos contra el cáncer.

Trascendencia. El trasplante de médula ósea satisfactorio es una opción terapéutica importante para neoplasmas tanto hematológicos como de tejidos sólidos. Por ejemplo, un avance importante en el tratamiento del mieloma múltiple ha sido el trasplante de células madre hematopoyéticas de la médula ósea (HSC). La propagación de las HSC antes del trasplante aumenta la probabilidad de éxito del injerto y el restablecimiento de la hematopoyesis en estado estacionario⁴. Se ha demostrado que IGFBP-2 es un potente estímulo para la proliferación *in vitro* de células madre hematopoyéticas de ratón y humanas^{2,3}. Sin embargo, se desconoce el mecanismo responsable de este efecto. Estudios recientes han establecido la importancia de IGFBP-2 para el éxito del trasplante de médula ósea *in vivo*, así como su capacidad para estimular la diferenciación de células estromales mesenquimales (MSC). Los estudios descritos en la presente memoria tienen por objeto señalar las vías por las cuales IGFBP-2 aumenta la proliferación de HSC y aumenta la creación del nicho de células madre hematopoyéticas. Puesto que el trasplante de HSC se usa ampliamente como terapia para tumores malignos tanto hematopoyéticos como no hematopoyéticos, estos estudios deben tener amplias implicaciones terapéuticas.

Antecedentes. El potencial del nicho de células madre para responder al estrés y a las lesiones requiere no sólo HSC, sino también los osteoblastos que forman el hueso^{5,6}. La Proteína de Unión al Factor de crecimiento de tipo Insulínico 2 (IGFBP-2) es una de las seis proteínas de unión a IGF (IGFBP 1-6) que regula la biodisponibilidad de los factores de crecimiento proliferativo IGF-1 e IGF-11. Los estudios han establecido la importancia de IGFBP-2 en la regulación de la proliferación y la diferenciación de osteoblastos⁷. La evidencia preliminar sugiere que la IGFBP-2 puede actuar con independencia de IGF, pero los mecanismos que subyacen a estas acciones aún no se han investigado. Por ejemplo, la movilidad celular en el glioblastoma parece estar mediada por la unión de IGFBP-2 al receptor de integrina $\alpha 5$ a través del dominio Arg-Gly-Asp (RGD)⁸. Además, la escisión proteolítica de IGFBP2 produce fragmentos pequeños que incluyen el dominio de unión a heparina (HBD). Cuando el HBD se une a la matriz extracelular, puede estimular la proliferación y el comportamiento metastásico de las células de neuroblastoma⁹. Se ha sintetizado una molécula pequeña que contiene el HBD presente en la región conectora de IGFBP-2. De los dos HBD de esta molécula, el sintetizado es único para IGFBP-2 y no está representado en otras IGFBP. Este péptido se estudió para determinar su efecto sobre la proliferación de HSC, la migración, y el anidamiento de médula ósea con el objetivo final de definir la utilidad del HBD como un adyuvante para terapias de trasplante de HSC.

Datos en apoyo de la investigación propuesta. En el contexto de la formación de hueso, se investigaron las acciones independientes de IGF de la IGFBP-2 utilizando un péptido sintetizado del HBD contenido en la región conectora de IGFBP-2. Este péptido es distinto de las otras proteínas de unión a IGF. *In vitro*, el péptido HBD rescató el fenotipo de mineralización ósea baja de las células estromales de la médula ósea y los osteoblastos de bóveda craneal *Igfbp2*^{-/-} (Fig 10) y estimuló la expansión perióstica y el crecimiento en trasplantes *ex vivo* de metacarpianos *Igfbp2*^{-/-}. *In vivo*, el péptido HBD rescató el fenotipo de baja masa ósea de ratones *Igfbp2*^{-/-}, como se observa por aumento del número de osteoblastos, la masa ósea restaurada, y la mejora de la resistencia ósea (Fig 11).

Además de sus acciones sobre las células mesenquimales, se ha demostrado que la IGFBP-2 es un factor necesario para la proliferación *in vitro* de células madre hematopoyéticas murinas y humanas. La delección global de IGFBP-2 da como resultado una hematopoyesis alterada de tal manera que la sangre periférica y bazo de los ratones *Igfbp2*^{-/-} presentan un incremento significativo de linfocitos B y células de linaje mieloide. La administración *in vivo* del HBD redujo el número de células linfoides y células mieloides diferenciadas a los porcentajes de referencia de controles a los que se había inyectado PBS (Fig 12). Por otra parte, en los trasplantes de médula ósea por repoblación competitiva, células de donantes *Igfbp2*^{-/-} no lograron repoblar de manera eficaz la médula ósea de los receptores de la misma cepa (Fig 13).

Tomados en conjunto, estos hallazgos indican que HBD puede ser un componente importante de la señalización de IGFBP-2 para mejorar la proliferación celular y suprimir la diferenciación en HSC. Los estudios descritos en la presente memoria son para determinar si los efectos de promoción del crecimiento de IGFBP-2 sobre las HSC están mediados por el HBD y son independientes de las acciones de IGF-1.

Investigación del efecto del péptido del dominio de unión a heparina (HBD) de IGFBP-2 sobre la proliferación y la diferenciación de células madre hematopoyéticas *in vitro*.

Razón fundamental: El aumento del número de células madre hematopoyéticas a largo plazo (LT) en preparaciones de células de médula ósea del donante antes del trasplante de médula ósea mejora los resultados del trasplante. *In vitro*, IGFBP-2 actúa aumentando la proliferación de las HSC, pero el mecanismo subyacente a este efecto es desconocido. Se ha demostrado que la IGFBP-2 actúa de manera independiente de la señalización de IGF-1 a través de los dominios RGD y HBD. El uso de un péptido de HBD sintetizado único para IGFBP-2, se someterá a ensayo la capacidad del HBD para aumentar la proliferación de HSC humanas y murinas y mantener las HSC en un estado indiferenciado. Para delinear los efectos independientes IGFBP-2, se someterá a ensayo el HBD *in vitro* en HSC de ratón recogidas de ratones tanto *Igfbp2*^{-/-} como *Igfbp2*^{+/+}.

Diseño y Métodos: El ratón *Igfbp2*^{-/-} fue creado por el Dr. John Pintar en la década de los 90 y luego fue retrocruzado con B6 por el Dr. Terri Wood a principios de la década de los 2000. Estos ratones se obtuvieron del Dr.

Wood y continuaron siendo retrocruzados con C57BL6 en The Jackson Laboratory. El péptido HBD y el péptido control mezclado son proporcionados por David Clemmons, MD, de la UNC Chapel Hill. Para prolongar la corta semivida, el HBD se ha pegilado. Los experimentos *in vitro* han demostrado que el HBD y el HBD pegilado son idénticos en su capacidad para estimular la proliferación y la diferenciación de osteoblastos. Las HSC humanas aisladas de sangre del cordón umbilical se adquirirán de Stem cell Technologies y se cultivarán en medio para células madre Methocult, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células estromales de médula ósea murina (BMSC) se recuperarán de los fémures de ratones *Igfbp2*^{-/-} y *Igfbp2*^{+/+}. Las BMSC se teñirán con anticuerpos conjugados con fluorescencia y las HSC se aislarán utilizando el clasificador de células FACSAria. Las HSC se definirán como Lin⁻ CD34⁺ Sca-1⁺ Kit⁺ Flk-2⁻. Se cultivarán veinte HSC de cada cepa en medio libre de suero StemSpan (Stem Cell Technologies) con un suplemento de heparina, factor de células madre, trombopoyetina, y FGF-1, como se informó anteriormente⁹. Se añadirán HBD, IGFBP-2 completa, o péptido de control revuelto a los cultivos de células en concentraciones predeterminadas y durante el tiempo de exposición optimizado. En el día 10 del cultivo, se cuantificará la proliferación celular de los especímenes de ensayo y los controles mediante la absorción de H³ Timidina como recuento de la radiactividad por minuto utilizando el contador de centelleo líquido L56500. Los resultados se expresarán como el promedio de los ensayos por triplicado. Las células también serán analizadas por citometría de flujo para determinar los porcentajes de células madre hematopoyéticas a corto plazo (ST) y largo plazo (LT) que se define por CD34⁺ Sca-1⁺ Thy1.1^{+/lo} c-kit⁺ lin⁻ CD135⁻ Slamf1/CD150⁺ CD11b^{Lo} y CD34⁻ Sca-1⁺ Thy1.1^{+/lo} c-kit⁺ lin⁻ CD135⁻ Slamf1/CD150⁺, respectivamente. Para confirmar que las HSC permanecen indiferenciadas en el cultivo, también serán determinados los porcentajes de células diferenciadas por citometría de flujo utilizando anticuerpos para marcadores específicos del linaje incluyendo Ter119 (eritrocitos) LY6G (Gr-1, mielóide), CD3 (células T), CD19 (células B) y CD11b (Mac-1, macrófagos). Los porcentajes se basarán en la recogida de 20.000 eventos utilizando el citómetro de flujo FACSCalibur. Los experimentos de cultivo celular se repetirán tres veces. El análisis de varianza (ANOVA) se utilizó para evaluar las diferencias entre los grupos. El intervalo de confianza se establecerá en 95% (p = 0,05).

Investigación de si los efectos de HBD sobre las células madre hematopoyéticas son independientes de la señalización de IGF.

Razón fundamental. El IGF-1 es un promotor de crecimiento para células normales y malignas. Los niveles elevados de IGFBP-2 en suero se reconocen como un indicador de mal pronóstico en la enfermedad metastásica recurrente y en la leucemia mielóide aguda infantil después de un trasplante de células madre hematopoyéticas^{10,11}. Es, por lo tanto, importante determinar si los efectos de la IGFBP-2 sobre la expansión de las HSC *in vitro* son independientes de la señalización de IGF y si existe una sinergia entre el IGF y la IGFBP-2 con respecto a la señalización celular.

Diseño y Métodos: Las HSC se cultivarán a partir de células estromales de médula ósea murina, como se describe en la presente memoria. La señalización de IGF será inhibida por el bloqueo del receptor de IGF utilizando el anticuerpo alfa IR-3 en cultivos de HSC murinas. El anticuerpo alfa IR-3 utilizado en estos experimentos se ha publicado como bloqueador de la señalización de IGF en una variedad de tipos de células, incluyendo células madre hematopoyéticas murinas¹². En estos experimentos, se evaluará el bloqueo satisfactorio del receptor IGF mediante la adición de IGF 1 a cultivos de células y medición de la proliferación celular por medio de la absorción de H³ timidina. Tras la confirmación del bloqueo del receptor, se añadirán el HBD, el péptido revuelto y la IGFBP-2 completa a los cultivos de HSC, y se cuantificará la proliferación mediante la absorción de H³ Timidina. Los datos se analizarán por ANOVA como se describe en la presente memoria.

Investigación de qué eventos de señalización se inician en las células madre hematopoyéticas por el HBD de IGFBP-2.

Razón fundamental. Se ha demostrado que el HBD aumenta la proliferación de osteoblastos al disminuir la expresión de PTEN e incrementar la fosforilación de AKT. No se han determinado los mecanismos por los que la IGFBP-2 aumenta la proliferación de las HSC. Los osteoblastos y las células hematopoyéticas residen juntos en estrecha proximidad en la médula ósea, y muchas vías de señalización celular son comunes para los nichos tanto del hueso como hematopoyético. Para determinar los eventos de señalización activados por el HBD, se realizarán los perfiles de expresión génica sobre cultivos de células HSC con y sin el HBD, péptido revuelto, e IGFBP-2 completa. A través de las matrices de genes de PCR, se determinará la contribución de la proliferación celular y/o inhibición de la apoptosis a la expansión de las HSC.

Diseño y Métodos: Las HSC se expondrán a HBD, IGFBP-2 completa, y péptido revuelto, como se describe en la presente memoria. El ARN se extraerá de las HSC cultivadas el día 10 de cultivo. El ADNc se preparará usando el Kit RT2 First Strand (SABiosciences, Frederick, MD), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadirá una pequeña parte alícuota (es decir, 25 µl) del cóctel experimental que consiste en ADNc, Syber Green RT2 qPCR Master Mix (SABiosciences) a cada pocillo de la matriz de PCR en un formato de placa de 96 pocillos (SABiosciences). La amplificación por PCR se realizará utilizando el termociclador Bio-Rad iQ5 con los siguientes ajustes: un ciclo durante 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos cada uno a 95°C y 40 ciclos de un minuto cada uno a 60°C. Los valores de referencia y umbral se determinarán de forma manual. El $\Delta\Delta Ct$ (cambio de umbral delta) se calculará para cada gen usando el SABiosciences PCR Array Data Analysis Web Portal (<http://www.SABiosciences.com>). Una multiplicidad de cambio mayor de 1 entre el ΔCt experimental (cambio de umbral

delta) y el ΔCt del control se considerará regulación al alza del gen. Una multiplicidad de cambio de menos de 1 se considerará regulación a la baja de los genes. Los valores de Ct superiores a 35 se considerarán negativos. Se realizarán matrices de PCR para la apoptosis, las células madre hematopoyéticas y la hematopoyesis, y las rutas de señalización de PI3K-Akt, Wnt, MAP quinasa e insulina.

5 Investigación del efecto de HBD de IGFBP-2 sobre el trasplante de médula ósea *en vivo*.

Determinación de si las HSC se expanden *in vitro* utilizando el HBD de IGFBP-2 funcional en el trasplante de médula ósea.

10 Razón fundamental: Si bien es importante que las HSC permanezcan indiferenciadas antes del trasplante, el trasplante con éxito depende de un número suficiente de HSC que aniden en la médula ósea y se diferencien primero en células progenitoras y, finalmente, en eritrocitos y glóbulos blancos de la sangre maduros y funcionales. Se someterá a ensayo la capacidad de las HSC expandidas *in vitro* por el péptido HBD para repoblar la médula ósea y para mantener la hematopoyesis en estado estacionario al ser implantadas en ratones receptores irradiados letalmente.

15 Diseño y Métodos: Las HSC murinas recogidos de ratones *Igfbp2*^{+/+} y expandidas *in vitro* por el péptido HBD serán trasplantadas a ratones *Igfbp2*^{+/+}. Las HSC de sangre del cordón umbilical humano también expandidas por el péptido HBD serán trasplantadas a ratones con inmunodeficiencia combinada grave, diabéticos, no obesos (NOD/SCID), una cepa utilizada comúnmente para los estudios de trasplante de células de médula ósea humana. Los ratones receptores recibirán una dosis letal (10 Gy para IGFBP2^{+/+}) o una dosis subletal (3,5 Gy para NOD/SCID) de irradiación por exposición a una fuente de Cesio utilizando el irradiador JL Shepherd 143-45 en dos sesiones y con 4 horas entre sesiones. Las HSC humanas y murinas se expandirán en cultivo durante 10 días, se someterán a recuento y se resuspenderán en PBS a una concentración de 10×10^6 células/ml. Se transplantarán 30 μ L de HSC del donante al plexo retroorbital de los ratones receptores. A las 8 semanas del trasplante, se someterá a ensayo la sangre periférica de los ratones receptores para determinar el éxito de injerto de médula ósea mediante la determinación del porcentaje de células del donante murino Ly5.2⁺ y células de donantes humanos CD45/71⁺ por citometría de flujo en ratones *Igfbp2*^{+/+} y NOD/SCID respectivamente. La presencia de $\geq 80\%$ de células donantes será indicativa de éxito en el injerto. Los ratones receptores serán sacrificados a las 16 semanas del trasplante. Los porcentajes de las principales poblaciones de células de sangre se determinarán en la sangre periférica por citometría de flujo utilizando anticuerpos conjugados a Ter 119 (eritrocitos), LY6G (Gr-1, mielóide), CD3 (células T), CD19 (células B), y CD11b (Mac-1, macrófagos). Como ensayo funcional de éxito del injerto y evaluación del potencial de auto renovación de las HSC trasplantadas, se recogerán las células de la médula ósea de un fémur de ratones receptores a las 16 semanas del trasplante y se utilizarán como células del donante para un segundo conjunto de receptores de trasplante. Este segundo conjunto de receptores será controlado como se ha descrito para los trasplantes originales. Se transplantarán tres ratones para cada condición de ensayo y de control, y los trasplantes se realizarán en al menos 2 experimentos independientes para N = 6 para cada condición experimental. Se utilizará ANOVA para analizar las diferencias entre los grupos como se ha descrito anteriormente.

Investigación de si el HBD aumenta la eficacia de repoblación de la médula ósea después de la mieloablación en ratones *Igfbp2*^{-/-}.

40 Razón fundamental. Se ha demostrado que la delección global de la IGFBP-2 en receptores de médula ósea *Igfbp2*^{-/-}, no se opone éxito del injerto de células de donantes positivos para IGFBP-2. Sin embargo, como se observa en los experimentos de trasplante de repoblación competitivos, las células de donante de ratones *Igfbp2*^{-/-} injertan de una manera 30% menos eficaz en comparación con las células de donante *Igfbp2*^{+/+}. En conjunto, estos datos implican a IGFBP-2 como un importante regulador de anidamiento de las HSC en la médula ósea y un colaborador para establecer las HSC dentro del nicho de células madre hematopoyéticas. Ambos etapas son necesarias para el éxito del trasplante. El objetivo de estos experimentos es rescatar la disminución de la eficacia de injerto de las células de donantes *Igfbp2*^{-/-} por medio de la administración simultánea del péptido HBD a los receptores de trasplantes *Igfbp2*^{-/-}. Estos experimentos servirán como un ensayo funcional de la capacidad de HBD para mejorar el injerto de células de médula ósea.

50 Diseño y Métodos: Se utilizará el sistema del gen Ly5.1/Ly5.2 en los experimentos competitivos para repoblar la médula ósea y distinguir las células de la médula ósea injertada de donantes de las células de médula ósea endógena del receptor. Se utilizará la cepa de ratón B6.SJL-ptprc^apepc^b/ BoyJ (Ly5.1 positivo) como fuente de células de donante de médula ósea competidora. Todos los ratones receptores serán Ly5.2 positivo. Los ratones donantes y receptores serán macho y tendrán 8 semanas de edad en el momento del trasplante. Para obtener células de médula ósea de donantes, los ratones se sacrificarán y los fémures se recuperarán de forma aséptica. Se recogerán las células de médula ósea, se lavarán, y se resuspenderán en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de $0,3 \times 10^6$ células por 30 μ L de volumen de inyección. Para los trasplantes de repoblación competitivos, las células del donante Ly5.1⁺ se mezclarán con las células de donante Ly5.2⁺ (*igfbp2*^{-/-} o *igfbp2*^{+/+}) en proporciones 1:0 (células 100% de donante Ly5.1, control positivo), 1:3 y 1:6. Se añadirán el péptido HBD, el péptido revuelto, o IGFBP2 completa a preparaciones de células de donantes a una concentración optimizada en anteriores experimentos *in vivo* (50 μ g/30 μ L). Los ratones receptores se irradiarán letalmente y se transplantarán, como se describe en la presente memoria. A las 8 semanas del trasplante, se determinarán los

porcentajes de células de donante Ly5.1 positivas y Ly5.2 positivas injertadas en la sangre periférica por medio de citometría de flujo. Los receptores de trasplantes serán sacrificados a las 16 semanas del trasplante, y se analizarán las poblaciones de glóbulos blancos de la sangre por medio de citometría de flujo. Las HSC presentes en la médula ósea se cuantificarán y clasificarán por medio del clasificador de células FACSaria. Las células clasificadas se cultivarán y se determinará el número de unidades formadoras de colonias en un análisis de formación de colonias en cultivo de células convencional (Stem Cell Technologies). Además, se evaluará la funcionalidad de las HSC trasplantadas por medio de un segundo conjunto de trasplantes, que se realizará como se describe en la presente memoria. Se trasplantarán tres ratones para cada condición de ensayo y de control, y los trasplantes se realizarán en al menos 2 experimentos independientes para N = 6 para cada condición experimental. Se utilizará ANOVA para evaluar la significación estadística entre las medias del grupo receptores de ensayo (*igfbp2*^{-/-}) y de control (*igfbp2*^{+/+}). El intervalo de confianza se fijará en ≤0,05.

Lista de referencias para el Ejemplo 12

1. Jenq, R. R. & van den Brink, M. R. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 213-21.
2. Huynh, H. et al. Insulin-like growth factor-binding protein 2 secreted by a tumorigenic cell line supports ex vivo expansion of mouse hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 26, 1628-35 (2008).
3. Zhang, C. C., Kaba, M., Iizuka, S., Huynh, H. & Lodish, H. F. Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. *Blood* 111, 3415-23 (2008).
4. Pulte, D., Gondos, A. & Brenner, H. Trends in survival after diagnosis with hematologic malignancy in adolescence or young adulthood in the United States, 1981-2005. *Cancer* 115, 4973-9 (2009).
5. Calvi, L. M. et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-6 (2003).
6. Wilson, A. & Trumpp, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 6, 93-106 (2006).
7. DeMambro, V. E. et al. Gender-specific changes in bone turnover and skeletal architecture in *igfbp-2*-null mice. *Endocrinology* 149, 2051-61 (2008).
8. Song, S. W. et al. IGF-1, an insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) binding protein, antagonizes IGFBP-2 stimulation of glioma cell invasion: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13970-5 (2003).
9. Russo, V. C. et al. Insulin-like growth factor binding protein-2 binding to extracellular matrix plays a critical role in neuroblastoma cell proliferation, migration, and invasion. *Endocrinology* 146, 4445-55 (2005).
10. Dawczynski, K. et al. Elevated serum insulin-like growth factor binding protein-2 is associated with a high relapse risk after hematopoietic stem cell transplantation in childhood AML. *Bone Marrow Transplant* 37, 589-94 (2006).
11. Dawczynski, K., Kauf, E. & Zintl, F. Changes of serum growth factors (IGF-1, -II and IGFBP-2, -3) prior to and after stem cell transplantation in children with acute leukemia. *Bone Marrow Transplant* 32, 411-5 (2003).
12. Zia, F. et al. Monoclonal antibody alpha IR-3 inhibits non-small cell lung cancer growth in vitro and in vivo. *J Cell Biochem Suppl* 24, 269-75 (1996).
13. Frisch, B. J., Porter, R. L. & Calvi, L. M. Hematopoietic niche and bone meet. *Curr Opin Support Palliat Care* 2, 211-7 (2008).
14. Kuznetsov, S. A. et al. The interplay of osteogenesis and hematopoiesis: expression of a constitutively active PTH/PTHrP receptor in osteogenic cells perturbs the establishment of hematopoiesis in bone and of skeletal stem cells in the bone marrow. *J Cell Biol* 167, 1113-22 (2004).
15. Ballen, K. K.; King, R. J.; Chitphalcdithai, P.; Bolan, C. D., Jr.; Agura, E.; Hartzman, R. J.; Kernan, N. A., The national marrow donor program 20 years of unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008, 14, (9 Suppl), 2-7.
16. Bendall, S. C.; Stewart, M. H.; Menendez, P.; George, D.; Vijayaragavan, K.; Weibowetski-Ogilvie, T.; Ramos-Mejia, V.; Rouleau, A.; Yang, J.; Bosse, M.; Lajoie, G.; Bhatia, M., IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature* 2007, 448, (7157), 1015-21.
17. Bhattacharya, D.; Rossi, D. J.; Bryder, D.; Weissman, I. L., Purified hematopoietic stem cell engraftment of rare niches corrects severe lymphoid deficiencies without host conditioning. *J Exp Med* 2006, 203, (1), 73-85.
18. Clawson, T. F.; Lee, W. H.; Yoder, M. C., Differential expression of insulin-like growth factor binding proteins in murine hematopoietic stromal cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 1996, 120, (1), 59-66.

19. Czechowicz, A.; Kraft, D.; Weissman, I. L.; Bhattacharya, D., Efficient transplantation via antibody-based clearance of hematopoietic stem cell niches. *Science* 2007, 318, (5854), 1296-9.
20. Delaney, C.; Heimfeld, S.; Brashem-Stein, C.; Voorhies, H.; Manger, R. L.; Bernstein, I. D., Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med* 16, (2), 232-6.
- 5 21. Eminli, S.; Foudi, A.; Stadtfeld, M.; Maherali, N.; Ahfeldt, T.; Mostoslavsky, G.; Hock, H.; Hochedlinger, K., Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 2009, 41, (9), 968-76.
22. Forsberg, E. C.; Bhattacharya, D.; Weissman, I. L., Hematopoietic stem cells: expression profiling and beyond. *Stem Cell Rev* 2006, 2, (1), 23-30.
- 10 23. Frisch, B. J.; Porter, R. L.; Gigliotti, B. J.; Olm-Shipman, A. J.; Weber, J. M.; O'Keefe, R. J.; Jordan, C. T.; Calvi, L. M., In vivo prostaglandin E2 treatment alters the bone marrow microenvironment and preferentially expands short-term hematopoietic stem cells. *Blood* 2009, 114, (19), 4054-63.
24. Fu, P.; Thompson, J. A.; Bach, L. A., Promotion of cancer cell migration: an insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-6. *J Biol Chem* 2007, 282, (31), 22298-306.
- 15 25. Haug, J. S.; He, X. C.; Grindley, J. C.; Wunderlich, J. P.; Gaudenz, K.; Ross, J. T.; Paulson, A.; Wagner, K. P.; Xie, Y.; Zhu, R.; Yin, T.; Perry, J. M.; Hembree, M. J.; Redenbaugh, E. P.; Radice, G. L.; Seidel, C.; Li, L., N-cadherin expression level distinguishes reserved versus primed states of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2008, 2, (4), 367-79.
- 20 26. Hoefflich, A.; Reisinger, R.; Lahm, H.; Kiess, W.; Blum, W. F.; Kolb, H. J.; Weber, M. M.; Wolf, E., Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? *Cancer Res* 2001, 61, (24), 8601-10.

Lo anterior es ilustrativo de la presente invención, y no ha de interpretarse como limitante de la misma. La invención se define por las siguientes reivindicaciones, incluyendo la misma los equivalentes de las reivindicaciones.

TABLA 1.

Análisis microTC de fémures de IGFBP2 ^{+/+} y IGFBP2 ^{-/-} tratados con PBS o PEG-HBD-péptido			
	IGFBP2 ^{+/+} PBS N = 8	IGFBP2 ^{-/-} PBS N = 12	IGFBP2 ^{-/-} PEG-HBD N = 6
Apófisis media			
Grosor cortical	0,198 ± 0,007	0,197 ± 0,003	0,200 ± 0,006
Área de hueso	0,889 ± 0,047	0,868 ± 0,018	0,903 ± 0,024
Área total	1,970 ± 0,062	1,955 ± 0,036	2,076 ± 0,031 ^a
Área de hueso/área total	0,449 ± 0,011	0,444 ± 0,006	0,435 ± 0,014
Fémur distal			
Volumen de hueso/volumen total	0,143 ± 0,017	0,095 ± 0,007 ^b	0,125 ± 0,012 ^c
Número trabecular	4,86 ± 0,16	4,29 ± 0,09 ^b	4,47 ± 0,15
Grosor trabecular	0,047 ± 0,003	0,041 ± 0,001	0,048 ± 0,002 ^d
Separación trabecular	0,200 ± 0,007	0,230 ± 0,005 ^b	0,221 ± 0,008
PEG-HBD; dominio de unión a heparina pegilado Los valores se expresan como la media ± ETM. a; p < 0,05 vs IGFBP2 ^{-/-} con PBS b; p < 0,01 vs IGFBP2 ^{+/+} con PBS c; p < 0,05 vs IGFBP2 ^{-/-} con PBS d; p < 0,01 vs IGFBP2 ^{-/-} con PBS			

TABLA 2. El péptido de unión a heparina de IGFBP2-2 reduce la masa grasa

Grupo de tratamiento	Número de ratones	Peso corporal (g)	Masa Grasa (g)
IGFBP-2 -/- + placebo	8	30,4±1,5	6,21±0,76
IGFBP-2 -/- + HBD	8	24,9±1,3	3,67±0,36
IGFBP-2 +/+	8	25,2±1,1	3,82±0,67

TABLA 3

Composición corporal de ratones <i>lgfbp2</i> ^{-/-} antes del tratamiento con PBS o PEG-HBD.		
	<i>lgfbp2</i> ^{-/-} PBS	<i>lgfbp2</i> ^{-/-} PEG-HBD
BMD en todo el cuerpo	0,0378 ± 0,0009	0,0382 ± 0,0008
BMC en todo el cuerpo/peso corporal	0,0115 ± 0,0004	0,0119 ± 0,0006
% de grasa corporal	10,4 ± 0,52	9,8 ± 0,62
PEG-HBD; dominio de unión a heparina pegilado BMD; densidad mineral del hueso BMC; contenido mineral óseo BW; peso corporal		

5 TABLA 4

Composición corporal de ratones <i>lgfbp2</i> ^{-/-} después de tratamiento con PBS o PEG-HBD.		
	<i>lgfbp2</i> ^{-/-} PBS	<i>lgfbp2</i> ^{-/-} PEG-HBD
BMD en todo el cuerpo	0,0445 ± 0,0006	0,0459 ± 0,0004
BMC en todo el cuerpo/BW	0,0138 ± 0,0004	0,0147 ± 0,0005
% grasa corporal	10,4± 0,70	10,4 ± 1,02
Peso de la grasa epididimal/BW (mg/g)	12,2± 0,51	12,2± 0,67
PEG-HBD; dominio de unión a heparina pegilado DMO; densidad mineral del hueso BMC; contenido mineral óseo BW; peso corporal		

TABLA 5

Análisis microTC de las vértebras (L5) de IGFBP2 ^{+/+} e IGFBP2 ^{-/-} tratadas con PBS o PEG-HBD			
	IGFBP2 ^{+/+} PBS N = 7	IGFBP2 ^{-/-} PBS N = 9	IGFBP2 ^{-/-} PEG-HBD N = 6
Volumen de hueso/Volumen total	0,314 ± 0,020	0,278 ± 0,010	0,305 ± 0,012
Número trabecular	6,15 ± 0,36	5,77 ± 0,11	5,70 ± 0,10
Grosor trabecular	0,052 ± 0,002	0,049 ± 0,001	0,054 ± 0,002 ^a
Separación trabecular	0,155 ± 0,009	0,160 ± 0,004	0,161 ± 0,004
PEG-HBD; dominio de unión a heparina pegilado Los valores se expresan como la media ± ETM. a; p <0,05 vs IGFBP2 ^{-/-} con PBS			

TABLA 6

Análisis histomorfométrico de fémur de ratones IGFBP2 ^{-/-} tratados con PBS o PEG-HBD.		
	IGFBP2 ^{-/-} PBS N = 5	IGFBP2 ^{-/-} PEG-HBD N = 5
OS/BS (%)	2,38 ± 1,11	3,56 ± 0,44
ObS/BS (%)	11,5 ± 1,03	16,26 ± 1,42 ⁿ
Nob/BPm (/ mm)	12,31 ± 0,52	16,3 ± 1,4 ^A
ES/BS (%)	17,11 ± 0,93	14,79 ± 01,58
OcS/BS (%)	11,02 ± 0,87	9,14 ± 0,90
Noc/BPm (/ mm)	5,19 ± 0,37	4,37 ± 0,39
MAR (µm/día)	0,873 ± 0,0078	0,91 ± 0,0453
BFR/BSd (µm3/µm2/día)	0,0796 ± 0,0164	0,080 ± 0,0191
PEG-HBD; dominio de unión a heparina-pegilado, OS; superficie osteoide, BS; superficie del hueso, ObS; superficie de osteoblastos, Nob; número de osteoblastos, BPm; perímetro del hueso, ES; superficie de erosión, OcS; superficie de osteoclastos, Noc; número de osteoclastos, MAR; tasa de aposición mineral, BFR; tasa de formación de hueso Los valores se expresan como la media ± ETM a; p <0,05 vs IGFBP2^{-/-} con PBS		

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> University of North Carolina at Chapel Hill Maine Medical Center.
- 5 <120> Compuestos y métodos para tratar trastornos de los huesos y controlar el peso
- <130> 5470-528WO
- <140> EP107845143.9
- 10 <141> 04-06-2010
- <150> US 61/184,209
- <151> 04-06-2009
- 15 <160> 1
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 20 <211> 13
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 25 <223> IGFBP – 2 secuencia de péptido que contiene un dominio de unión a heparina
- <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | His | His | Leu | Gly | Leu | Glu | Glu | Pro | Lys | Lys | Leu | Arg |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | |

30

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos KHHGLGLEEPKKLR (SEQ ID NO: 1).
2. El péptido de la reivindicación 1, caracterizado por que comprende adicionalmente un radical de polietilenglicol (PEG) acoplado a cualquiera de los extremos N o C del mismo.
- 5 3. Una composición que comprende el péptido de una de las reivindicaciones 1 ó 2, combinado con un portador farmacéuticamente aceptable.
4. La composición de la reivindicación 3, caracterizada por que el portador se selecciona entre a) y b):
 - a) en donde dicho portador es un portador líquido; y
 - b) en donde dicho portador es un implante biomédico.
- 10 5. Una preparación combinada del péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5 y un inhibidor de la resorción ósea.
6. Una preparación combinada del péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4 y un agente de control del peso, opcionalmente en donde dicho agente de control del peso se selecciona del grupo que consiste en un supresor del apetito, un inhibidor de lipasa, un antidepresivo, un agente anti-convulsivo y cualquier combinación de los mismos.
- 15 7. El péptido de una de las reivindicaciones 1 ó 2, para su uso en terapia.
8. El péptido de una de las reivindicaciones 1 ó 2, para su uso en la mejora de la formación de hueso y la inhibición de la resorción ósea de forma simultánea.
9. El péptido de una de las reivindicaciones 1 ó 2, para su uso en la inducción del depósito y la maduración de hueso.
- 20 10. El péptido de una de las reivindicaciones 1 ó 2, para su uso en el tratamiento de una afección ósea comprometida.
11. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la afección ósea comprometida se encuentra en un sitio diana de un sujeto, opcionalmente en donde el sitio diana se selecciona del grupo que consiste en un espacio intervertebral, una articulación facetaria, un sitio de una fractura de hueso, un hueso de la boca, un hueso de la barbilla, un hueso de la mandíbula, un sitio de implante y cualquier combinación de los mismos.
- 25 12. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la afección ósea comprometida se selecciona del grupo que consiste en un hueso roto, un defecto óseo, un trasplante de hueso, un injerto de hueso, un cáncer de hueso, un reemplazo de una articulación, una reparación de las articulaciones, una fusión, una reparación de una faceta, una degeneración ósea, un implante dental, una reparación dental, un déficit de médula ósea y cualquier combinación de los mismos.
- 30 13. El péptido de una de las reivindicaciones 1 ó 2, para su uso en el control del peso corporal en un sujeto.
14. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho sujeto tiene un índice de masa corporal de al menos 25 a 30 kg/m².
- 35 15. El péptido de una de las reivindicaciones 1 ó 2, para su uso en la mejora de la reconstitución de la médula ósea en un sujeto que lo necesite.
16. El péptido para su uso de la reivindicación 15, en donde el sujeto se selecciona del grupo que consiste en: un sujeto que recibe o ha recibido quimioterapia, un sujeto que recibe o ha recibido radiación, un sujeto que tiene anemia aplásica, un sujeto que tiene mielodisplasia, y cualquier combinación de los mismos

40

TINCIÓN DE VON KOSSA

IGFBP2+/+

IGFBP2-/-



FIG. 1A

TINCIÓN ALP

IGFBP2+/+

IGFBP2-/-



FIG. 1B

COB

TINCIÓN ALP



CONTROL PEG-HBD

BMSC

TINCIÓN ROJO
ALIZARINA



CONTROL PEG-HBD

FIG. 1C

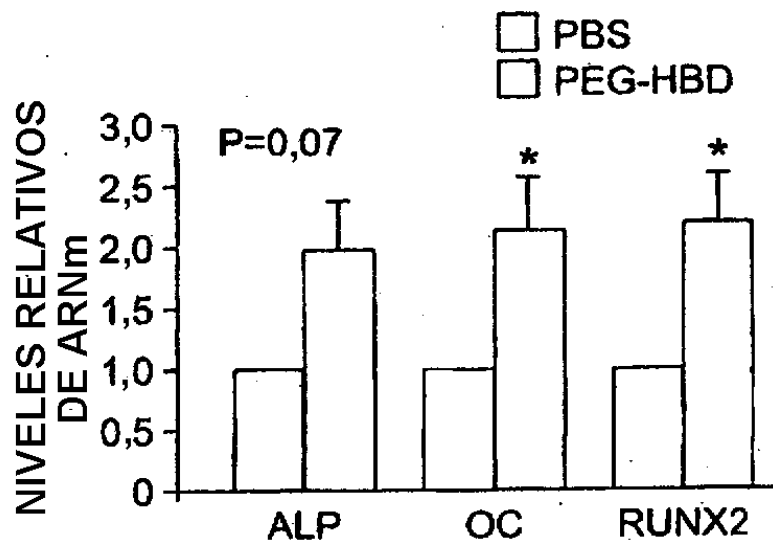


FIG. 1D

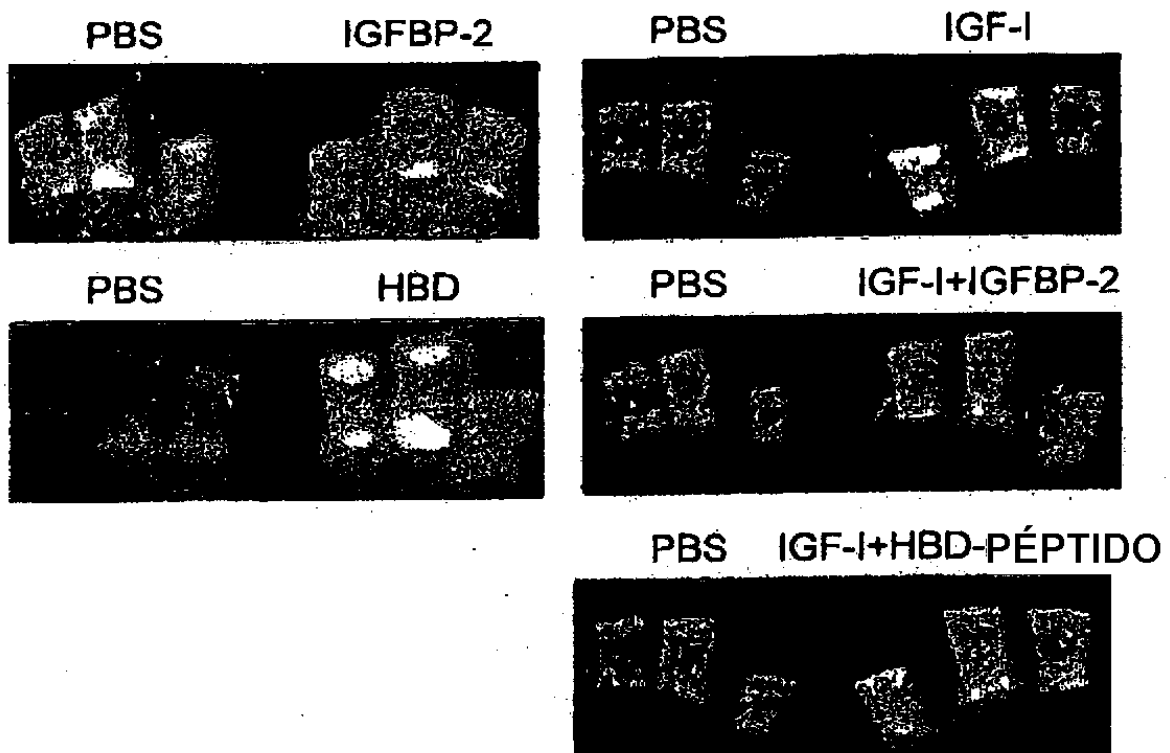


FIG. 2A

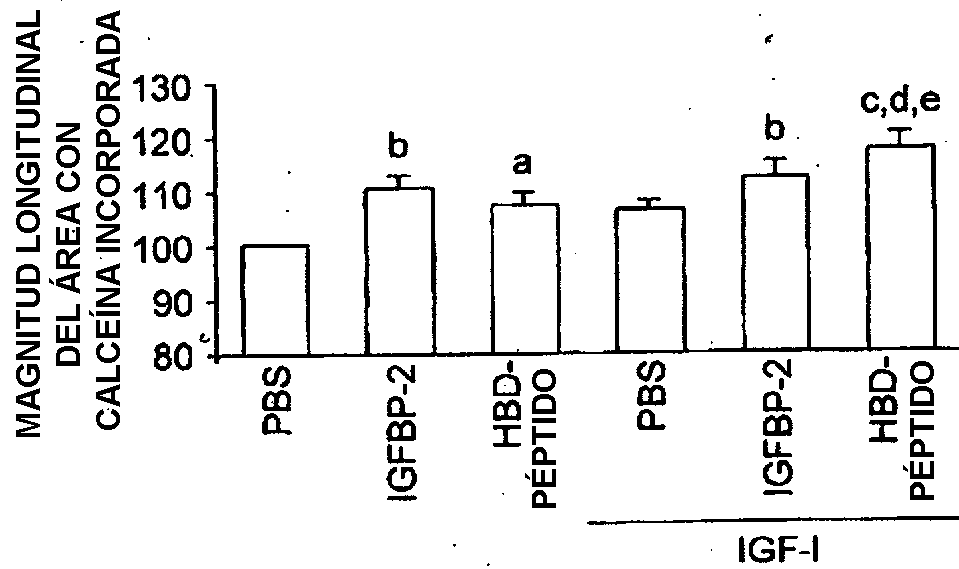


FIG. 2B

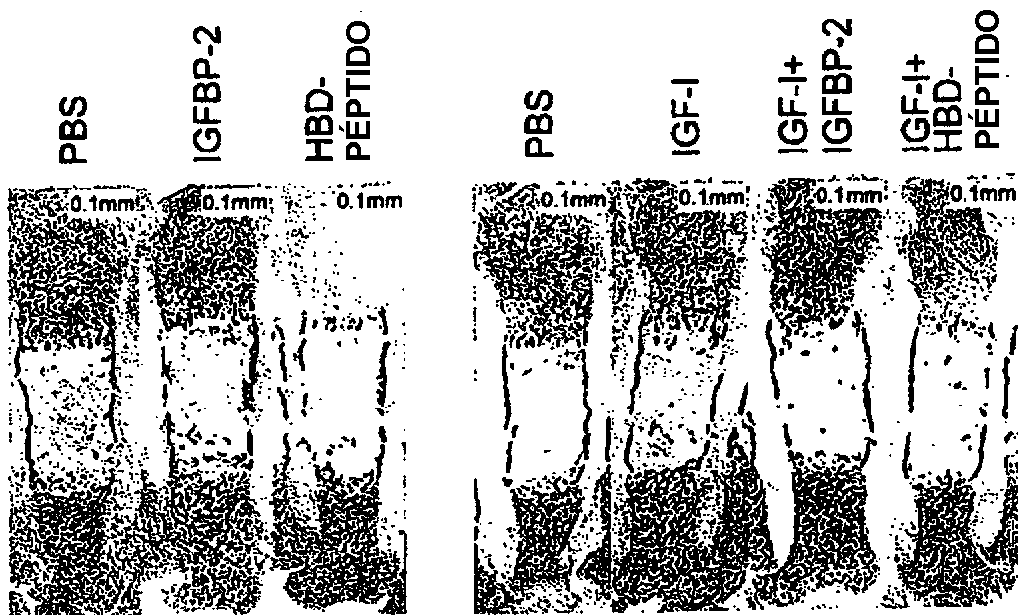


FIG. 2C

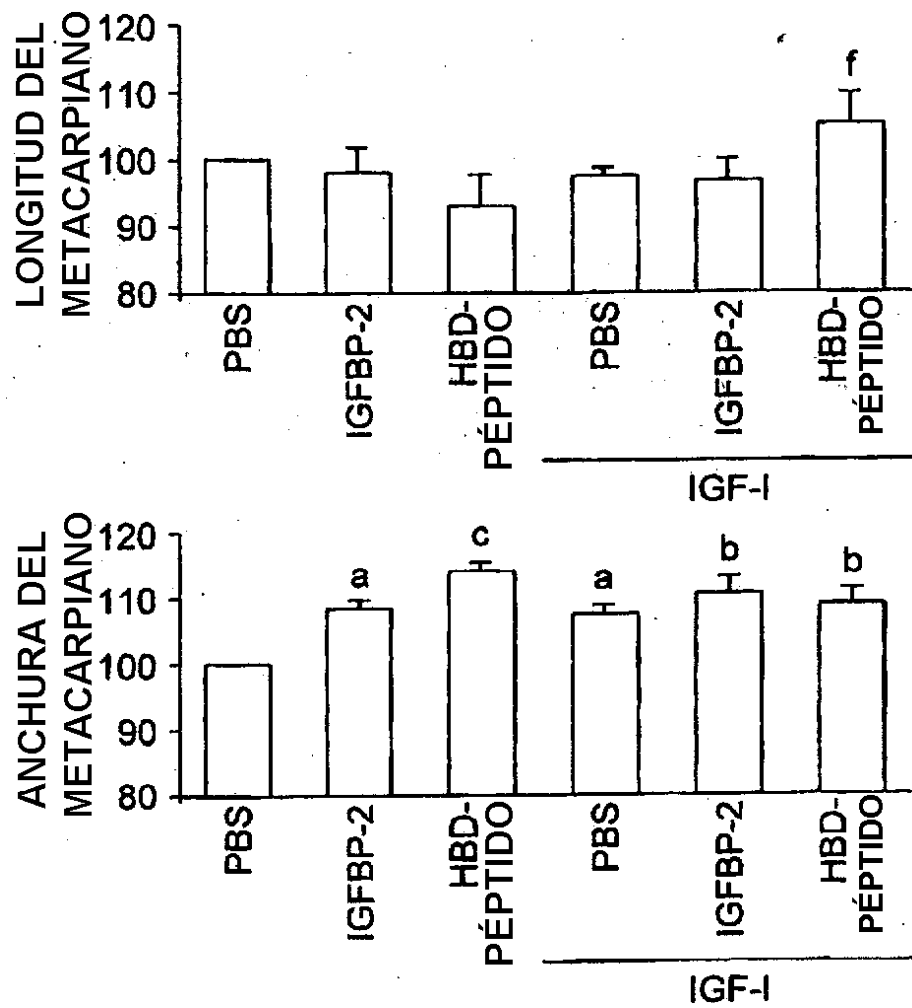


FIG. 2D

TINCIÓN ROJO ALIZARINA

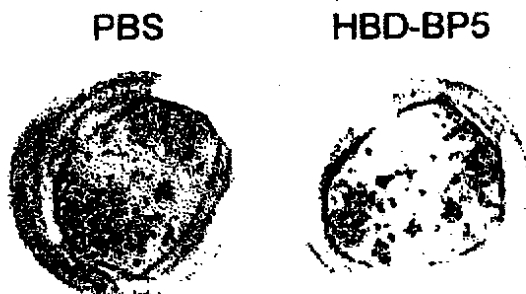


FIG. 3A

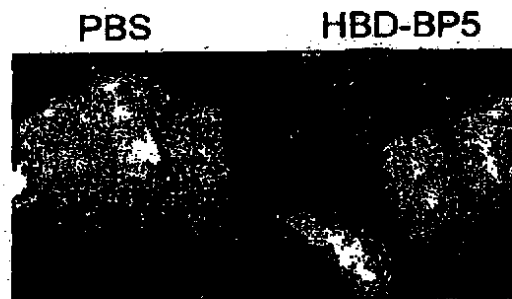


FIG. 3B

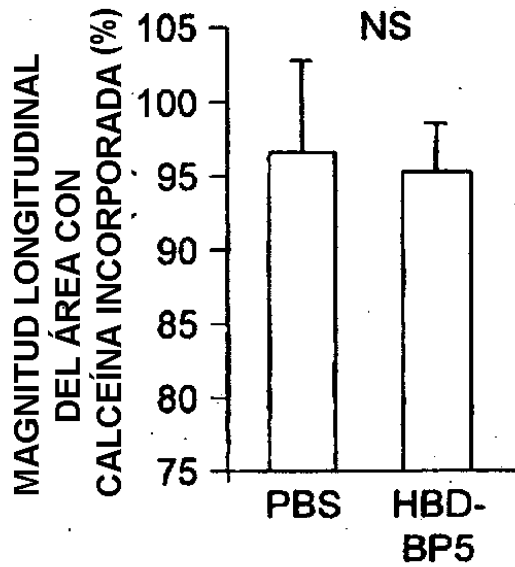


FIG. 3C

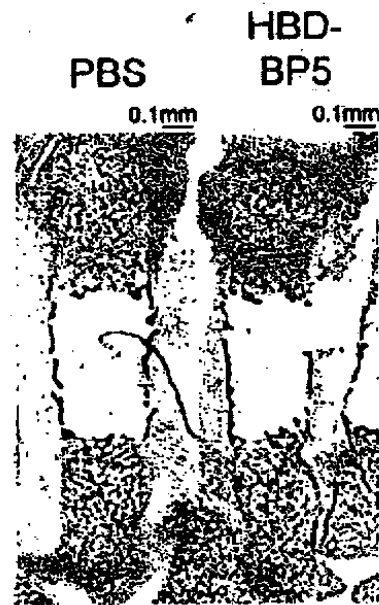


FIG. 3D

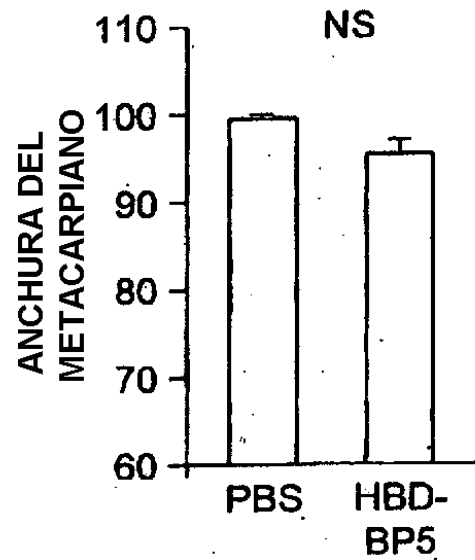
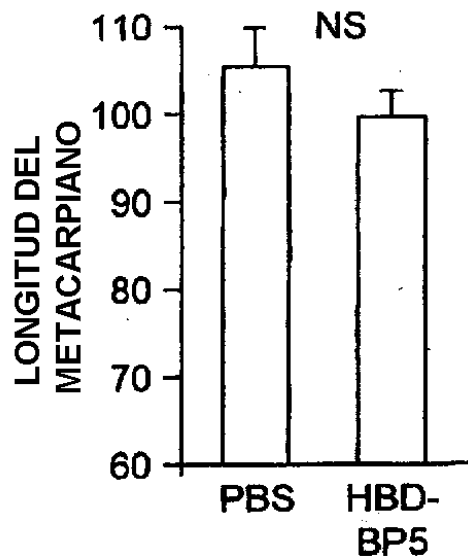


FIG. 3E

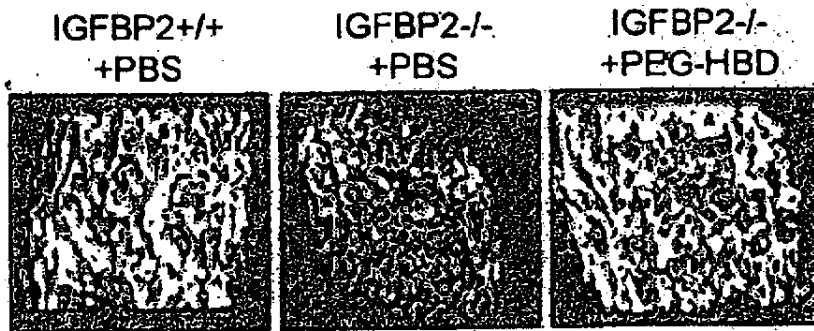


FIG. 4A

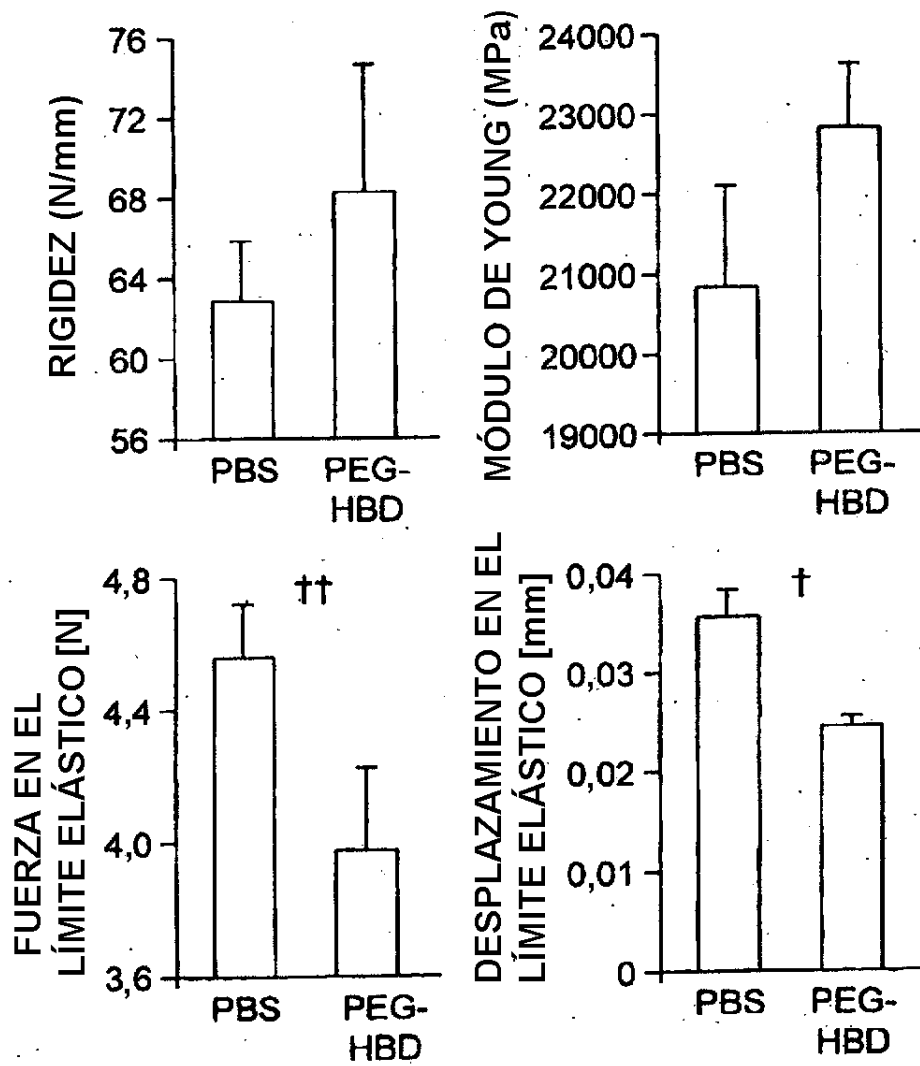


FIG. 4B

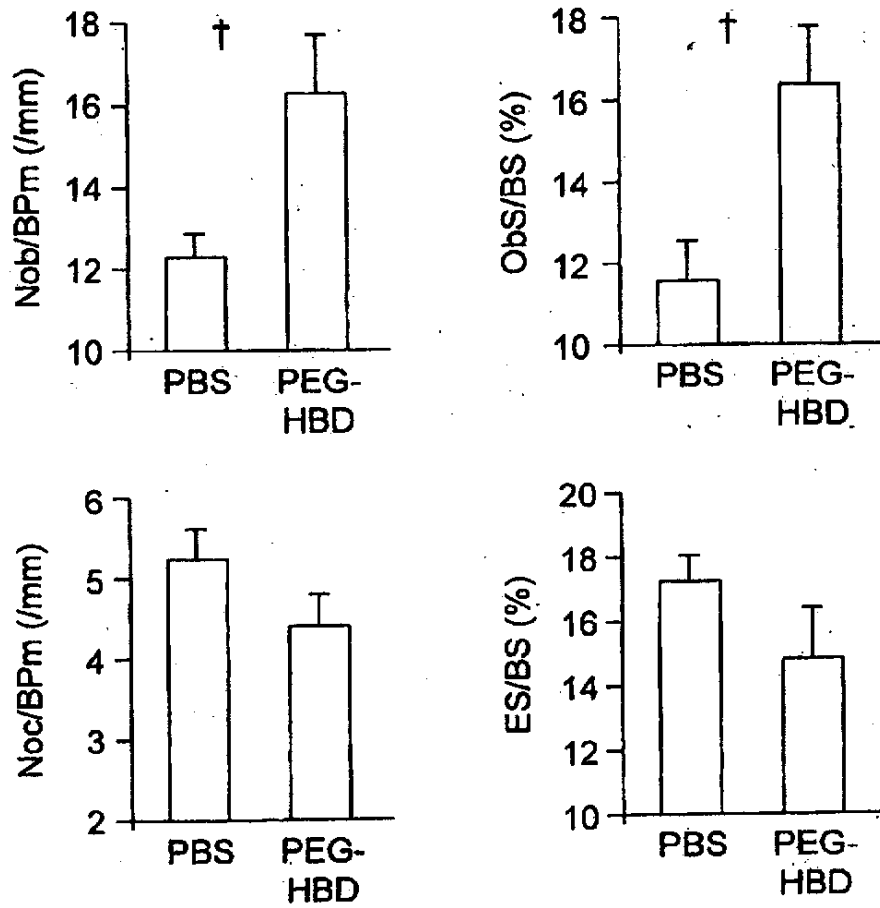


FIG. 4C

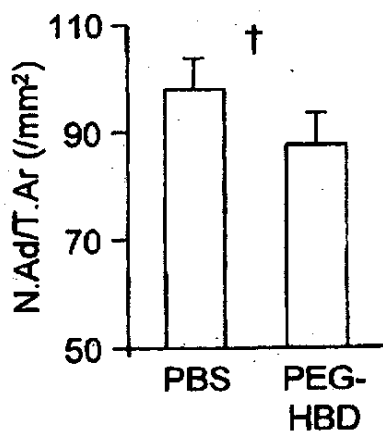


FIG. 4D

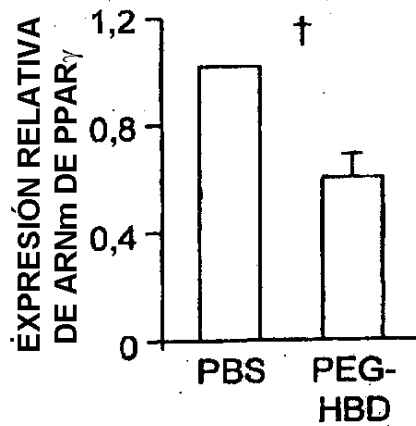
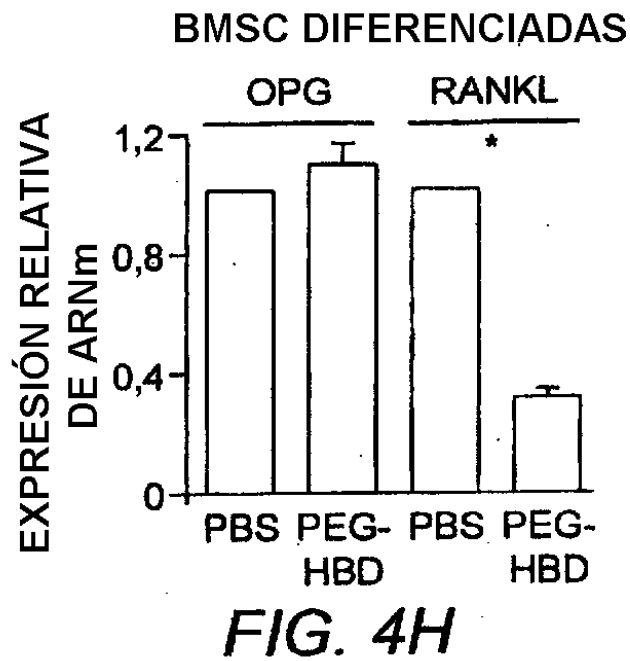
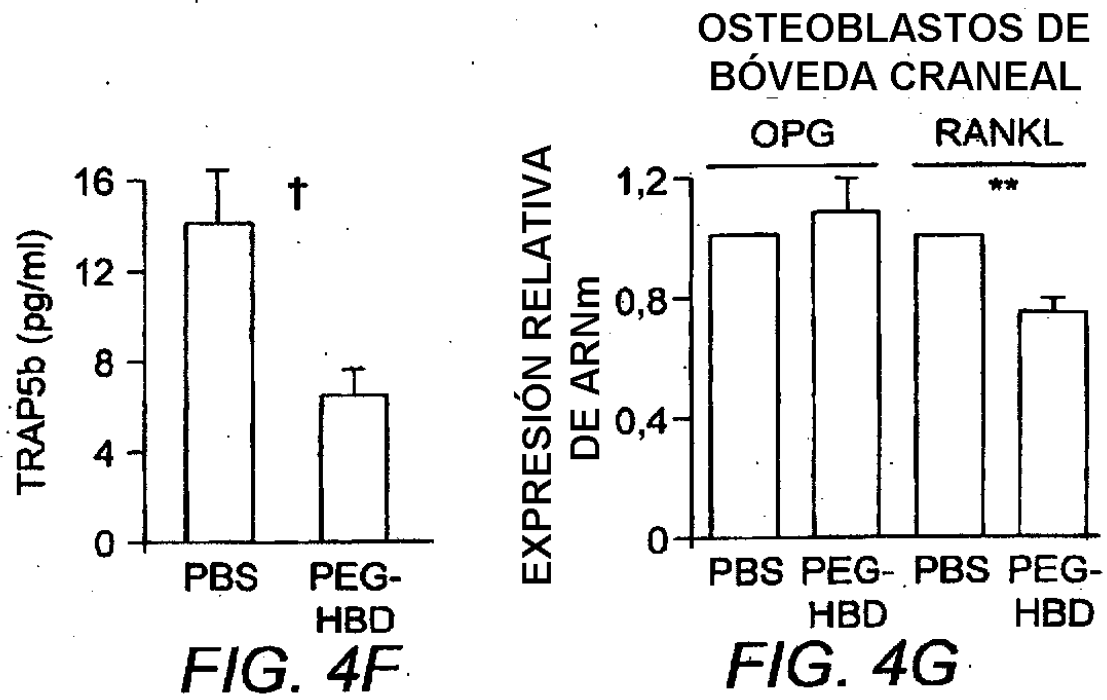


FIG. 4E



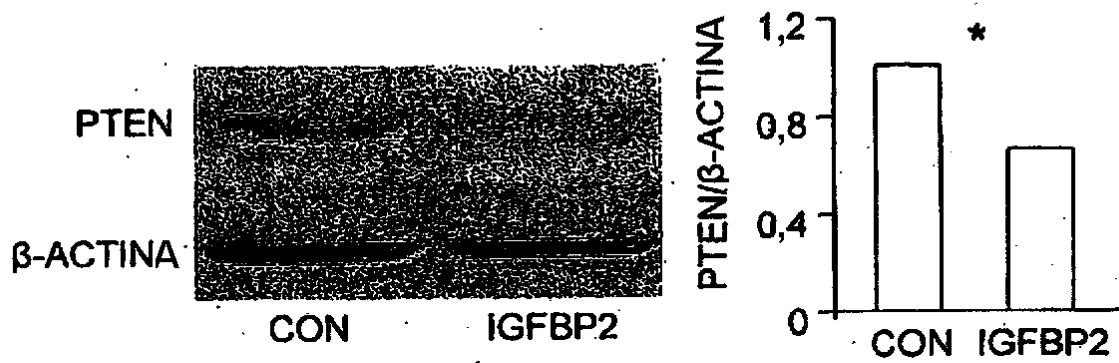


FIG. 5A

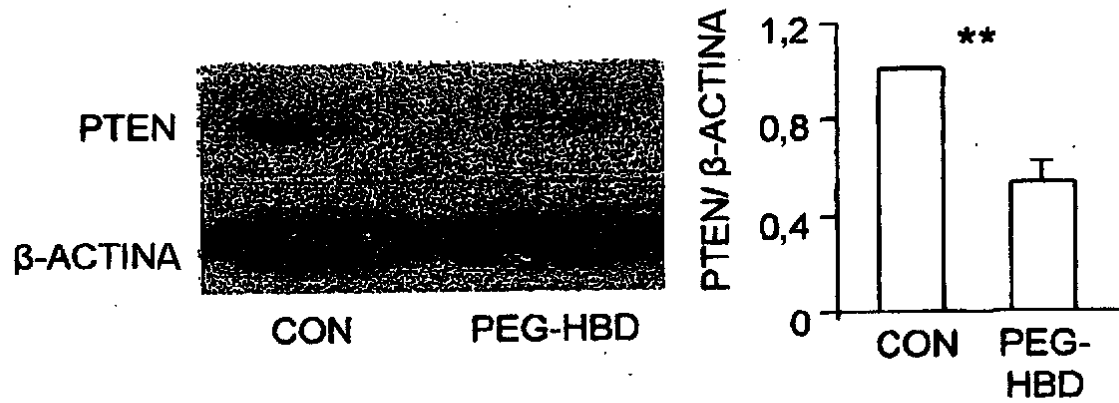


FIG. 5B

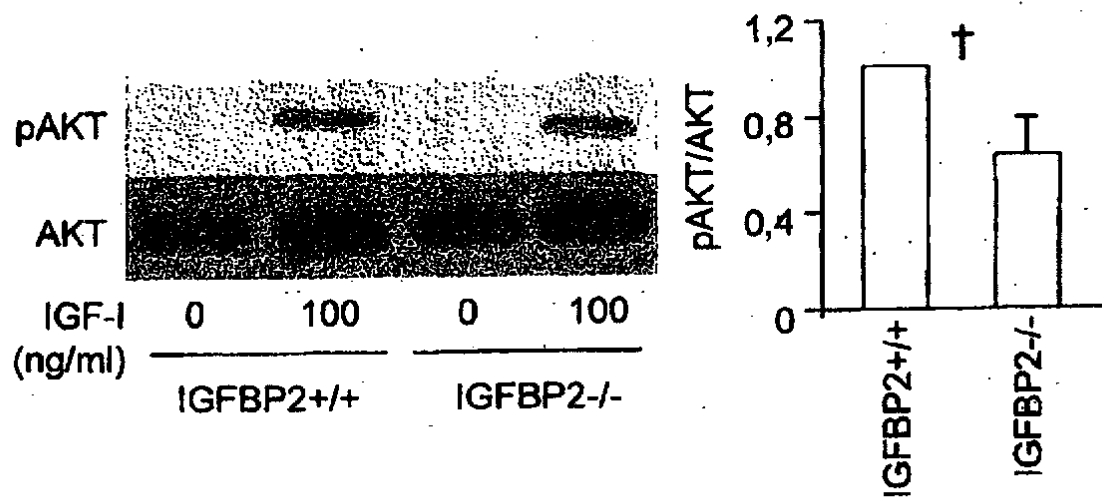


FIG. 5C

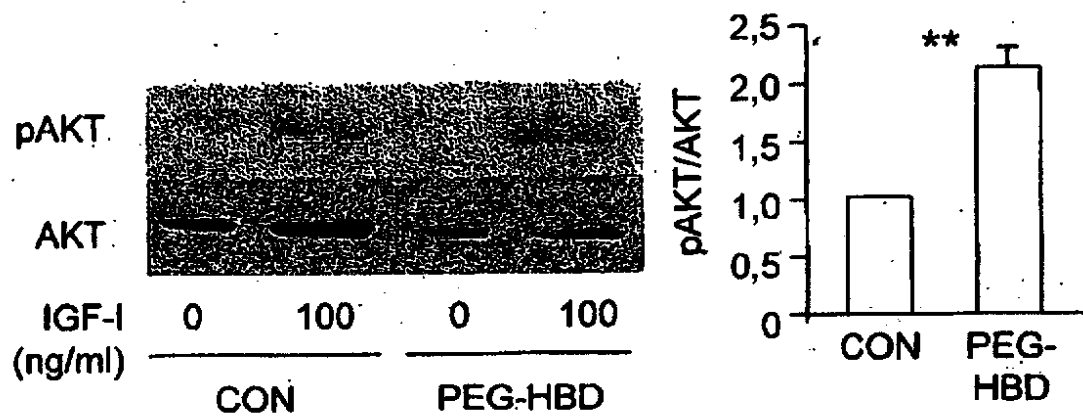


FIG. 5D

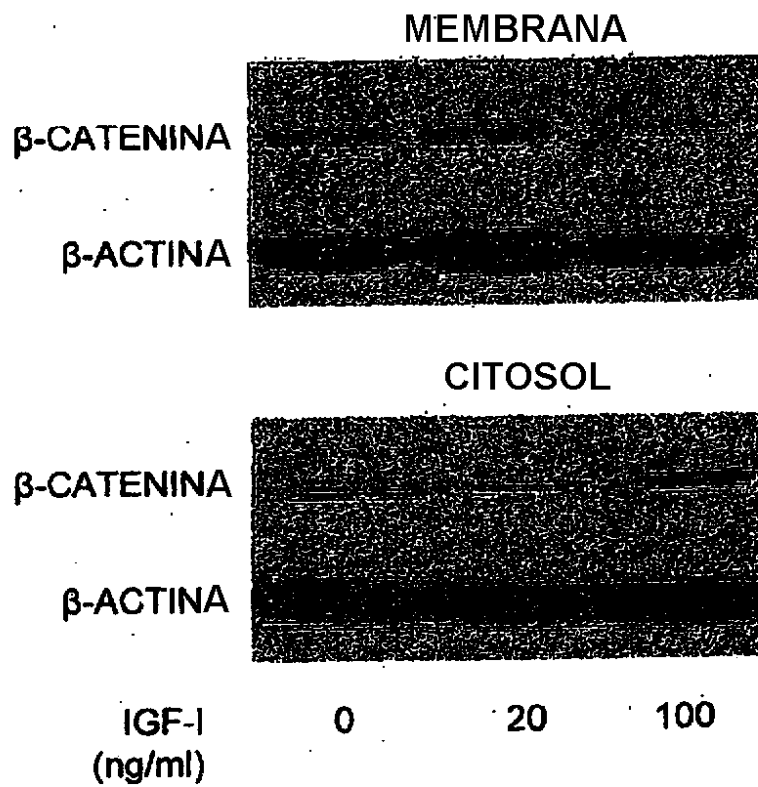


FIG. 6A

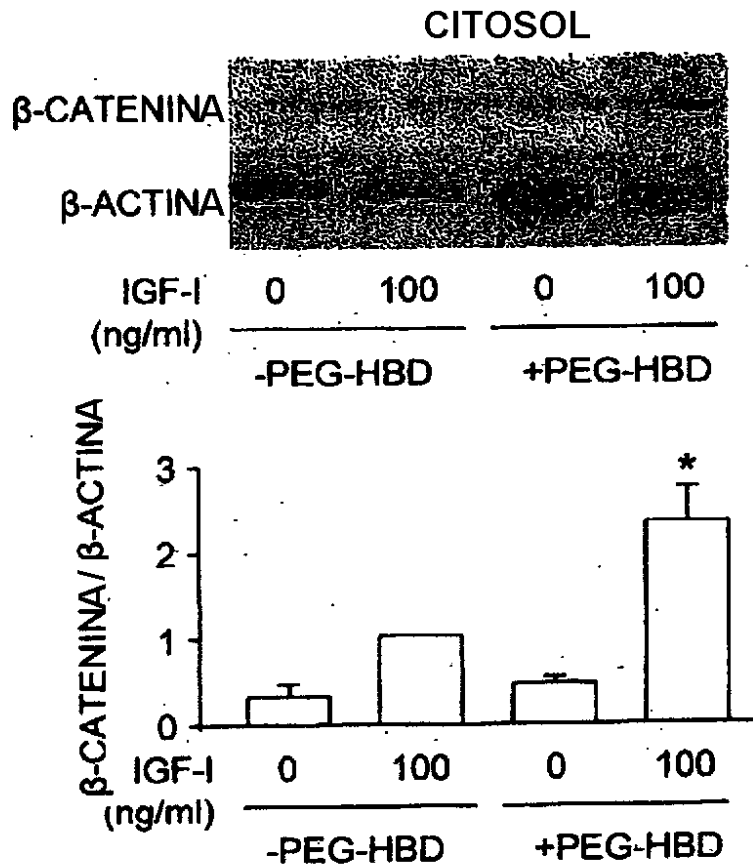


FIG. 6B

PRODUCTO LISADO DE CÉLULAS COMPLETAS

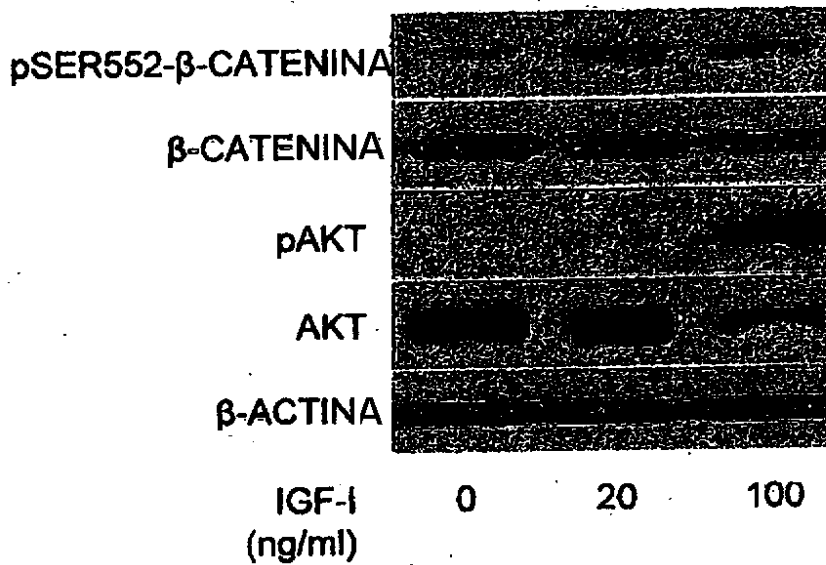


FIG. 6C

PRODUCTO LISADO DE CÉLULAS COMPLETAS

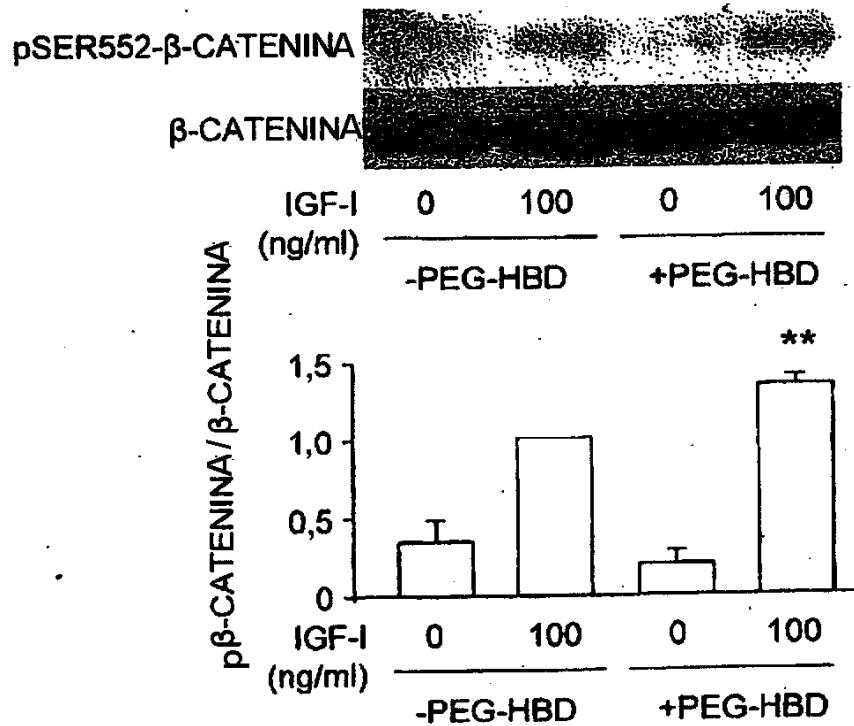


FIG. 6D

TINCIÓN ROJO ALIZARINA

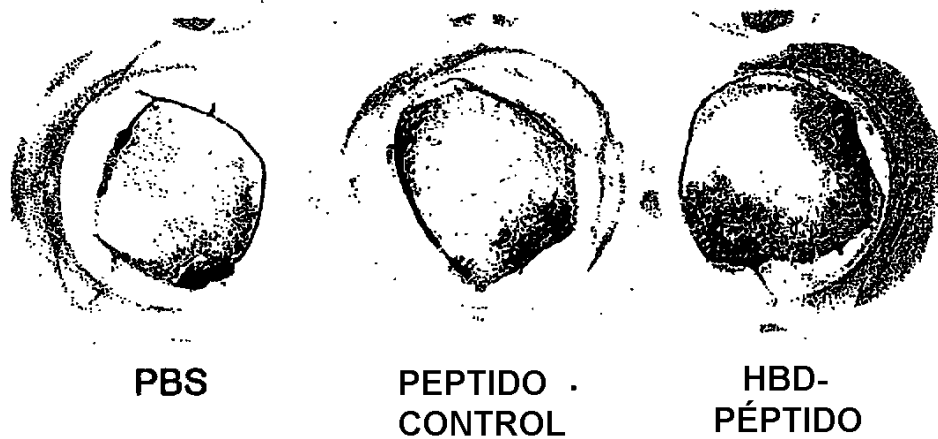


FIG. 7

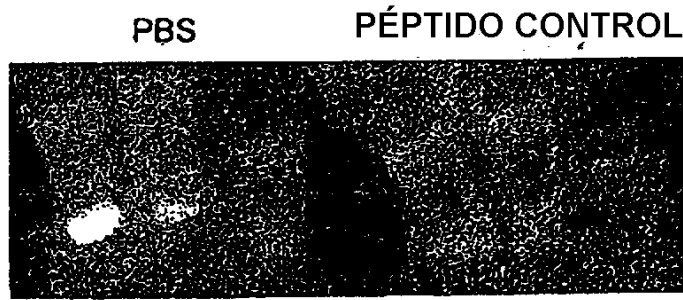


FIG. 8A

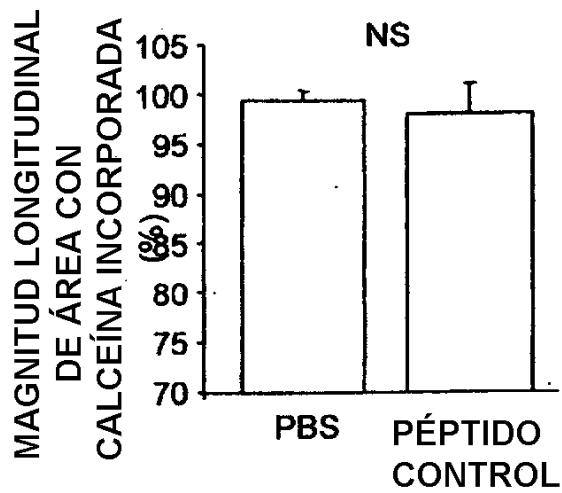


FIG. 8B



FIG. 8C

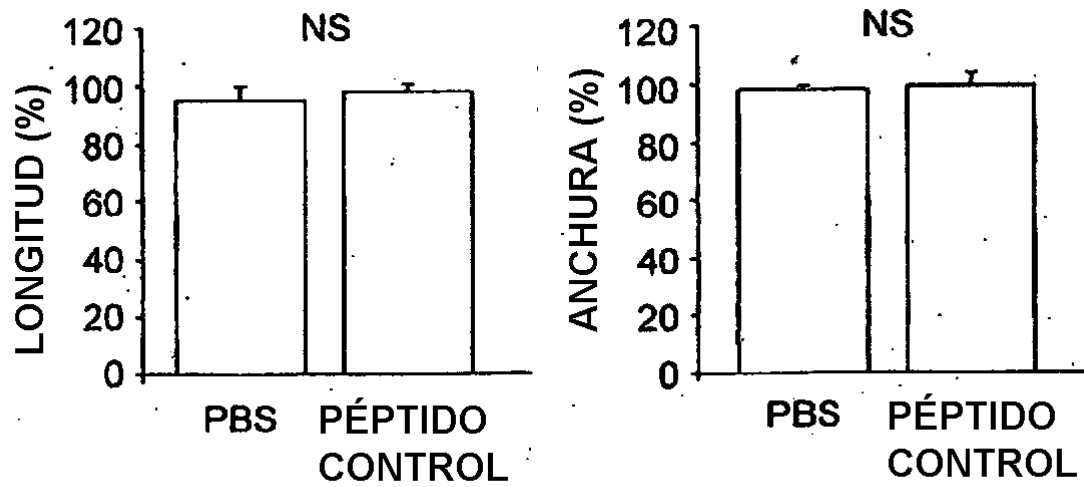


FIG. 8D

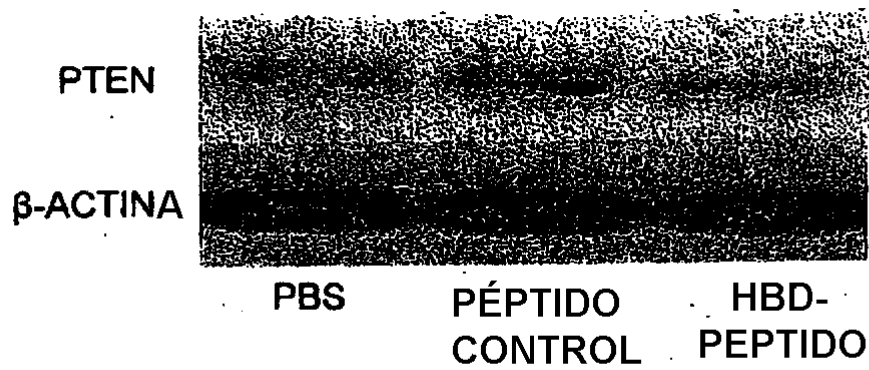


FIG. 9A

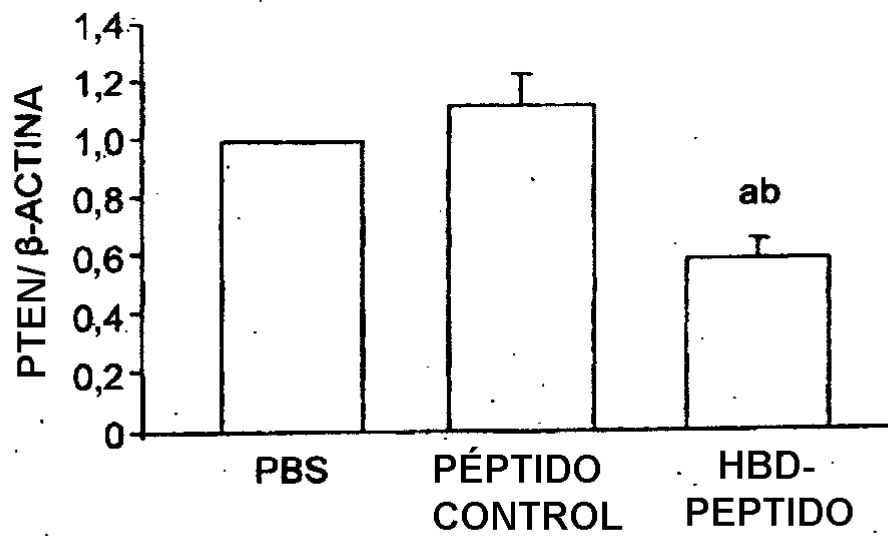
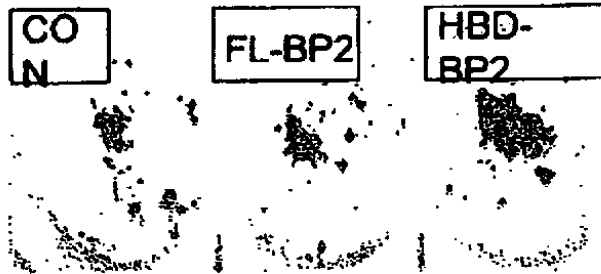


FIG. 9B

CÉLULAS ESTROMALES DE MÉDULA ÓSEA



OSTEOBLASTOS DE BÓVEDA CRANEAL

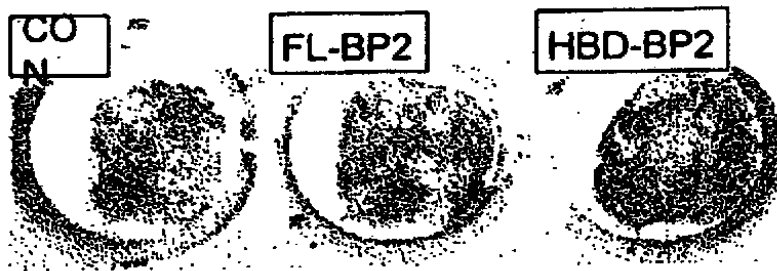


FIG. 10

IGFBP2^{+/+}
+PBS

IGFBP2^{-/-}
+PBS

IGFBP-2^{-/-}
+HBD

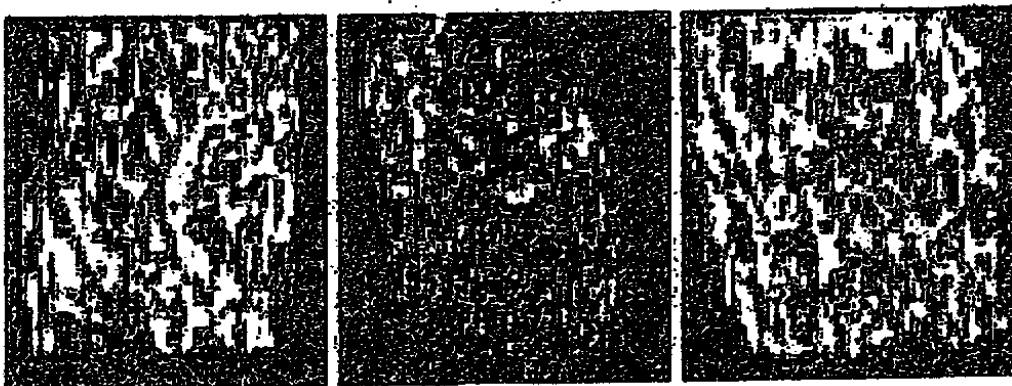


FIG. 11

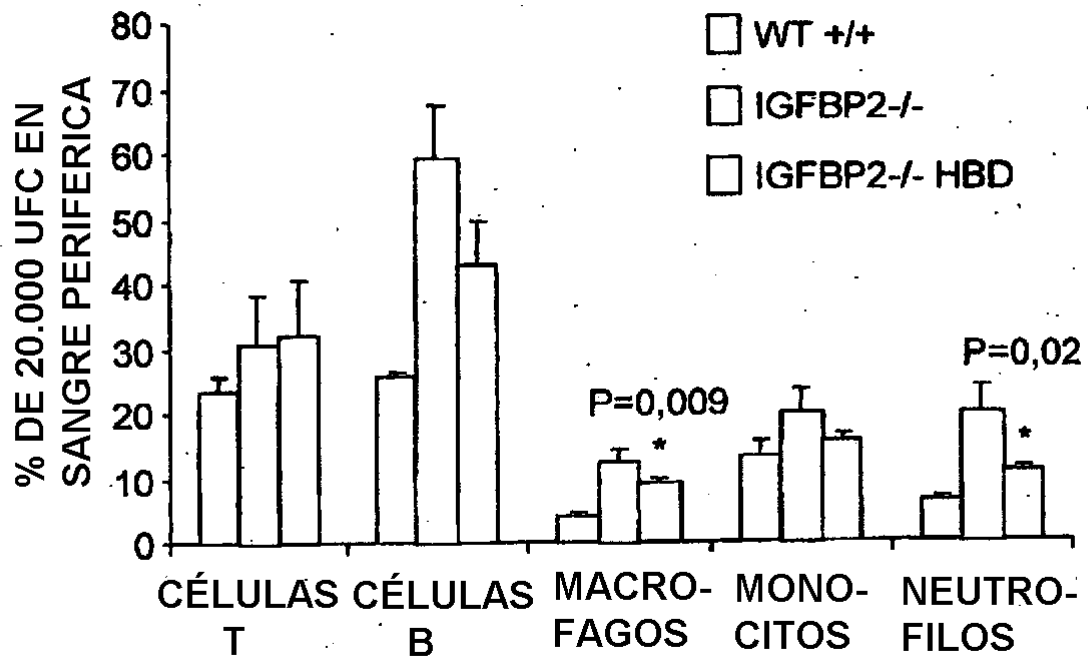


FIG. 12

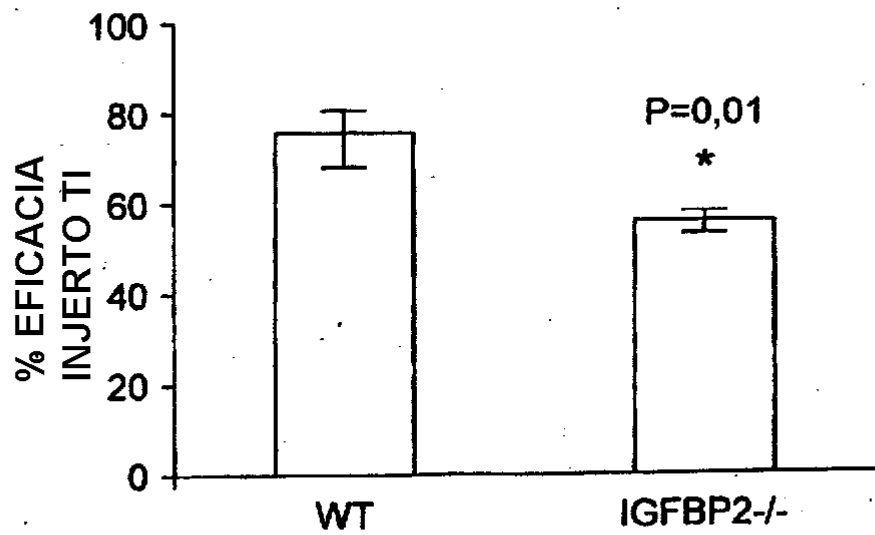


FIG. 13