



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 290 125**

⑤1 Int. Cl.:
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **01926479 .5**
⑧6 Fecha de presentación : **30.03.2001**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1267616**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2003**

⑤4 Título: **Métodos para incrementar el crecimiento capilar mediante un polipéptido Wnt.**

③0 Prioridad: **31.03.2000 US 193771 P**
12.01.2001 US 261690 P

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

⑦3 Titular/es:
THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
55 Fruit Street
Boston, Massachusetts 02114, US

⑦2 Inventor/es: **Kishimoto, Jiro;**
Burgeson, Robert y
Morgan, Bruce, A.

⑦4 Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 290 125 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para incrementar el crecimiento capilar mediante un polipéptido Wnt.

5 Antecedentes de la invención

El folículo piloso experimenta un ciclo de crecimiento capilar (anágeno) seguido por una regresión (catágeno) y quiescencia (telógeno) hasta que en el folículo existente es generado un nuevo tallo piloso durante la subsiguiente fase de anágeno. Hardy y otros (1992) *Trends in Genetics* 8:55-61. El tallo piloso se deriva de las células de matriz epitelial en la base del folículo, pero se piensa que una agrupación de células dérmicas envainadas por las células matriciales, que es conocida como la papila dérmica (DP), suministra señales inductivas que se requieren para la emergencia capilar. La señalización recíproca desde la epidermis es necesaria para la formación de la papila dérmica y puede también explicar los cambios morfológicos coordinados que en los componentes epiteliales y dérmicos del folículo se observan durante el ciclo capilar.

El documento WO 99/42481 describe la implicación de la β -catenina en la vía de señales Wnt. La fijación de la β -catenina al factor de transcripción LEF-1 conduce a la expresión génica, y se sugiere que pueden usarse para estimular el crecimiento capilar β -catenina y análogos.

El documento WO 00/31134 describe un método para inducir el crecimiento capilar aportando actividad de β -catenina a una célula dérmica. Ninguno de estos documentos describe el uso de un polipéptido Wnt para estimular el crecimiento capilar.

Breve exposición de la invención

La invención se basa en parte en el descubrimiento de que incrementando los niveles de proteína Wnt se puede regular con seguridad la capacidad de las células de papila dérmica (DP) para estimular el crecimiento capilar. Se descubrió que el cocultivo de células que expresan Wnt con células DP mantiene la inductividad capilar. Se descubrió adicionalmente que agentes tales como inhibidores de la quinasa GSK3 β , como p. ej. el cloruro de litio o pequeños iones similares que pueden imitar un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. la inhibición de la fosforilación de la β -catenina, p. ej. mediante la inhibición de la quinasa GSK3 β o la acumulación de β -catenina, pueden regular la capacidad de las células DP para estimular el crecimiento capilar.

En consecuencia, en un aspecto la invención presenta un método para estimular el crecimiento capilar en un sujeto administrando un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo; o administrando una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo.

En una realización preferida la proteína Wnt es Wnt3, como p. ej. Wnt3a o Wnt3b; Wnt4; o Wnt7, como p. ej. Wnt7a o 7b. En una realización particularmente preferida, la proteína Wnt es Wnt3, y con la máxima preferencia Wnt3a.

En una realización preferida, la Wnt es incrementada administrando un agente que incrementa el nivel de producción y/o actividad de proteína Wnt. Un agente que incrementa el nivel de proteína Wnt y/o que imite un efecto de transducción de señales estimulada por la Wnt puede ser uno o varios de los miembros del grupo que consta de un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo, y una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo. Los ejemplos de agentes que pueden imitar un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt incluyen los siguientes: un inhibidor de quinasa GSK3 β , como p. ej. cloruro de litio o pequeños iones similares; agentes que fijan al receptor Frizzled (Frz) (un receptor de superficie celular) e imitan la fijación de Wnt, como p. ej. anticuerpos anti-Frizzled, u otros ligandos de fijación del receptor Frizzled de los que se dan de manera natural o de manera no natural.

En una realización preferida, la Wnt es incrementada administrando, o sea p. ej. introduciendo una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido Wnt o fragmento funcional o análogo del mismo en una célula específica, como p. ej. una célula epidérmica o una célula DP, en el sujeto. La secuencia de nucleótidos puede ser una secuencia genómica o una secuencia de cDNA (cDNA = ácido desoxirribonucleico complementario). La secuencia de nucleótidos puede incluir: una región codificadora de Wnt; una secuencia promotora, como p. ej. una secuencia promotora de un gen Wnt o de otro gen; una secuencia potenciadora, como p. ej. una región no traducida (UTR) 5', como p. ej. una UTR 5' de un gen Wnt o de otro gen, una UTR 3', como p. ej. una UTR 3' de un gen Wnt o de otro gen; un sitio de poliadenilación; y una secuencia aislante.

En otra realización preferida, el nivel de proteína Wnt es incrementado incrementando el nivel de expresión de un gen Wnt endógeno, p. ej. a base de incrementar la transcripción del gen Wnt. En una realización preferida, la transcripción del gen Wnt es incrementada haciendo alguna de las cosas siguientes: alterar las secuencias reguladoras del gen Wnt endógeno p. ej. mediante la adición de un elemento regulador positivo (tal como un potenciador o un sitio de fijación de DNA (DNA = ácido desoxirribonucleico) para un activador transcripcional); la delección de un elemento regulador negativo (tal como un sitio de fijación de DNA para un represor transcripcional) y/o la sustitución de la secuencia reguladora endógena, o de elementos de la misma, por la de otro gen, permitiendo con ello que sea más eficazmente transcrita la región codificadora del gen Wnt.

Un método puede incluir el paso de introducir en un sujeto una célula, como p. ej. una célula que exprese Wnt. En una realización preferida, la célula expresa una proteína Wnt, como p. ej. una Wnt3, una Wnt4 o una Wnt7, o un fragmento o un análogo de la misma. En otra realización preferida, la célula ha sido genéticamente modificada para ocasionar la expresión de Wnt, o sea que p. ej. la célula ha sido modificada genéticamente para expresar una proteína Wnt o un fragmento o un análogo de la misma, o bien la célula ha sido modificada genéticamente para introducir una secuencia de ácido nucleico, como p. ej. una secuencia reguladora, como p. ej. un promotor o un potenciador, que ocasiona o incrementa la expresión de la Wnt endógena. En una realización preferida, el promotor del gen Wnt endógeno ha sido sustituido por otro promotor, o sea p. ej. por un promotor de otro gen. La célula puede ser una célula autóloga, alogénica, o xenogénea, pero es preferiblemente autóloga. La célula autóloga es preferiblemente de un sujeto caracterizado por presentar pérdida capilar. La célula manipulada puede ser cualquier tipo de célula, como p. ej. un fibroblasto, un queratinocito, una célula epitelial, una célula endotelial, una célula glial, una célula neural, un linfocito, una célula de médula ósea y una célula muscular. Preferiblemente la célula es una célula epitelial, como p. ej. una célula epidérmica, una célula de folículo piloso o una célula de papila dérmica. La célula puede ser introducida en un sujeto para incrementar la actividad de Wnt.

En una realización preferida, el nivel de Wnt, o sea p. ej. el nivel de Wnt3, de Wnt4 o de Wnt7, es incrementado a lo largo de un prolongado periodo de tiempo, o sea p. ej. a lo largo de un periodo de tiempo de 2, 10, 14, 30, 60, 90 o 180 días o más. P. ej. puede suministrarse p. ej. por cualquiera de los métodos que aquí se describen una célula que exprese una proteína Wnt o un fragmento o análogo de la misma, con lo cual es liberada Wnt a lo largo de un prolongado periodo de tiempo, como p. ej. un periodo de tiempo de 2, 10, 14, 30, 60, 90 o 180 días o más.

En una realización preferida el agente se administra p. ej. administrando tópicamente el agente, administrando sistémicamente el agente, administrando oralmente el agente o inyectando el agente preferiblemente por vía dérmica o subcutánea. En realizaciones preferidas el compuesto es administrado usando un adecuado vehículo de administración como por ejemplo un agente superficiactivo o un agente que incrementa la permeabilidad de la piel, como p. ej. una formulación que contenga SDS (SDS = dodecilsulfato sódico) o DMSO (DMSO = sulfóxido de dimetilo). Preferiblemente, el agente está incluido en una composición para uso tópico, y p. ej. la composición es un gel, una crema o un líquido. En una realización preferida, el agente se administra mediante administración continua, o sea que p. ej. el agente es administrado con una frecuencia suficiente como para que el efecto en el nivel de proteína Wnt o en la transducción de señales estimulada por Wnt se mantenga por espacio de un periodo de tiempo seleccionado de p. ej. 10, 20, 30, 50, 90, 180 o 365 días o más. En otra realización preferida se repite la administración del agente, o sea que p. ej. dicha administración se repite al menos 1, 2, 3, 5, 10, 20 o más veces.

En una realización preferida el crecimiento capilar es estimulado en el cuero cabelludo del sujeto o en la cara del sujeto, siendo p. ej. estimulado el crecimiento capilar facial del bigote y/o de la barba.

En una realización preferida, el sujeto tiene una insuficiente cantidad de pelo o una insuficiente velocidad de crecimiento capilar. En una realización preferida, el sujeto padece de calvicie de distribución genética; padece de un trastorno hormonal que reduce el crecimiento capilar; ha recibido un tratamiento, como p. ej. radiación o quimioterapia o un fármaco que inhibe el crecimiento capilar; o ha sido sometido a un procedimiento quirúrgico, como p. ej. un injerto de piel, que requiere crecimiento capilar.

Un método para inhibir el crecimiento capilar en un sujeto incluye el paso de inhibir el nivel de proteína Wnt o inhibir un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt en el sujeto.

En una realización preferida, la proteína Wnt es Wnt3, como p. ej. Wnt3a o Wnt3b; Wnt4; o Wnt7, como p. ej. Wnt7a o 7b. En una realización particularmente preferida, la proteína Wnt es Wnt3, y con la máxima preferencia Wnt3a.

En una realización preferida, la Wnt es inhibida administrando un agente que inhibe los niveles de producción de proteína Wnt y/o es un antagonista de la Wnt. Un agente que inhiba la Wnt puede ser uno o varios de los siguientes: una proteína Frizzled o una parte de fijación de Wnt de la misma; una molécula de ácido nucleico de Wnt que pueda fijarse a una secuencia de ácido nucleico de Wnt celular, como p. ej. mRNA (mRNA = ácido ribonucleico mensajero), e inhibir la expresión de la proteína, como p. ej. una molécula antisentido o una ribozima Wnt; un anticuerpo que se fije específicamente a la proteína Wnt, como p. ej. un anticuerpo que desbarate la capacidad de la Wnt para fijarse a su diana celular natural, o sea que p. ej. desbarate la capacidad de la Wnt para fijarse a Frizzled; un anticuerpo que se fije específicamente a Frizzled, como p. ej. un anticuerpo que desbarate la capacidad de Frizzled para fijarse a Wnt; una proteína Wnt inactiva mutada o un fragmento de la misma que se fije a Frizzled pero no active la vía de señalización Wnt; y un agente que reduzca la expresión del gen Wnt, como p. ej. una pequeña molécula que se fije al promotor de Wnt.

En otra realización preferida, la Wnt es inhibida reduciendo el nivel de expresión de un gen Wnt endógeno, p. ej. reduciendo la transcripción del gen Wnt. En una realización preferida, la transcripción del gen Wnt puede ser reducida alterando las secuencias reguladoras del gen Wnt endógeno, p. ej. mediante la adición de una secuencia reguladora negativa (tal como un sitio de fijación de DNA para un represor transcripcional).

En una realización preferida, el agente que reduce el nivel de proteína Wnt o inhibe un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt es administrado p. ej. a base de administrar tópicamente el agente, administrar sistémica-

mente el agente, administrar oralmente el agente o inyectar el agente, preferiblemente por vía dérmica o subcutánea. En realizaciones preferidas, el compuesto es administrado usando un adecuado vehículo de administración, como por ejemplo un agente superficiactivo o un agente que incrementa la permeabilidad de la piel, como p. ej. una formulación que contenga SDS o DMSO. Preferiblemente, el agente es incluido en una composición para uso tópico, y p. ej. la composición es un gel, una crema o un líquido. En una realización preferida, el agente es administrado mediante administración continua, o sea que p. ej. el agente es administrado con una frecuencia suficiente como para que el efecto ejercido en el nivel de proteína Wnt o en la transducción de señales estimulada por Wnt se mantenga por espacio de un periodo de tiempo seleccionado de p. ej. 10, 20, 30, 50, 90, 180 o 365 días o más. En otra realización preferida, la administración del agente es repetida, o sea que p. ej. es repetida al menos 1, 2, 3, 5, 10, 20 o más veces.

En una realización preferida, el crecimiento capilar es inhibido en el cuero cabelludo del sujeto o en la cara del sujeto, siendo p. ej. inhibido el crecimiento capilar facial en la barba y/o en el bigote o siendo inhibido el crecimiento de las cejas; o bien es inhibido el crecimiento capilar en el cuerpo del sujeto, siendo p. ej. inhibido el crecimiento capilar en la espalda, las piernas, el pecho o los sobacos del sujeto.

Un método para estimular el crecimiento capilar en un sujeto incluye el paso de activar o incrementar la activación de la vía de señalización de Wnt- β -catenina.

En una realización preferida, la activación de la vía de Wnt- β -catenina es incrementada administrando un agente que incrementa el nivel de producción de proteína Wnt y/o que imita un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. la inhibición de la fosforilación de β -catenina, p. ej. mediante la inhibición de la quinasa GSK3 β o la acumulación de β -catenina. Un agente que incrementa el nivel de proteína Wnt y/o que imite un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt puede ser uno o varios de los siguientes: un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo como aquí se ha descrito; una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo como aquí se ha descrito; un agente que incrementa la expresión de ácido nucleico de Wnt, como p. ej. una pequeña molécula que se fije a la región promotora de Wnt; o un agente que imite un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. la inhibición de la fosforilación de β -catenina, p. ej. mediante la inhibición de quinasa GSK3 β o la acumulación de β -catenina. Los ejemplos de agentes que pueden imitar la transducción de señales estimulada por Wnt incluyen inhibidores de GSK3 β , como p. ej. cloruro de litio o pequeños iones similares, agentes que fijan a Frizzled e imitan la fijación de Wnt, como p. ej. anticuerpos anti-Frizzled, u otros ligandos de fijación de Frizzled de los que se dan de manera natural o de manera no natural. En otras realizaciones, el nivel de proteína Wnt puede ser incrementado incrementando el nivel de expresión de un gen Wnt endógeno, p. ej. a base incrementar la transcripción del gen Wnt, como aquí se describe. En otra realización preferida, la activación de la vía de Wnt- β -catenina es incrementada administrando un agente que incrementa la producción o actividad de proteína β -catenina, como p. ej. un agente que reduce la fosforilación de β -catenina y/o que incrementa la acumulación de β -catenina, como p. ej. un polipéptido de β -catenina o un fragmento o análogo del mismo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de β -catenina o fragmentos o análogos del mismo; o un agente que incrementa la producción y/o actividad de proteína LEF-1, como p. ej. un polipéptido LEF-1 o un fragmento o análogo del mismo, o una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido LEF-1 o fragmentos o análogos del mismo.

En otra realización preferida, se introduce en un sujeto una célula, como p. ej. una célula que expresa y preferiblemente secreta una proteína que interviene en la activación de la vía de señalización de Wnt- β -catenina. En una realización preferida, la célula ha sido modificada genéticamente para expresar una proteína Wnt o un fragmento o un análogo de la misma; una proteína β -catenina o un fragmento o análogo de la misma; o una proteína LEF-1 o un fragmento o análogo de la misma. En una realización preferida, la célula expresa una proteína Wnt, como p. ej. una Wnt3, una Wnt4 o una Wnt 7, o un fragmento o un análogo de la misma. En otra realización preferida, la célula ha sido modificada genéticamente para ocasionar la expresión de Wnt, o sea que p. ej. la célula ha sido modificada genéticamente para expresar una proteína Wnt o un fragmento o un análogo de la misma, o la célula ha sido modificada genéticamente para introducir una secuencia de ácido nucleico, como p. ej. una secuencia reguladora, como p. ej. un promotor o un potenciador que ocasiona o incrementa la expresión de la Wnt endógena. En una realización preferida, el promotor del gen Wnt endógeno ha sido sustituido por otro promotor, o sea que p. ej. ha sido sustituido por un promotor de otro gen. La célula puede ser una célula autóloga, alogénica o xenogénica, pero es preferiblemente autóloga. La célula puede ser una célula caracterizada por pérdida capilar. La célula manipulada puede ser cualquier tipo de célula, como p. ej. un fibroblasto, un queratinocito o una célula epitelial. Preferiblemente la célula es una célula epitelial, como p. ej. una célula epidérmica, una célula de folículo piloso o una célula de papila dérmica. La célula puede ser introducida en un sujeto para incrementar la actividad de Wnt.

En una realización preferida, el nivel de Wnt, o sea p. ej. el nivel de Wnt3, Wnt4 o Wnt7, es incrementado a lo largo de un prolongado periodo de tiempo, como p. ej. un periodo de tiempo de 2, 10, 14, 30, 60, 90 o 180 días o más. P. ej., una célula que exprese una proteína Wnt o un fragmento o análogo de la misma puede ser suministrada p. ej. por cualquiera de los métodos que aquí se describen, con lo cual la Wnt es liberada a lo largo de un prolongado periodo de tiempo, o sea que p. ej. es liberada a lo largo de un periodo de tiempo de 2, 10, 14, 30, 60, 90 o 180 días o más. La célula puede ser introducida en un sujeto p. ej. para incrementar el nivel de la proteína que interviene en la activación de la vía de señalización de Wnt- β -catenina.

En una realización preferida el agente es administrado p. ej. a base de administrar tópicamente el agente, a base de administrar sistémicamente el agente, a base de administrar oralmente el agente, o a base de inyectar el agente,

preferiblemente por vía dérmica o subcutánea. En realizaciones preferidas, el compuesto es administrado usando un adecuado vehículo de administración, como por ejemplo un agente superficiactivo o un agente que incrementa la permeabilidad de la piel, como p. ej. una formulación que contenga SDS o DMSO. Preferiblemente, el agente es incluido en una composición para uso tópico, o sea que p. ej. la composición es un gel, una crema o un líquido.

- 5 En una realización preferida, el agente es administrado mediante administración continua, o sea que p. ej. el agente es administrado con una frecuencia suficiente como para que el efecto ejercido en la vía de señalización de Wnt- β -catenina se mantenga por espacio de un periodo de tiempo seleccionado de p. ej. 10, 20, 30, 50, 90, 180 o 365 días o más. En otra realización preferida, la administración del agente es repetida, o sea que p. ej. dicha administración es repetida al menos 1, 2, 3, 5, 10, 20 o más veces.

10

En una realización preferida, el crecimiento capilar es estimulado en el cuero cabelludo del sujeto o en la cara del sujeto, o sea que p. ej. se estimula el crecimiento capilar facial en la barba y/o el bigote.

- 15 En una realización preferida, el sujeto tiene una insuficiente cantidad de pelo o una insuficiente velocidad de crecimiento capilar. En una realización preferida, el sujeto padece de calvicie de distribución genética; padece de un trastorno hormonal que reduce el crecimiento capilar; ha recibido un tratamiento, como p. ej. radiación o quimioterapia o un fármaco que inhibe el crecimiento capilar; o ha sido sometido a un procedimiento quirúrgico, como p. ej. un injerto de piel, que requiere crecimiento capilar.

- 20 Un método para inhibir el crecimiento capilar en un sujeto incluye el paso de inhibir la activación de la vía de señalización de Wnt- β -catenina.

- En una realización preferida, la activación de la vía de Wnt- β -catenina es inhibida mediante un agente que reduce el nivel de producción de proteína Wnt y/o reduce un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt. Un agente que inhiba el nivel de proteína Wnt o que sea un antagonista de Wnt puede ser uno o varios de los siguientes: una proteína Frizzled o una parte de la misma que fije la Wnt; una molécula de ácido nucleico de Wnt que pueda fijarse a una secuencia de ácido nucleico de Wnt celular, como p. ej. mRNA, e inhibir la expresión de la proteína, como p. ej. una molécula antisentido o una ribozima Wnt; un anticuerpo que se fije específicamente a la proteína Wnt, como p. ej. un anticuerpo que desbarate la capacidad de la Wnt para fijarse a su diana celular natural, o sea que p. ej. desbarate la capacidad de la Wnt para fijarse a una proteína receptora de Frizzled; un anticuerpo que se fije específicamente a Frizzled, como p. ej. un anticuerpo que desbarate la capacidad de Frizzled para fijarse a la Wnt; una proteína Wnt inactiva mutada o un fragmento de la misma que se fije a Frizzled pero no active la vía de señalización de Wnt; un agente que reduzca la expresión del gen Wnt, como p. ej. una pequeña molécula que fije el promotor de Wnt; y un agente que reduzca una actividad de Wnt, como p. ej. un agente que incrementa la fosforilación de β -catenina. En otras realizaciones, el nivel de proteína Wnt puede ser inhibido reduciendo el nivel de expresión de un gen Wnt endógeno, o sea p. ej. reduciendo la transcripción del gen Wnt, como aquí se describe. En otra realización preferida, la activación de la vía de Wnt- β -catenina es inhibida mediante un agente que inhibe la producción de proteína β -catenina o inhibe un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. un agente que incrementa la fosforilación de β -catenina y/o que reduce la acumulación de β -catenina; o mediante un agente que inhibe la producción y/o actividad de proteína LEF-1.

- 45 En una realización preferida, el agente es administrado p. ej. a base de administrar tópicamente el agente; administrar sistémicamente el agente; administrar oralmente el agente; o inyectar el agente, preferiblemente por vía dérmica o subcutánea. En realizaciones preferidas, el compuesto debe ser administrado usando un adecuado vehículo de administración, como por ejemplo un agente superficiactivo o un agente que incrementa la permeabilidad de la piel, como p. ej. una formulación que contenga SDS o DMSO. Preferiblemente, el agente es incluido en una composición para uso tópico, o sea que p. ej. la composición es un gel, una crema o un líquido. En una realización preferida, el agente debe ser administrado mediante administración continua, o sea que p. ej. el agente debe ser administrado con una frecuencia suficiente como para que el efecto ejercido en la vía de señalización de Wnt- β -catenina se mantenga por espacio de un periodo de tiempo seleccionado de p. ej. 10, 20, 30, 50, 90, 180 o 365 días o más. En otra realización preferida, la administración del agente es repetida, o sea que p. ej. dicha administración es repetida al menos 1, 2, 3, 5, 10, 20 o más veces.

- 55 En una realización preferida se inhibe el crecimiento capilar en el cuero cabelludo del sujeto o en la cara del sujeto, o sea que p. ej. se inhibe el crecimiento capilar facial en la barba y/o el bigote o se inhibe el crecimiento de las cejas; o se inhibe el crecimiento capilar en el cuerpo del sujeto, o sea que p. ej. se inhibe el crecimiento capilar en la espalda, las piernas, el pecho o los sobacos del sujeto.

- 60 En otro aspecto, la invención presenta un método para valorar el estado de crecimiento capilar/pérdida capilar en un sujeto. El método incluye el paso de valorar, o sea p. ej. detectar, la presencia o ausencia de una lesión genética en un gen Wnt, o valorar, o sea p. ej. detectar, la expresión incorrecta del gen Wnt.

- 65 En una realización, el método incluye el paso de valorar si un sujeto está en situación de riesgo de pérdida capilar. El método incluye el paso de valorar, o sea p. ej. detectar, una lesión genética en un gen Wnt, o valorar, o sea p. ej. detectar, la subexpresión del gen Wnt, para con ello determinar si un sujeto está en situación de riesgo de pérdida capilar.

ES 2 290 125 T3

En una realización preferida, el gen o proteína Wnt es Wnt3, como p. ej. Wnt3a o Wnt3b; Wnt4; o Wnt7, como p. ej. Wnt7a o 7b. En una realización particularmente preferida, la proteína Wnt es Wnt3, y con la máxima preferencia Wnt3a.

En una realización preferida, el método incluye el paso de valorar en una muestra de células del sujeto la presencia o ausencia de una lesión genética, como p. ej. una mutación del gen que codifica una proteína Wnt. La presencia de una lesión genética es indicativa de un riesgo de pérdida capilar en un sujeto. La muestra celular puede ser de cualquier tipo de célula, como p. ej. un fibroblasto, un queratinocito, una célula epitelial, una célula endotelial, una célula glial, una célula neural, un linfocito, una célula de médula ósea y una célula muscular.

En otra realización preferida, el método incluye el paso de valorar en una muestra de células, o sea p. ej. en una muestra de células epidérmicas del folículo piloso de un sujeto, los niveles de expresión de la Wnt para determinar la subexpresión. La subexpresión de Wnt es indicativa de un riesgo de pérdida capilar.

En una realización preferida, la lesión genética es valorada poniendo a la muestra en contacto con una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse con mRNA de Wnt, o sea p. ej. con una sonda marcada. En otra realización preferida, la expresión de Wnt es valorada con un anticuerpo capaz de fijarse a la proteína Wnt, o sea p. ej. con un anticuerpo marcado.

En otra realización, el método incluye el paso de valorar el crecimiento capilar en un sujeto. El método incluye el paso de valorar, o sea p. ej. detectar, la ausencia o presencia de una lesión genética en un gen Wnt, o valorar, o sea p. ej. detectar, la sobreexpresión del gen Wnt, para con ello valorar si es probable el crecimiento capilar en un sujeto.

En una realización preferida, el gen o proteína Wnt es Wnt3, como p. ej. Wnt3a o Wnt3b; Wnt4; o Wnt7, como p. ej. Wnt7a o 7b. En una realización particularmente preferida, la proteína Wnt es Wnt3, y con la máxima preferencia Wnt3a.

En una realización preferida, el método incluye el paso de valorar en una muestra de células del sujeto la presencia o ausencia de una lesión genética, como p. ej. una mutación en el gen que codifica una proteína Wnt. La ausencia de una lesión genética es indicativa de un potencial de crecimiento capilar. La muestra celular puede ser de cualquier tipo de célula, como p. ej. un fibroblasto, un queratinocito, una célula epitelial, una célula endotelial, una célula glial, una célula neural, un linfocito, una célula de médula ósea y una célula muscular.

En otra realización preferida, el método incluye el paso de valorar en una muestra de células, o sea p. ej. en una muestra de células epidérmicas del folículo piloso de un sujeto, los niveles de expresión de Wnt para determinar la sobreexpresión. La sobreexpresión de Wnt es indicativa de un potencial de crecimiento capilar.

En una realización preferida, la lesión genética es valorada poniendo a la muestra en contacto con una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse con mRNA de Wnt, y p. ej. con una sonda marcada. En otra realización preferida, la expresión de Wnt es valorada con un anticuerpo capaz de fijarse a la proteína Wnt, y p. ej. con un anticuerpo marcado.

Un método para evaluar la capacidad de una célula epidérmica para estimular el crecimiento capilar o la pérdida capilar en un sujeto incluye el paso de valorar, o sea p. ej. detectar, la presencia o ausencia de una lesión genética en un gen Wnt, o valorar, o sea p. ej. detectar, la expresión incorrecta del gen Wnt.

En una realización preferida, la capacidad de una célula epidérmica para estimular el crecimiento capilar o la pérdida capilar es valorada *in vitro*.

En una realización, el método incluye el paso de valorar la capacidad de una célula epidérmica para estimular la pérdida capilar. El método incluye el paso de valorar, o sea p. ej. detectar, una lesión genética en un gen Wnt, o valorar, o sea p. ej. detectar, la subexpresión del gen Wnt.

En una realización preferida, el gen o proteína Wnt es Wnt3, como p. ej. Wnt3a o Wnt3b; Wnt4; o Wnt7, como p. ej. Wnt7a o 7b. En una realización particularmente preferida, la proteína Wnt es Wnt3, y con la máxima preferencia Wnt3a.

En una realización preferida, el método incluye el paso de valorar en una muestra de células epidérmicas del sujeto la presencia o ausencia de una lesión genética, como p. ej. una mutación del gen que codifica una proteína Wnt. La presencia de una lesión genética es indicativa de un riesgo de pérdida capilar en un sujeto.

En otra realización preferida, el método incluye el paso de evaluar en una muestra de células epidérmicas los niveles de expresión de la Wnt para determinar la subexpresión. La subexpresión de Wnt es indicativa de un riesgo de pérdida capilar.

En una realización preferida, la lesión genética es valorada poniendo a la muestra en contacto con una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse con mRNA de Wnt, y p. ej. con una sonda marcada. En otra realización preferida, la expresión de Wnt es valorada con un anticuerpo capaz de fijarse a la proteína Wnt, y p. ej. con un anticuerpo marcado.

En otra realización, el método incluye el paso de valorar la capacidad de una célula epidérmica para estimular el crecimiento capilar. El método incluye el paso de valorar, o sea p. ej. detectar, la ausencia o presencia de una lesión genética en un gen Wnt, o evaluar, o sea p. ej. detectar, la sobreexpresión del gen Wnt.

5 En una realización preferida, el gen o proteína Wnt es Wnt3, como p. ej. Wnt3a o Wnt3b; Wnt4; o Wnt7, como p. ej. Wnt7a o 7b. En una realización particularmente preferida, la proteína Wnt es Wnt3, y con la máxima preferencia Wnt3a.

10 En una realización preferida, el método incluye el paso de evaluar en una muestra de células epidérmicas del sujeto la presencia o ausencia de una lesión genética, como p. ej. una mutación del gen que codifica una proteína Wnt. La ausencia de una lesión genética es indicativa de un potencial de crecimiento capilar.

15 En otra realización preferida, el método incluye el paso de evaluar en una muestra de células epidérmicas los niveles de expresión de Wnt para determinar la sobreexpresión. La sobreexpresión de Wnt es indicativa de un potencial de crecimiento capilar.

20 En una realización preferida, la lesión genética es valorada poniendo a la muestra en contacto con una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse con mRNA de Wnt, y p. ej. con una sonda marcada. En otra realización preferida, la expresión de Wnt es valorada con un anticuerpo capaz de fijarse a la proteína Wnt, y p. ej. con un anticuerpo marcado.

25 En otro aspecto, la invención presenta un método para identificar un compuesto capaz de estimular el crecimiento capilar. El método incluye los pasos de: poner a una célula capaz de expresar un polipéptido Wnt en contacto con un compuesto de ensayo; y determinar el nivel de expresión de polipéptido o ácido nucleico de Wnt, siendo un compuesto capaz de incrementar la expresión de polipéptido o ácido nucleico de Wnt indicativo de un compuesto capaz de estimular el crecimiento capilar.

30 En una realización preferida, el gen o proteína Wnt es Wnt3, como p. ej. Wnt3a o Wnt3b; Wnt4; o Wnt7, como p. ej. Wnt7a o 7b. En una realización particularmente preferida, la proteína Wnt es Wnt3, y con la máxima preferencia Wnt3a.

35 En una realización preferida, el compuesto es un fragmento o análogo de Wnt.

40 En una realización preferida, el método incluye adicionalmente el paso de valorar una célula de control, como p. ej. una célula idéntica que no es tratada con el compuesto.

45 En una realización preferida, la célula es una célula epidérmica, como p. ej. una célula epidérmica de un folículo piloso; o una célula DP.

50 En una realización preferida, la expresión de ácido nucleico de Wnt es valorada usando una sonda de ácido nucleico, como p. ej. una sonda marcada, capaz de hibridarse con una molécula de ácido nucleico de Wnt, como p. ej. mRNA de Wnt. En una realización preferida, la expresión de ácido nucleico de Wnt, y p. ej. la expresión de DNA, es evaluada poniendo a un compuesto en contacto con una molécula de ácido nucleico de Wnt, y p. ej. con una secuencia reguladora de una molécula de ácido nucleico de Wnt, y evaluando la transcripción de Wnt *in vitro* o *in vivo*, o sea que p. ej. la transcripción de Wnt es valorada determinando una actividad celular, p. ej. usando un gen marcador, como p. ej. un gen lacZ o un gen de proteína de fluorescencia verde (GFP), unido a la secuencia reguladora de Wnt y siguiendo la producción del marcador.

55 En una realización preferida, la expresión de polipéptido Wnt es valorada usando un anticuerpo anti-Wnt, como p. ej. un anticuerpo anti-Wnt marcado.

60 Un método para identificar un compuesto capaz de inhibir el crecimiento capilar incluye los pasos siguientes: poner a una célula capaz de expresar un polipéptido Wnt en contacto con un compuesto de ensayo; y determinar el nivel de expresión de polipéptido o ácido nucleico de Wnt en presencia y en ausencia del compuesto, siendo un compuesto capaz de reducir la expresión de polipéptido o ácido nucleico de Wnt indicativo de un compuesto capaz de inhibir el crecimiento capilar.

65 En una realización preferida, el polipéptido Wnt es Wnt3, como p. ej. Wnt3a o Wnt3b; Wnt4; o Wnt7, como p. ej. Wnt7a o 7b. En una realización particularmente preferida, la proteína Wnt es Wnt3, y con la máxima preferencia Wnt3a.

En una realización preferida, la expresión de ácido nucleico de Wnt es valorada usando una sonda de ácido nucleico, y p. ej. una sonda marcada, capaz de hibridarse con una molécula de ácido nucleico de Wnt, como p. ej. mRNA de Wnt. En una realización preferida, la expresión de ácido nucleico de Wnt, como p. ej. la expresión de DNA, es valorada poniendo a un compuesto en contacto con una molécula de ácido nucleico de Wnt, y p. ej. con una secuencia reguladora de una molécula de ácido nucleico de Wnt, y valorando la transcripción de Wnt *in vitro* o *in vivo*, y la transcripción de Wnt es valorada determinando una actividad celular, p. ej. usando un gen marcador, como p. ej. un gen lacZ o un gen GFP unido a la secuencia reguladora de Wnt y siguiendo la producción del marcador.

ES 2 290 125 T3

En una realización preferida, la expresión de polipéptido Wnt es valorada usando un anticuerpo anti-Wnt, y p. ej. un anticuerpo anti-Wnt marcado.

En otro aspecto, la invención presenta un método para cultivar una célula DP. Dicha célula puede ser por ejemplo una célula DP humana o no humana, o sea p. ej. de roedor, y p. ej. de rata o ratón. El método incluye el paso de cultivar la célula DP en presencia de un nivel incrementado de Wnt, de otra proteína que intervenga en la activación de la vía de señalización de Wnt- β -catenina, como p. ej. β -catenina y/o LEF-1, y/o de un agente que imite un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. la inhibición de la fosforilación de β -catenina, p. ej. mediante la inhibición de quinasa GSK3 β o la acumulación de β -catenina.

En una realización preferida, el nivel de Wnt es incrementado a través de células DP en ausencia de Wnt.

En una realización preferida, la proteína Wnt es Wnt3, como p. ej. Wnt3a o Wnt3b; Wnt4; o Wnt7, como p. ej. Wnt7a o 7b. En una realización particularmente preferida, la proteína Wnt es Wnt3, y con la máxima preferencia Wnt3a.

En una realización preferida, la célula DP es propagada *in vitro*. En una realización preferida, la célula DP es cultivada para incrementar el número de células DP.

En una realización preferida, es añadido al cultivo un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo. En otra realización preferida, es añadido al cultivo un agente que imita un efecto de la transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. la inhibición de la fosforilación de β -catenina, p. ej. mediante inhibición de quinasa GSK3 β o acumulación de β -catenina. Los ejemplos de agentes que pueden imitar un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt incluyen inhibidores de quinasa GSK3 β tales como cloruro de litio o pequeños iones similares.

En otra realización preferida, la célula DP es cultivada en presencia de una célula que expresa un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo.

En una realización preferida, la célula DP es obtenida de un sujeto, cultivada con un nivel incrementado de Wnt o un agente que imite un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. la inhibición de la fosforilación de β -catenina, p. ej. mediante inhibición de quinasa GSK3 β o acumulación de β -catenina, y luego devuelta al mismo sujeto o a un sujeto distinto.

En una realización preferida, la célula DP es mantenida en cultivo y luego las células DP cultivadas son devueltas al mismo sujeto o a un sujeto distinto para incrementar la cantidad de crecimiento capilar en el individuo.

En otra realización preferida, la invención presenta un método para prever y mantener un injerto de células de papila dérmica, como p. ej. un injerto DP para procedimientos de trasplante capilar. El método incluye el paso de cultivar una célula DP o células DP en presencia de Wnt o un fragmento o análogo de la misma, otra proteína que intervenga en la activación de la vía de señalización de Wnt- β -catenina (como p. ej. β -catenina y/o LEF-1) o un fragmento o análogo de la misma, y/o un agente que imite un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. la inhibición de la fosforilación de β -catenina, p. ej. mediante inhibición de quinasa GSK3 β o acumulación de β -catenina.

En una realización preferida, la célula DP es propagada *in vitro*. En una realización preferida, la célula DP es propagada *in vitro* para incrementar el número de células DP.

En una realización preferida, es añadido al cultivo un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo. En otra realización preferida, es añadido al cultivo un agente que imita un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. la inhibición de la fosforilación de β -catenina, p. ej. mediante inhibición de quinasa GSK3 β o acumulación de β -catenina. Los ejemplos de agentes que imitan un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt incluyen inhibidores de quinasa GSK3 β tales como cloruro de litio o pequeños iones similares.

En otra realización preferida, la célula DP es cultivada en presencia de una célula que expresa un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo.

En una realización preferida, la célula DP es obtenida de un sujeto, cultivada con un nivel incrementado de Wnt o un agente que imita un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. la inhibición de la fosforilación de β -catenina, p. ej. mediante inhibición de quinasa GSK3 β o acumulación de β -catenina, y luego devuelta al mismo sujeto o a un sujeto distinto.

En otro aspecto, la invención presenta un medio para cultivar células DP que incluye un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo, o un agente que imita un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. la inhibición de la fosforilación de β -catenina, p. ej. mediante inhibición de quinasa GSK3 β o acumulación de β -catenina. Los ejemplos de agentes que imitan un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt incluyen inhibidores de quinasa GSK3 β tales como cloruro de litio o pequeños iones similares.

En otro aspecto, la invención presenta un método para estimular o mantener la expresión del gen de la fase de anágeno de células de DP. El método incluye el paso de incrementar el nivel de proteína Wnt o imitar un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. la inhibición de la fosforilación de β -catenina, p. ej. mediante inhibición de quinasa GSK3 β o acumulación de β -catenina, para con ello estimular o mantener la expresión del gen de la fase de anágeno en las células DP. En otra realización preferida, el método incluye el paso de incrementar la activación de la vía de señalización de Wnt- β -catenina para con ello estimular o mantener la expresión del gen de la fase de anágeno en las células DP.

En una realización preferida, la proteína Wnt es Wnt3, como p. ej. Wnt3a o Wnt3b; Wnt4; o Wnt7, como p. ej. Wnt7a o 7b. En una realización particularmente preferida, la proteína Wnt es Wnt3, y con la máxima preferencia Wnt3a.

En una realización preferida, el nivel de Wnt es incrementado o un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt es imitado mediante un agente que debe ser administrado e incrementa el nivel de producción de proteína Wnt y/o imita un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. la inhibición de la fosforilación de β -catenina, p. ej. mediante inhibición de quinasa GSK3 β o acumulación de β -catenina. Un agente que incrementa el nivel de proteína Wnt y/o imite un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt puede ser uno o varios de los siguientes: un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo, como aquí se describe; una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo, como aquí se describe; un agente que incrementa la expresión de ácido nucleico de Wnt, como p. ej. una pequeña molécula que se fije a la región promotora de Wnt; y un agente que imite un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. la inhibición de la fosforilación de β -catenina, p. ej. mediante inhibición de quinasa GSK3 β o acumulación de β -catenina. Los ejemplos de agentes que pueden imitar la transducción de señales estimulada por Wnt incluyen inhibidores de GSK3 β , como p. ej. cloruro de litio o pequeños iones similares, agentes que fijan Frizzled e imitan la fijación de Wnt, como p. ej. anticuerpos anti-Frizzled, u otros ligandos de fijación de Frizzled de los que se dan de manera natural o de manera no natural.

En una realización preferida, el método puede ser ejecutado *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, las células DP pueden ser mantenidas en una fase de anágeno en cultivo, y pueden ser luego administradas a un sujeto, p. ej. para incrementar el crecimiento capilar. Tales métodos pueden incluir el paso de mantener a las células DP en cultivo en presencia de Wnt o de un agente que imite un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. la inhibición de la fosforilación de β -catenina, p. ej. mediante inhibición de quinasa GSK3 β o acumulación de β -catenina. En una realización, puede añadirse al cultivo Wnt y/o un agente que imite un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. un inhibidor de quinasa GSK3 β , como p. ej. cloruro de litio o pequeños iones similares. En otra realización, la célula DP puede ser cocultivada con una célula que exprese Wnt, como p. ej. una célula que exprese Wnt de manera natural o haya sido manipulada genéticamente para expresar Wnt. Las células DP mantenidas en la fase de anágeno pueden ser entonces usadas p. ej. en procedimientos de injerto de DP. Las células DP pueden ser obtenidas del sujeto que recibirá el injerto de DP (es decir que serán células autólogas), o bien pueden ser obtenidas de un sujeto distinto (siendo entonces p. ej. células alogénicas o xenogénicas).

En una realización preferida, la Wnt es incrementada mediante una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo y debe ser administrada, o sea p. ej. introducida en una célula determinada, como p. ej. una célula epidérmica o una célula DP, y/o en un sujeto. La secuencia de nucleótidos puede ser una secuencia genómica o una secuencia de cDNA. La secuencia de nucleótidos puede incluir una región de codificación de Wnt; una secuencia promotora, como p. ej. una secuencia promotora de un gen Wnt o de otro gen; una secuencia potenciadora, como p. ej. una región no traducida (UTR) 5', como p. ej. una UTR 5' de un gen Wnt o de otro gen, o una UTR 3', como p. ej. una UTR 3' de un gen Wnt o de otro gen; un sitio de poliadenilación; y una secuencia aislante.

En otra realización preferida, el nivel de proteína Wnt se incrementa a base de incrementar el nivel de expresión de un gen Wnt endógeno, o sea p. ej. a base de incrementar la transcripción del gen Wnt. En una realización preferida, la transcripción del gen Wnt es incrementada mediante la alteración de las secuencias reguladoras del gen Wnt endógeno, p. ej. mediante la adición de un elemento regulador positivo (tal como un potenciador o un sitio de fijación de DNA para un activador transcripcional); la delección de un elemento regulador negativo (tal como un sitio de fijación de DNA para un represor transcripcional) y/o la sustitución de la secuencia reguladora endógena o de elementos de la misma por la de otro gen, permitiendo con ello que sea transcrita más eficazmente la región codificadora del gen Wnt.

En otra realización preferida puede ser introducida en un sujeto una célula, como p. ej. una célula que exprese y preferiblemente secrete una proteína Wnt. En una realización preferida, la célula ha sido modificada genéticamente para expresar una proteína Wnt o un fragmento o un análogo de la misma. La célula puede ser una célula autóloga, alogénica o xenogénica, pero es preferiblemente autóloga. La célula puede ser cualquier tipo de célula, como p. ej. un fibroblasto, un queratinocito, una célula epitelial o una célula endotelial. Preferiblemente, la célula es una célula epitelial, como p. ej. una célula epidérmica o una célula DP. La célula puede ser introducida en un sujeto para incrementar el nivel de proteína Wnt.

En una realización preferida, el agente que incrementa el nivel de proteína Wnt y/o imita un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt debe ser administrado p. ej. a base de administrar tópicamente el agente, de administrar sistémicamente el agente, de administrar oralmente el agente o de inyectar el agente, preferiblemente por vía dérmica

o subcutánea. En realizaciones preferidas, el compuesto es administrado usando un adecuado vehículo de administración, como por ejemplo un agente superficiaactivo o un agente que incrementa la permeabilidad de la piel, como p. ej. una formulación que contenga SDS o DMSO. Preferiblemente, el agente es incluido en una composición para uso tópico, o sea que p. ej. la composición es un gel, una crema o un líquido. En una realización preferida, el agente es administrado mediante administración continua, o sea que p. ej. el agente es administrado con una frecuencia suficiente como para que el efecto ejercido en el nivel de proteína Wnt se mantenga por espacio de un periodo de tiempo seleccionado de p. ej. 10, 20, 30, 50, 90, 180 o 365 días o más. En otra realización preferida, la administración del agente es repetida, o sea que p. ej. dicha administración es repetida al menos 1, 2, 3, 5, 10, 20 o más veces.

En una realización preferida, la expresión del gen de la fase de anágeno es estimulada o mantenida en el cuero cabelludo del sujeto o en la cara del sujeto, como p. ej. en el labio superior y/o en la barbilla.

En otro aspecto, la invención presenta un método para estimular o mantener la actividad inductiva capilar. El método incluye los pasos de incrementar el nivel de proteína Wnt y/o imitar un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. la inhibición de la fosforilación de β -catenina, p. ej. mediante inhibición de quinasa GSK3 β o acumulación de β -catenina, para con ello estimular o mantener la actividad inductiva capilar.

En una realización preferida, la proteína Wnt es Wnt3, como p. ej. Wnt3a o Wnt3b; Wnt4; o Wnt7, como p. ej. Wnt7a o 7b. En una realización particularmente preferida, la proteína Wnt es Wnt3, y con la máxima preferencia Wnt3a.

En una realización preferida, la Wnt es incrementada mediante un agente que incrementa el nivel de producción y/o actividad de proteína Wnt. Un agente que incrementa el nivel de proteína Wnt puede ser uno o varios de los siguientes: un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo; una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo; un agente que incrementa la expresión de ácido nucleico de Wnt, como p. ej. una pequeña molécula que se fije a la región promotora de Wnt; y un agente que imite un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, como p. ej. la inhibición de la fosforilación de β -catenina, p. ej. mediante inhibición de quinasa GSK3 β o acumulación de β -catenina. Los ejemplos de agentes que imitan un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt incluyen inhibidores de quinasa GSK3 β tales como cloruro de litio o pequeños iones similares.

En una realización preferida, la Wnt es incrementada por una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo y debe ser administrada, o sea p. ej. introducida en una célula determinada, como p. ej. una célula epidérmica o una célula DP, en el sujeto. La secuencia de nucleótidos puede ser una secuencia genómica o una secuencia de cDNA. La secuencia de nucleótidos puede incluir una región de codificación de Wnt; una secuencia promotora, como p. ej. una secuencia promotora de un gen Wnt o de otro gen; una secuencia potenciadora, como p. ej. una región no traducida (UTR) 5', como p. ej. una UTR 5' de un gen Wnt o de otro gen, una UTR 3', como p. ej. una UTR 3' de un gen Wnt o de otro gen; un sitio de poliadenilación; o una secuencia aislante.

En otra realización preferida, el nivel de proteína Wnt es incrementado a base de incrementar el nivel de expresión de un gen Wnt endógeno, p. ej. a base de incrementar la transcripción del Wnt. En una realización preferida, la transcripción del gen Wnt es incrementada por medio de la alteración de las secuencias reguladoras del gen Wnt endógeno, p. ej. mediante la adición de un elemento regulador positivo (tal como un potenciador o un sitio de fijación de DNA para un activador transcripcional); o por medio de la delección de un elemento regulador negativo (tal como un sitio de fijación de DNA para un represor transcripcional) y/o la sustitución de la secuencia reguladora endógena, o de elementos de la misma por la de otro gen, permitiendo con ello que sea transcrita más eficazmente la región codificadora del gen Wnt.

En otra realización preferida, se procede a introducir en un sujeto una célula, como p. ej. una célula que exprese y preferiblemente secrete una proteína Wnt. En una realización preferida, la célula ha sido modificada genéticamente para expresar una proteína Wnt o un fragmento o un análogo de la misma. La célula puede ser una célula autóloga, alogénica o xenogeneica, pero es preferiblemente autóloga. La célula puede ser cualquier tipo de célula, como p. ej. un fibroblasto, un queratinocito, una célula epitelial o una célula endotelial. Preferiblemente, la célula es una célula epitelial, como p. ej. una célula epidérmica o una célula DP. La célula puede ser introducida en un sujeto para incrementar el nivel de proteína Wnt y/o para imitar un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt.

En una realización preferida, el agente que incrementa el nivel de proteína Wnt y/o imita la transducción de señales estimulada por Wnt debe ser administrado p. ej. a base de administrar tópicamente el agente, de administrar sistémicamente el agente, de administrar oralmente el agente, o de inyectar el agente, preferiblemente por vía dérmica o subcutánea. En realizaciones preferidas, el compuesto debe ser administrado usando un adecuado vehículo de administración, como por ejemplo un agente superficiaactivo o un agente que incrementa la permeabilidad de la piel, como p. ej. una formulación que contenga SDS o DMSO. Preferiblemente, el agente es incluido en una composición para uso tópico, o sea que p. ej. la composición es un gel, una crema o un líquido. En una realización preferida, el agente debe ser administrado mediante una administración continua, o sea que p. ej. el agente es administrado con una frecuencia suficiente como para que el efecto ejercido en el nivel de proteína Wnt y/o en la vía de señalización Wnt se mantenga por espacio de un periodo de tiempo seleccionado de p. ej. 10, 20, 30, 50, 90, 180 o 365 días o más. En otra realización preferida se repite la administración del agente, o sea que p. ej. dicha administración es repetida al menos 1, 2, 3, 5, 10, 20 o más veces.

En una realización preferida, la actividad inductiva capilar es estimulada o mantenida en el cuero cabelludo del sujeto o en la cara del sujeto, o sea p. ej. en el labio superior y/o la barbilla.

En el sentido en el que se le utiliza en la presente, el vocablo “tratamiento” incluye todo tratamiento terapéutico, como p. ej. la administración de un agente terapéutico o una sustancia terapéutica, como p. ej. un fármaco.

En el sentido en el que se la utiliza en la presente, la expresión “incrementar el crecimiento capilar” se refiere a incrementar el número o la densidad o la distribución de folículos o tallos pilosos o a incrementar de otra manera el crecimiento capilar.

En el sentido en el que se le utiliza en la presente, el vocablo “sujeto” se refiere a un animal, como p. ej. un mamífero, como p. ej. un ser humano. El mamífero puede ser un humano o un mamífero no humano, como p. ej. un cerdo, un pájaro, un gato, un perro, un mono, una cabra o un roedor, como p. ej. una rata o un ratón. El animal puede ser un animal transgénico, como p. ej. un roedor transgénico, como p. ej. una rata transgénica o un ratón transgénico.

La expresión “secuencia reguladora” se refiere a todas o cualesquiera de las secuencias de DNA que controlan la expresión génica. Un ejemplo de una secuencia reguladora incluye un promotor, un elemento regulador positivo (tal como un potenciador o un sitio de fijación de DNA para un activador transcripcional), un elemento regulador negativo (tal como un sitio de fijación de DNA para un represor transcripcional) y un aislante.

El vocablo “heterólogo” se refiere a DNA o tejido que procede de una especie distinta.

La expresión “secuencia reguladora heteróloga” se refiere a una secuencia que no es la secuencia reguladora normal de ese gen.

Los vocablos “péptidos”, “proteínas” y “polipéptidos” son usados aquí indistintamente.

En el sentido en el que se la utiliza en la presente, la expresión “pequeña molécula” incluye péptidos, peptidomiméticos o compuestos no peptídicos tales como moléculas orgánicas que tengan un peso molecular de menos de 2.000, y preferiblemente de menos de 1.000.

La expresión “efectos de transducción de señales estimulada por Wnt” se refiere a uno o varios de los efectos bioquímicos (como p. ej. la modulación de p. ej. las interacciones de fijación de proteínas, la fosforilación o la transcripción) que en una célula, y p. ej. en una célula DP, son iniciados por la señalización Wnt, y p. ej. por la fijación de Wnt a Frizzled. Los efectos de transducción de señales estimulada por Wnt pueden incluir la fijación de Wnt a Frizzled; la inhibición de la fosforilación mediada por GSK3 β ; la inhibición de la degradación de β -catenina dependiente de la fosforilación; la acumulación de proteína β -catenina en el citoplasma; la estabilización de la β -catenina celular; la acumulación de β -catenina en el citoplasma; la fijación de β -catenina a Lef1; la translocación del complejo β -catenina-Lef1 al núcleo; y la estimulación de la transcripción desde genes asociados. Los componentes de la transducción de señales estimulada por Wnt pueden incluir proteína Frizzled, como p. ej. Frizzled-7 (frz-7), proteínas desordenadas, como p. ej. disheveled-2 (disheveled = desordenada) (dsh-2), GSK3, beta catenina, Lef1 y Lef/TFC. Otros efectos y componentes de la vía de señalización Wnt están descritos en Arias y otros (1999) *Curr. Opin. Genet. & Dev.* 9:447-454, que queda incorporada a la presente por referencia.

Otras características y ventajas de la invención quedarán de manifiesto a la luz de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

50 Descripción detallada de la invención

La presente invención está basada en parte en el descubrimiento de que las proteínas Wnt expresadas en el epitelio folicular mantienen la expresión génica de la fase de anágeno en las células de la papila dérmica, y de que la actividad inductiva capilar es también mantenida por la señalización Wnt.

Tanto la formación del folículo piloso durante el desarrollo embrionario como el crecimiento, la quiescencia y la regeneración cíclicos del tallo piloso durante el ciclo capilar son dependientes de la señalización recíproca entre los componentes epidérmicos y dérmicos del folículo.

En la vía de señalización Wnt, la Wnt, que es una molécula soluble, fija a Frizzled (Frz), que es un receptor de superficie celular que se encuentra en varios tipos de células. En presencia de desordenadas, la fijación de Wnt a Frz redundante en la inhibición de la fosforilación mediada por GSK3 β y en la subsiguiente degradación de β -catenina dependiente de la fosforilación. Así, la fijación de Wnt estabiliza la β -catenina celular. En presencia de fijación de Wnt, la β -catenina se acumula en el citoplasma y se fija a Lef1. El complejo β -catenina-Lef1 se transloca entonces al núcleo, donde media la activación transcripcional.

ES 2 290 125 T3

Producción de un Ratón Transgénico que Expresa Proteína Fluorescente Verde en las Células DP

Fue usada para purificar células DP que expresan GFP y estudiar la señales que se requieren para mantener la expresión de GFP una línea de ratones transgénicos que expresa específicamente proteína fluorescente verde (GFP) en las células DP durante la fase de anágeno (crecimiento) del ciclo capilar. La línea de ratones transgénicos fue generada como se describe en Kishimoto y otros (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96:7336-7341. Se descubrió que los folículos pilosos transgénicos aislados en fase de anágeno presentan fluorescencia de GFP en la DP. El transgen versican-GFP es activo durante la fase de anágeno pero está desactivado durante las fases de catágeno y de telógeno del crecimiento capilar. Por consiguiente, la expresión del transgen fue correlacionada con el supuesto perfil de actividad inductiva en la DP.

Análisis de RT-PCR (RT-PCR = transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa)

El RNA total fue aislado y la RT-PCR fue llevada a cabo como se describe en Kishimoto y otros (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7336-7341, usando una temperatura de hibridación de 58°C. Se enumeran a continuación los cebadores que se emplearon. Con la excepción de las Wnts 4, 5 y 7, los cebadores fueron diseñados para distinguir entre los ortólogos de ratón y de pollo y la ausencia de reacción cruzada con las secuencias de polluelo fue confirmada sobre cDNA de células alimentadoras solamente.

20	Wnt3: G CGC CCT GGC TCA CTA C y ATG CTG CTG CTG CTG GCC	(SEQ ID NO: 1) (SEQ ID NO: 2) para 30 ciclos
25	Wnt4: TGA TCC AGA GGC AGG TGC AG y CTT CTC CAG TTC TCC ACT GC	(SEQ ID NO: 3) (SEQ ID NO: 4) para 36 ciclos
30	Wnt5a: CTG TTG AC TGC ACC AGC TT Y TCA AGG AAT GCC AGT ACC AGT ACC AG	(SEQ ID NO: 5) (SEQ ID NO: 6) para 30 ciclos
	Frizzled-7: CTG CTA GAG GAC CGT GCC y AGG TGC GTT CCC AGT GCT	(SEQ ID NO: 7) (SEQ ID NO: 8) para 36 ciclos
35	Disheveled-2: CAT CCT TCA GCA GTG TCA y CGT CAT TGT CAT TCA GAG	(SEQ ID NO: 8) (SEQ ID NO: 10) para 36 ciclos
40	CSK-3 β : CAG GGC ACC AGA GTT GAT y GCA GAA GCG GCG TTA TTG	(SEQ ID NO: 11) (SEQ ID NO: 12) para 30 ciclos
	β -catenina: CCA CCA GCT AGG CGC ACT y GGG CTC AGA GGG TCC GAG	(SEQ ID NO: 13) (SEQ ID NO: 14) para 30 ciclos
45	LEF-1: ACT GTC AGG CGA CAC TTC C y TGC ACG TTG GGA AGG AGC	(SEQ ID NO: 15) (SEQ ID NO: 16) para 36 ciclos
50	Shh: para 30 ciclos	(SEQ ID NO: 17 & 18)
	Patched-1: AGC CTC ACA GTA ACA CCC y TGT TCT CCT CCA GCA TGA	(SEQ ID NO: 20) (SEQ ID NO: 21) para 36 ciclos
55	Gli-1: TTG GGG ATG CTG GAT GGG y CGG TCA CTG GCA TTG CTA	(SEQ ID NO: 22) (SEQ ID NO: 23) para 36 ciclos
60	β -actina: 5'-CCA CAC CCG CCA CCA GTT C-3' y 5'-GAGGAAGAGGATGCGGCA-3'	(SEQ ID NO: 24) (SEQ ID NO: 25) para 26 ciclos
65	GPF: 5'-TGCACTGCTTCAGCCGCTAC-3' y 5' -CTCGTTGGGGTCTTTGCTA-3'	(SEQ ID NO: 26) (SEQ ID NO: 27) para 26 ciclos.

Cultivo Celular

Fueron obtenidas células DP del pelaje de ratón recién obtenido de la piel de neonato transgénico versican GFP mediante separación celular a alta velocidad (MoFLO) como se ha descrito anteriormente en Kishimoto y otros, *supra*.
 5 Fibroblastos de embrión de polluelo (CEFs) fueron infectados con vectores retrovirales RCASBP(A) que codifican Shh de polluelo, como se describe en Riddle y otros (1993) *Cell* 75:1401-1416, Wnt3a como se describe en Kengaku y otros (1998) *Science* 280:1274-1277, Wnt4, Wnt5a (Noramly y Morgan, en preparación) o Wnt7a, como se describe en Riddle y otros (1995) *Cell* 83:631-640, o vector solamente como se describe en Morgan y otros en *Methods in Cell Biology* (ed. Bonner-Fraser) pp. 185-218 (Academic Press, San Diego, 1996). Células DP de ratón positivas
 10 para GFP fueron añadidas sobre un 30-50% de células alimentadoras confluentes para alcanzar una proporción de 1:3 (ratón:polluelo). Para el análisis por citometría de flujo, las células fueron cocultivadas en cápsulas de 24 cavidades por espacio de 48-96 h. Para el experimento de injerto se hizo 2-3 veces un repetido subcultivo de las células cocultivadas en cápsulas de 10 cm para generar las 2×10^6 células que se requerían para cada injerto.

15 *Citometría de Flujo*

Las células fueron tripsinizadas y puestas nuevamente en suspensión en 0,5 ml de PBS (PBS = salina tamponada con fosfato) con un 1% de BSA (BSA = albúmina bovina sérica). El análisis por citometría de flujo fue llevado a cabo mediante citómetro FACScan (Becton Dickinson). Las células DP fueron marcadas con anticuerpo monoclonal MHC
 20 clase II de ratón e incubadas con IgG secundaria conjugada con PE. Las células aviares PE negativas quedaron por debajo de la marca inferior en la Fig. 3 y fueron excluidas del análisis de expresión de GFP.

Ensayo de Reconstitución

25 El ensayo de reconstitución fue llevado a cabo como se describe en Kishimoto y otros, *supra*. Queratinocitos primarios fueron preparados a partir de 2 crías neonatas por injerto y combinados con 2×10^6 células DP en la cámara de injerto. El crecimiento capilar fue supervisado a las dos semanas del injerto y semanalmente a continuación.

Producción de Cultivo Celular de Células DP que expresan GFP

30 Células de papila dérmica en fase de anágeno de la piel del ratón transgénico anteriormente descrito fueron purificadas hasta la homogeneidad usando un separador de células activado por fluorescencia y se vio que conservaban actividad inductiva capilar en un ensayo de reconstitución de piel. Sin embargo, usando análisis por citometría de flujo de la expresión de GFP en las células DP inmediatamente después del aislamiento y después de 90 horas en cultivo, se
 35 comprobó que se perdían rápidamente en cultivo la actividad inductiva y la expresión de GFP de las células DP. Esto sugiere que un factor que es normalmente suministrado por las células epidérmicas era necesario para mantener a las células DP en el estado anágeno.

Análisis del Papel de Shh en la Fase de Anágeno

40 Un candidato para la señal suministrada por las células epidérmicas era el Shh, que es expresado en el componente epidérmico del folículo piloso y es requerido para la maduración de la papila dérmica durante el desarrollo embrionario. Véase, p. ej., St. Jacques (1998) *Curr. Biol.* 8:1058-1068. Durante el ciclo capilar, el Shh exógeno puede acelerar la transición de telógeno a anágeno. Sato y otros (1999) *J. Clin. Invest.* 104:855-864. La expresión de los genes Shh, patched-1 (ptc-1), Gli-1 y del control de β -actina fue analizada en células DP inmediatamente después del aislamiento
 45 y después de tres pases en cultivo. En la piel de ratones transgénicos neonatos que experimentaban crecimiento capilar activo, fue detectado mRNA de Shh en la población GFP negativa de células seleccionadas, lo cual incluye la epidermis folicular, y el mismo estaba ausente de las células de papila dérmica. El Ptc-1 y el Gli-1 son expresados en la DP aislada, pero los niveles de transcripción disminuían al ser efectuado pase en cultivo. La realimentación transcripcional en la cascada de transducción de señales de Shh redundante en una incrementada acumulación de mRNA que codifica dos de sus componentes, que son el patched (ptc) y el Gli-1, en respuesta a la señalización Shh. Esta inducción sirve como una indicación de respuesta a la señal de Shh. Goodrich y otros (1996) *Genes Dev.* 10:301-312; Marigo y otros (1996) *Development* 122:1225-1233. Fue fácilmente detectado el mensaje de ambos genes en células DP recién separadas, pero la abundancia de ambos mensajes disminuye hasta niveles indetectables cuando las células
 55 DP aisladas fueron cultivadas en ausencia de epitelio folicular. Así, la señalización Shh del epitelio folicular a la papila dérmica se produce en el folículo piloso y podría causar la activación de DP en anágeno. Por consiguiente, se valoró si la señalización Shh era suficiente para rescatar la expresión del gen de GFP o la actividad inductiva capilar en las células DP mantenidas en cultivo. Células DP recién aisladas fueron cocultivadas con CEFs que expresaban Shh o estaban infectados con un vector de control. El uso de células alimentadoras heteroespecíficas permitió la analización de la expresión del gen en las células DP por PCR con cebadores específicos de especie y confirma que las células DP recibían la señal de Shh como queda demostrado por la inducción y el mantenimiento tanto de ptc-1 como de Gli-1, mientras que la expresión de ambos genes disminuye en las células DP cocultivadas con células alimentadoras de control. Se usaron secuencias de β -actina para normalizar el cDNA de entrada y se emplearon cebadores murino-específicos para discriminar entre la expresión génica en las poblaciones de células DP y alimentadoras. Sin embargo,
 60 como queda demostrado mediante análisis por citometría de flujo de cocultivos de células DP con capas alimentadoras que producen Wnt3 o Shh o están infectadas con vectores de control, la expresión de GFP declinaba a velocidades idénticas en las poblaciones tratadas con Shh y de control. Adicionalmente fue confirmada para cada tratamiento la proporción de células GFP positivas y GFP negativas. Para confirmar la correlación entre la expresión de GFP y el

mantenimiento del estado de anágeno, estas células fueron mezcladas con queratinocitos e injertadas en cámaras de burbujas en los dorsos de ratones desnudos como huéspedes. En este ensayo se observó la piel sin pelo que se forma en ausencia de células DP activas tanto si las células DP habían sido cultivadas en presencia de Shh como si no lo habían sido. Ambos injertos de células DP de control o tratadas con Shh presentaban solamente ocasionales pelos a las tres semanas del injerto en el modelo de ratón desnudo. Véase la Tabla 1.

Puesto que los experimentos *in vivo* han sugerido que el Shh estimula la transición de telógeno a anágeno, se evaluó también si la señalización Shh era suficiente para activar las células DP aisladas que habían sido mantenidas en cultivo hasta ser las mismas formalmente análogas a las células DP en fase de telógeno por cuanto que se habían perdido tanto la expresión de GFP como la actividad inductiva capilar. De nuevo no se observó variación alguna de cualquiera de dichas propiedades. Así, a pesar de que el Shh puede iniciar la fase de anágeno *in vivo*, es probable que el mismo actúe en la DP en parte indirectamente, posiblemente por medio de la inducción de una señal secundaria en la epidermis.

15 *Análisis del Papel de Wnt en la Fase de Anágeno*

Una búsqueda de la secuencia en el potenciador versican que se usa para gobernar la expresión de GFP en la DP reveló un motivo de fijación Lef/TCF y sugirió que una Wnt podría servir de señal de la epidermis que activa las células DP. Este sitio de fijación parece ser requerido para la expresión de GFP porque no se observó expresión GFP en diez líneas transgénicas independientes cuando esta región fue deletada del constructo de expresión. Sin embargo, las deleciones de otras partes en el constructo no tenían efecto alguno en la expresión de GFP en ratones transgénicos. La familia Lef/TCF de proteínas de fijación de DNA media los efectos transcripcionales de señalización Wnt por la vía de la β -catenina. Arias y otros (1999) *Curr. Opin. Genet. & Dev.* 9:447-454. Las Wnts son glicoproteínas secretadas que se fijan a Frizzled. En un proceso dependiente de proteínas desordenadas, la ocupación de receptores de Frizzled inhibe la fosforilación de β -catenina por un complejo que incluye GSK3. Esto redundante en acumulación de proteína β -catenina en el citoplasma y translocación al núcleo, donde puede fijar Lef/TCF y estimular la transcripción desde genes asociados. En células DP recién aisladas, Frizzled-7 (*frz-7*), *dishevelled-2* (*dsh-2*), GSK3, β -catenina, Lef1 y el transgen GFP son todos ellos expresados. Así, los componentes de esta cascada de transducción de señales eran expresados en las células DP recién aisladas. Después de tres pases se ven reducidas las expresiones de *rfz-7*, *dsh-2* y Lef1. Además, es expresada Wnt3a en las células de matriz folicular y fueron detectados transcritos de Wnt3a, 5a y 7a en la población GFP negativa de piel disociada, lo cual incluye los epitelios foliculares de folículos pilosos en fase de anágeno. Así, todas estas Wnts son candidatas a mediar la señalización a la papila térmica.

Células alimentadoras que expresaban las Wnts 3a, 4, 5a o 7a fueron usadas para probar los efectos de la señalización Wnt en las células DP recién aisladas. El cocultivo con Wnts3a o 7a redundó en un mantenimiento de la fluorescencia de GFP en la mayoría de las células DP como queda demostrado por el análisis con FACS (FACS = separador de células activado por fluorescencia). La RT-PCR confirmó que esto refleja unos incrementados niveles de RNA de GFP en lugar de una estabilización de la proteína codificada. En particular, los niveles de RNA de GFP son mantenidos por la exposición a Wnt3a pero no a Shh o a las capas alimentadoras de control. Las células que expresaban Wnt4 también presentaron cierto mantenimiento de la expresión de GFP pero eran menos potentes que la Wnt3a o 7a, mientras que la Wnt5a carecía de efecto en la expresión de GFP de DP. Como sugería la expresión de GFP, la actividad inductiva capilar de las células DP era también mantenida en cultivo por la señalización Wnt. Cuando las células DP murinas fueron separadas de nuevo, combinadas con queratinocitos y usadas para reconstituir piel en un huésped ratón desnudo, las células tratadas con Wnt3a o 7a presentaron un espectacular incremento del crecimiento capilar en comparación con las células cocultivadas con células alimentadoras de control o células de expresión de Shh. Los injertos de células DP de control y tratadas con Shh tan sólo presentaban algún pelo ocasional a las tres semanas del injerto, mientras que las células DP expuestas a Wnt3a formaban una densa mata de pelo en el injerto. Véase la Tabla 1.

Mientras que la Wnt3a es suficiente para mantener a las células DP en el estado anágeno, dicha proteína no puede reactivar la expresión de GFP o la actividad inductiva capilar en las células que han perdido estas propiedades en cultivo (datos no indicados). El análisis de transcritos que codifican componentes de la cascada de transducción de señales de Wnt revela que el Lef-1, el *dishevelled-2* y el *Frizzled-7* son todos ellos regulados hacia abajo tras el mantenimiento en cultivo en ausencia de Wnts, y esto podría explicar la incapacidad de la Wnt exógena para reactivar la expresión de GFP en estas células. El mantenimiento de la expresión de proteínas que se requieren para la transducción de señales de Wnt por parte de otros factores expresados localmente en la epidermis podría contribuir a la coordinación de la morfogénesis en el folículo. Los hallazgos sobre los que aquí se informa sugieren la posibilidad de que una única Wnt expresada en la epidermis pudiera coordinar el desarrollo tanto en la dermis como en la epidermis.

Los resultados demuestran que la Wnt3a y posiblemente otras Wnts expresadas en el folículo piloso en estado anágeno, puede o pueden actuar como señales inductivas para mantener a la papila dérmica en un estado anágeno. Los resultados también sugieren que la señalización Shh no es suficiente para iniciar o mantener el estado anágeno de las células DP, y puede por consiguiente actuar al menos en parte indirectamente para suscitar la transición al estado anágeno *in vivo*. Finalmente, estos resultados extienden la correlación entre la expresión de GFP en estas células DP transgénicas y su capacidad para inducir el crecimiento capilar, y por consiguiente sugieren un adicional uso de este enfoque para diseccionar la señalización entre epitelio y mesénquima para coordinar la morfogénesis.

Polipéptidos Wnt y Secuencias de Ácido Nucleico que Codifican Wnt

- Los polipéptidos Wnt pueden ser obtenidos de varias maneras entre las que se incluyen el aislamiento de Wnt o la expresión de una secuencia que codifique Wnt por métodos de ingeniería genética. Las secuencias de nucleótidos de varias proteínas Wnt de varias especies son conocidas. Véanse, p. ej., Gavin y otros (1990) *Genes Dev.* 4:2319-2332; Lee y otros (1995) *Proc. Natl Acad. Sci USA* 92:2268-2272; y Christiansen y otros (1995) *Mech. Dev.* 51:341-350 (que describe p. ej. las proteínas murinas Wnt1, Wnt2, Wnt3a, Wnt3b, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10b, Wnt11 y Wnt12) y Vant Veer y otros (1984) *Mol. Cell Biol.* 4:2532-2534; Wainwright y otros (1988) *EMBO J.* 7:1743-1748; y la Publicación WO 95/17416 al amparo del PCT (PCT = Tratado de Cooperación en Materia de Patentes) (que describe p. ej. las proteínas humanas Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a y Wnt7b).

Análogos de Wnt u otras Proteínas que Intervienen en la Vía de Señalización de Wnt- β -catenina

- Los análogos pueden diferenciarse de la proteína que se da de manera natural en la secuencia de aminoácidos o de maneras que no implican a la secuencia, o de ambas maneras. Las modificaciones que no implican a la secuencia incluyen la derivatización química de la proteína *in vivo* o *in vitro*. Las modificaciones que no implican a la secuencia incluyen variaciones en la acetilación, la metilación, la fosforilación, la carboxilación y la glicosilación.
- Los análogos preferidos incluyen a una proteína, como p. ej. Wnt (o a fragmentos biológicamente activos de la misma) cuyas secuencias se diferencian de la secuencia de tipo salvaje en una o varias sustituciones conservadoras de aminoácidos o en una o varias sustituciones, deleciones o inserciones no conservadoras de aminoácidos que no abulen la actividad biológica. En una realización preferida, la secuencia puede diferenciarse de la secuencia de tipo salvaje en 1, 2, 3, 5 o 10 pero no más de 20 a 30 residuos de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras típicamente incluyen a la sustitución de un aminoácido por otro de características similares, como son p. ej. las sustituciones dentro de los grupos siguientes: valina, glicina; glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. Pueden tomarse de la tabla siguiente otras sustituciones conservadoras.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Sustituciones conservadoras de aminoácidos

Para el aminoácido	Código	Sustituirlo con cualquiera de éstos
Alanina	A	D-Ala, Gly, beta-Ala, L-Cys, D-Cys
Arginina	R	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Asparagina	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Ácido aspártico	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Cisteína	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Glutamina	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Ácido glutámico	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Glicina	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, β -Ala Acp
Isoleucina	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Leucina	L	D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Lisina	K	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Metionina	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Fenilalanina	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4 ó 5-fenilprolina, cis-3,4 ó 5-fenilprolina
Prolina	P	D-Pro, Ácido L-I.tiazolidina-4-carboxílico, ácido D- o L-1-oxazolidina-4-carboxílico
Serina	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Treonina	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Tirosina	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Valina	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

Otros análogos dentro de la invención son los que tienen modificaciones que incrementan la estabilidad del péptido, y tales análogos puede contener, por ejemplo, uno o varios enlaces no peptídicos (que sustituyen a los enlaces peptídicos) en la secuencia peptídica. Están también incluidos los análogos que incluyen residuos distintos de los L-aminoácidos que se dan de manera natural, como p. ej. D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos o que no se dan de manera natural, como p. ej. los β o γ aminoácidos; y los análogos cíclicos.

Producción de Fragmentos y Análogos

Generación de Fragmentos

Los fragmentos de una proteína pueden ser producidos de varias maneras, como p. ej. por vía recombinante, mediante digestión proteolítica o mediante síntesis química. Pueden generarse fragmentos internos o terminales de

un polipéptido retirando uno o varios nucleótidos de un extremo (para un fragmento terminal) o de ambos extremos (para un fragmento interno) de un ácido nucleico que codifique el polipéptido. La expresión del DNA mutagenizado produce fragmentos polipeptídicos. La digestión con endonucleasas “roedoras de los extremos” puede así generar DNA's que codifican un conjunto de fragmentos. Los DNA's que codifican fragmentos de una proteína pueden también ser generados mediante corte aleatorio, digestión de restricción o una combinación de los métodos anteriormente expuestos.

Los fragmentos pueden ser también sintetizados químicamente usando técnicas de las que son conocidas en el ramo, tales como la química f-Moc o t-Boc en fase sólida según Merrifield convencional. Por ejemplo, los péptidos de la presente invención pueden ser divididos arbitrariamente en fragmentos de la longitud deseada sin solapamiento de los fragmentos, o bien pueden ser divididos en fragmentos solapados de la longitud deseada.

Generación de Análogos: Producción de Secuencias Peptídicas y de DNA Alteradas por Métodos Aleatorios

Pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos de una proteína por mutagénesis aleatoria de DNA que codifique una proteína o un determinado dominio o región de una proteína. Los métodos que son útiles incluyen la mutagénesis por PCR y la mutagénesis de saturación. Puede también generarse una biblioteca de variantes de secuencias de aminoácidos aleatorias mediante la síntesis de un conjunto de secuencias de oligonucleótidos degenerados. (Se indican aquí en otros sitios los métodos para seleccionar proteínas en una biblioteca de variantes).

Mutagénesis por PCR

En la mutagénesis por PCR, la reducida fidelidad de la Taq polimerasa es usada para introducir mutaciones aleatorias en un fragmento clonado de DNA (Leung y otros, 1989, *Technique* 1:11-15). Éste es un muy potente y relativamente rápido método para introducir mutaciones aleatorias. La región de DNA a mutagenizar es amplificada usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bajo condiciones que reducen la fidelidad de la síntesis de DNA por la Taq DNA polimerasa, p. ej. usando una relación dGTP/dATP de cinco y añadiendo Mn^{2+} a la reacción PCR. Los de la colección de fragmentos de DNA amplificado son insertados en apropiados vectores de clonación para obtener bibliotecas de mutantes aleatorios.

Mutagénesis de Saturación

La mutagénesis de saturación permite la rápida introducción de un gran número de sustituciones de bases individuales en fragmentos de DNA clonado (Mayers y otros, 1985, *Science* 229:242). Esta técnica incluye la generación de mutaciones, p. ej. mediante tratamiento químico o irradiación de DNA de una sola hebra *in vitro*, y síntesis de una hebra de DNA complementario. La frecuencia de mutación puede ser modulada a base de modular la severidad del tratamiento, y en esencia pueden ser obtenidas todas las posibles sustituciones de bases. Debido al hecho de que este procedimiento no supone una selección genética de fragmentos mutantes, son obtenidas tanto sustituciones neutras como las que alteran la función. La distribución de mutaciones puntuales no presenta tendencia a los elementos de secuencia conservada.

Oligonucleótidos Degenerados

Puede también generarse una biblioteca de homólogos a partir de un conjunto de secuencias de oligonucleótidos degenerados. La síntesis química de secuencias degeneradas puede ser realizada en un sintetizador de DNA automático, y los genes sintéticos pueden ser entonces ligados a un apropiado vector de expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados es conocida en la técnica (véanse, por ejemplo, Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura y otros (1981) *Recombinant DNA, Proc 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp. 273-289; Itakura y otros (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura y otros (1984) *Science* 198:1056; Ike y otros (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477). Tales técnicas han sido empleadas en la evolución dirigida de otras proteínas (véanse, por ejemplo, Scott y otros (1990) *Science* 249:386-390; Roberts y otros (1992) *PNAS* 89:2429-2433; Devlin y otros (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla y otros (1990) *PNAS* 87: 6378-6382; así como las Patentes U.S. Núms. 5.223.409, 5.198.346 y 5.096.815).

Generación de Análogos: Producción de Secuencias Peptídicas y de DNA Alteradas por Mutagénesis Dirigida

Pueden usarse técnicas de mutagénesis no aleatoria o dirigida para obtener específicas secuencias o mutaciones en regiones específicas. Estas técnicas pueden ser usadas para crear variantes que incluyen p. ej. deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de la conocida secuencia de aminoácidos de una proteína. Los sitios de mutación pueden ser modificados individualmente o en serie, p. ej. a base de (1) sustituir primeramente con aminoácidos conservados y luego con opciones más radicales en dependencia de los resultados conseguidos, (2) deleccionar el residuo diana, o (3) insertar residuos de la misma clase o de una clase distinta junto al sitio localizado, o bien mediante combinaciones de las opciones 1-3.

Mutagénesis de Barrido Mediante Alanina

La mutagénesis de barrido mediante alanina es un método que es útil para la identificación de determinados residuos o regiones de la proteína deseada que son ubicaciones o dominios preferidos para la mutagénesis; Cunningham y Wells (*Science* 244:1081-1085, 1989). En el barrido mediante alanina se identifica un residuo o un grupo de residuos que constituyen el objetivo perseguido (como p. ej. residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y los mismos son sustituidos por un aminoácido neutro o cargado negativamente (con la máxima preferencia alanina o polialanina). La sustitución de un aminoácido puede afectar a la interacción de los aminoácidos con el ambiente acuoso circundante en o fuera de la célula. Aquellos dominios que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones son entonces refinados introduciendo adicionales u otras variantes en o para los sitios de sustitución. Así, mientras que el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no tiene que estar necesariamente predeterminada. Por ejemplo, para optimizar la actuación de una mutación en un sitio determinado, puede llevarse a cabo mutagénesis de barrido con alanina o mutagénesis aleatoria en el codón o región objetivo, y se seleccionan las variantes de la deseada subunidad de proteína expresadas para así lograr la óptima combinación de actividad deseada.

Mutagénesis Mediada por Oligonucleótidos

La mutagénesis mediada por oligonucleótidos es un método útil para preparar variantes de sustitución, delección e inserción de DNA; véase, p. ej., Adelman y otros, (*DNA* 2:183, 1983). Descrito brevemente, el DNA deseado es alterado hibridando un oligonucleótido que codifica una mutación con una plantilla de DNA, donde la plantilla es la forma de una sola hebra de un plásmido o bacteriófago que contiene la secuencia de DNA inalterado o nativo de la proteína deseada. Después de la hibridación, se usa una DNA polimerasa para sintetizar toda una segunda hebra complementaria de la plantilla que así incorporará el cebador oligonucleotídico y codificará para la alteración seleccionada en el DNA de la proteína deseada. Generalmente se usan oligonucleótidos de una longitud de al menos 25 nucleótidos. Un oligonucleótido óptimo tendrá de 12 a 15 nucleótidos que son completamente complementarios para con la plantilla en cada lado del (de los) nucleótido(s) que codifica(n) para mutación. Esto asegura que el oligonucleótido se hibridará correctamente con la molécula de la plantilla de DNA de una sola hebra. Los oligonucleótidos son fácilmente sintetizados usando técnicas de las que son conocidas en el ramo, tales como la descrita por Crea y otros (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5765[1978]).

Mutagénesis por Casete

Otro método para preparar variantes, y concretamente la mutagénesis por casete, está basado en la técnica descrita por Wells y otros (*Gene*, 34:315[1985]). El material de partida es un plásmido (u otro vector) que incluye el DNA de la subunidad de proteína a mutar. Es identificado o son identificados el codón o los codones en el DNA de la subunidad de proteína a mutar. Debe haber un único sitio de endonucleasa de restricción en cada lado del sitio o de los sitios de mutación identificado(s). Si no existen tales sitios de restricción, los mismos pueden ser generados usando el método de mutagénesis mediada por oligonucleótidos anteriormente descrito para introducirlos en ubicaciones apropiadas en el DNA de la subunidad de proteína deseada. Tras haber sido los sitios de restricción introducidos en el plásmido, el plásmido es cortado en estos sitios para linealizarlo. Se sintetiza usando procedimientos estándar un oligonucleótido de doble hebra que codifica la secuencia del DNA entre los sitios de restricción pero contiene la mutación deseada o las mutaciones deseadas. Las dos hebras son sintetizadas por separado y son luego unidas por hibridación usando técnicas estándar. Este oligonucleótido de doble hebra recibe el nombre de casete. Este casete es diseñado de forma tal que tiene extremos 3' y 5' que son equiparables a los extremos del plásmido linealizado, de forma tal que puede ser directamente ligado al plásmido. Este plásmido ahora contiene la secuencia de DNA de la subunidad de proteína deseada mutada.

Mutagénesis Combinatoria

Puede también usarse para generar mutantes la mutagénesis combinatoria. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos para un grupo de homólogos u otras proteínas afines son alineadas preferiblemente para promover la mayor homología posible. Todos los aminoácidos que aparecen en una posición determinada de las secuencias alineadas pueden ser seleccionados para crear un conjunto degenerado de secuencias combinatorias. La biblioteca diversificada de variantes es generada por mutagénesis combinatoria a nivel del ácido nucleico, y es codificada por una biblioteca de genes diversificada. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos puede ser ligada enzimáticamente a secuencias génicas de forma tal que el conjunto degenerado de secuencias potenciales sea expresable como péptidos individuales, o como alternativa, como un conjunto de mayores proteínas de fusión que contienen el conjunto de secuencias degeneradas.

Métodos Primarios de Alto Rendimiento para Seleccionar Bibliotecas de Fragmentos u Homólogos Peptídicos

Son conocidas varias técnicas en el campo de la selección de productos de genes mutantes generados. Las técnicas para seleccionar grandes bibliotecas de genes a menudo incluyen los pasos de clonar la biblioteca de genes en vectores de expresión replicables, transformar células apropiadas con la resultante biblioteca de vectores, y expresar los genes bajo condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada, la formación de moléculas triméricas o la fijación a ligandos naturales, como p. ej. un receptor Frz o sustratos, facilita el relativamente fácil aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto fue detectado. Cada una de las técnicas que se describen a continuación se presenta

al análisis de alto rendimiento para seleccionar grandes números de secuencias creadas p. ej. mediante técnicas de mutagénesis aleatoria.

Sistemas de Dos Híbridos

Los ensayos de dos híbridos (trampa de interacción) pueden ser usados para identificar una proteína que interactúe con Wnt. Éstas pueden incluir agonistas, superagonistas y antagonistas. (La proteína en cuestión y una proteína con la cual la misma interactúa son usadas como proteína cebo y proteínas pez). Estos ensayos se basan en la detección de la reconstitución de un activador transcripcional mediada por interacciones proteína-proteína con una proteína cebo. En particular, estos ensayos hacen uso de genes quiméricos que expresan proteínas híbridas. El primer híbrido comprende un dominio de fijación de DNA unido a la proteína cebo, como p. ej. una molécula Wnt o un fragmento de la misma. La segunda proteína híbrida contiene un dominio de activación transcripcional unido a una proteína “pez”, como p. ej. una biblioteca de expresión. Si las proteínas pez y cebo son capaces de interactuar, las mismas ponen en estrecha proximidad a los dominios de fijación de DNA y del activador transcripcional. Esta proximidad es suficiente para ocasionar la transcripción de un gen informador que está operativamente unido a un sitio regulador transcripcional que es reconocido por el dominio de fijación de DNA, y la expresión del gen marcador puede ser detectada y usada para puntuar la interacción de la proteína cebo con otra proteína.

Bibliotecas de Presentación

En una aproximación a los ensayos de selección, los péptidos candidatos son presentados en la superficie de una célula o partícula viral, y la capacidad de específicas células o partículas virales para fijar una apropiada proteína receptora por vía del producto presentado es detectada en un “ensayo de inmunopurificación”. Por ejemplo, la biblioteca de genes puede ser clonada para obtener el gen para una proteína de membrana de superficie de una célula bacteriana, y la proteína de fusión resultante puede ser detectada por inmunopurificación (Ladner y otros, WO 88/06630; Fuchs y otros (1991) *BioTechnology* 9:1370-1371; y Goward y otros (1992) *TIBS* 18:136-140). De manera similar, un ligando marcado de manera detectable puede ser usado para puntuar homólogos peptídicos potencialmente funcionales. Ligandos marcados por fluorescencia, como p. ej. receptores, pueden ser usados para detectar homólogos que conserven actividad de fijación de ligandos. El uso de ligandos marcados por fluorescencia permite que las células sean inspeccionadas visualmente y separadas bajo un microscopio de fluorescencia, o bien, allí donde lo permitía la morfología de la célula, que las células sean separadas mediante un separador de células activado por fluorescencia.

Una biblioteca de genes puede ser expresada como una proteína de fusión en la superficie de una partícula viral. Por ejemplo, en el sistema de los fagos filamentosos, secuencias peptídicas foráneas pueden ser expresadas en la superficie de fago infeccioso, proporcionando con ello dos beneficios importantes. Primeramente, puesto que estos fagos pueden ser aplicados a matrices de afinidad a concentraciones de bastante más de 10^{13} de fagos por mililitro, puede seleccionarse de una vez un gran número de fagos. En segundo lugar, puesto que cada fago infeccioso presenta un producto génico en su superficie, si un determinado fago es recuperado de una matriz de afinidad con bajo rendimiento, el fago puede ser amplificado mediante otro ciclo de infección. Los del grupo de fagos filamentosos de *E. coli* casi idénticos M13, fd y fl son los más frecuentemente usados en las bibliotecas de presentación de fagos. Cualquiera de las proteínas de cubierta gIII o gVIII de fago puede ser usada para generar proteínas de fusión sin desbaratar el empaquetamiento final de la partícula viral. Epítopos foráneos pueden ser expresados en el extremo NH_2 -terminal de pIII y fago que lleven tales epítopos recuperados de un gran exceso de fagos que carecen de este epítipo (Ladner y otros, publicación WO 90/02909 al amparo del PCT; Garrard y otros, publicación WO 92/09690 al amparo del PCT; Marks y otros (1992) *J. Biol. Chem.* 267:16007-16010; Griffiths y otros (1993) *EMBO J* 12:725-734; Clackson y otros (1991) *Nature* 352:624-628; y Barbas y otros (1992) *PNAS* 89:4457-4461).

Un enfoque común usa el receptor de maltosa de *E. coli* (la proteína de membrana exterior, LamB) como pareja en la fusión peptídica (Charbit y otros (1986) *EMBO* 5, 3029-3037). Han sido insertados oligonucleótidos en plásmidos que codifican el gen LamB para producir péptidos unidos a uno de los bucles extracelulares de la proteína. Estos péptidos están disponibles para fijarse a ligandos, y p. ej. a anticuerpos, y pueden provocar una respuesta inmune cuando las células son administradas a animales. Otras proteínas de superficie celular, como p. ej. la OmpA (Schorr y otros (1991) *Vaccines* 9, pp. 387-392), la PhoE (Agterberg y otros (1990) *Gene* 88, 37-45) y la PAL (Fuchs y otros (1991) *BioTech* 9, 1369-1372), así como grandes estructuras de superficie bacteriana han servido de vehículos para la presentación de péptidos. Los péptidos pueden unirse a pilina, que es una proteína que se polimeriza para formar el conducto pilus-a para el intercambio interbacteriano de información genética (Thiry y otros (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 984-993). Debido al papel que se desempeña en la interacción con otras células, el pilus proporciona un útil soporte para la presentación de péptidos al ambiente extracelular. Otra gran estructura de superficie que es usada para la presentación de péptidos es el órgano motor bacteriano que consiste en el flagelo. La unión de péptidos a la proteína subunidad flagelina ofrece un denso conjunto de muchas copias de péptidos sobre las células huésped (Kuwajima y otros (1988) *BioTech.* 6, 1080-1083). Las proteínas de superficie de otras especies bacterianas han servido también de parejas de fusión de péptidos. Los ejemplos incluyen la proteína A de *Staphylococcus* y la IgA proteasa de membrana exterior de *Neisseria* (Hansson y otros (1992) *J. Bacteriol.* 174, 4239-4235 y Klauser y otros (1990) *EMBO J.* 9, 1991-1999).

En los sistemas de fago filamentosos y en el sistema LamB anteriormente descritos, el nexo físico entre el péptido y su DNA codificante se debe al hecho de estar el DNA contenido dentro de una partícula (célula o fago) que lleva

el péptido en su superficie. Al ser capturado el péptido, se captura la partícula y el DNA del interior. Una estrategia alternativa usa la proteína LacI de fijación de DNA para formar una unión entre el péptido y el DNA (Cull y otros (1992) *PNAS USA* 89:1865-1869). Este sistema usa un plásmido que contiene el gen LacI con un sitio de clonación de oligonucleótido en su extremo 3'. Bajo la inducción controlada por arabinosa, es producida una proteína de fusión LacI-péptido. Esta fusión conserva la capacidad natural de LacI para fijarse a una corta secuencia de DNA conocida como operador LacO (LacO). Instalando dos copias de LacO en el plásmido de expresión, la fusión LacI-péptido se fija estrechamente al plásmido que la codificó. Debido al hecho de que los plásmidos en cada célula contienen solamente una única secuencia de oligonucleótidos y de que cada célula expresa solamente una única secuencia peptídica, los péptidos quedan asociados de manera específica y estable a la secuencia de DNA que dirigió su síntesis. Las células de la biblioteca son lisadas con suavidad y los complejos péptido-DNA son expuestos a una matriz de receptor inmovilizado para recuperar los complejos que contienen péptidos activos. El DNA de plásmido asociado es entonces reintroducido en células para amplificación y secuenciación de DNA para determinar la identidad de los ligandos peptídicos. Como demostración de la utilidad práctica del método, se hizo una gran biblioteca aleatoria de dodecapéptidos y se la sometió a selección sobre un anticuerpo monoclonal cultivado contra el péptido opioide dinorfina B. Fue recuperada una cohorte de péptidos que estaban todos ellos emparentados por una secuencia consenso que correspondía a una parte de seis residuos de dinorfina B. (Cull y otros (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89-1869).

Esta estrategia, a la que a veces se alude como a la de péptidos sobre plásmidos, se diferencia de dos maneras importantes de los métodos de presentación de fagos. Primeramente, los péptidos son unidos al terminal C de la proteína de fusión, redundando en la presentación de los miembros de la biblioteca como péptidos que tienen terminales carboxi libres. Ambas proteínas de cubierta de fago filamentosos pIII y pVIII están ancladas al fago a través de sus terminales C, y los péptidos huésped quedan colocados en los dominios N-terminales que se extienden hacia el exterior. En algunos diseños, los péptidos presentados en fago son presentados exactamente en el terminal amino de la proteína de fusión (Cwirla y otros (1990) *Proc Natl. Acad. Sci U.S.A.* 87, 6378-6382). Una segunda diferencia es el conjunto de predisposiciones biológicas que afectan a la población de péptidos que está realmente presente en las bibliotecas. Las moléculas de fusión LacI están confinadas al citoplasma de las células huésped. Las fusiones de cubierta de fago son expuestas brevemente al citoplasma durante la traducción pero son rápidamente secretadas a través de la membrana interior al compartimento periplásmico, quedando ancladas en la membrana por sus dominios hidrofóbicos C-terminales, con los terminales N, que contienen los péptidos, sobresaliendo al interior del periplasma mientras están a la espera de formar partículas de fago. Los péptidos en las bibliotecas de LacI y fagos pueden diferenciarse significativamente como resultado de su exposición a distintas actividades proteolíticas. Las proteínas de cubierta de fago requieren transporte a través de la membrana interna y procesamiento por peptidasa señal como prelude a la incorporación al fago. Ciertos péptidos ejercen un efecto perjudicial en estos procesos y están subrepresentados en las bibliotecas (Gallop y otros (1994) *J. Med. Chem.* 37(9):1233-1251). Estas predisposiciones particulares no constituyen un factor en el sistema de presentación de LacI.

Es enorme el número de pequeños péptidos que están disponibles en las bibliotecas aleatorias recombinantes. Se preparan rutinariamente bibliotecas de 10^7 - 10^9 clones independientes. Han sido creadas bibliotecas tan grandes como las de 10^{11} recombinantes, pero este tamaño se aproxima el límite práctico para las bibliotecas de clones. Esta limitación en el tamaño de la biblioteca se da en el paso de transformar el DNA que contiene segmentos aleatorizados en las células bacterianas huésped. Para dar un rodeo a esta limitación, recientemente ha sido desarrollado un sistema *in vitro* basado en la presentación de péptidos nacientes en complejos polisomales. Este método de la biblioteca de presentación tiene el potencial de producir bibliotecas que son en 3-6 órdenes de magnitud mayores que las bibliotecas de fagos/fagemidos o plásmidos que están actualmente disponibles. Además, la construcción de las bibliotecas, la expresión de los péptidos y la selección se hace en un formato enteramente exento de células.

En una aplicación de este método (Gallop y otros (1994) *J. Med. Chem.* 37(9):1233-1251), se construyó una biblioteca de DNA molecular que codifica 10^{12} decapeptidos y la biblioteca fue expresada en un sistema de transcripción/traducción acoplado *in vitro* a *E. coli* S30. Las condiciones fueron elegidas para mantener los ribosomas en el mRNA, ocasionando la acumulación de una considerable proporción del RNA en polisomas y produciendo complejos que contenían péptidos nacientes aún unidos a su RNA codificante. Los polisomas son lo suficientemente robustos como para ser purificados por afinidad sobre receptores inmovilizados de manera muy parecida a cómo son seleccionadas las bibliotecas de presentación de péptidos recombinantes más convencionales. El RNA de los complejos combinados es recuperado, convertido en cDNA y amplificado por PCR para producir una plantilla para el siguiente ciclo de síntesis y selección. El método de presentación de polisomas puede ser acoplado al sistema de presentación de fagos. A continuación de varios ciclos de selección, el cDNA de la colección enriquecida de polisomas fue clonado en un vector fagemido. Este vector sirve tanto de vector de expresión de péptidos, presentando los péptidos unidos a las proteínas de cubierta, como de vector de secuenciación de DNA para la identificación de péptidos. Expresando los péptidos derivados de polisoma sobre fago, puede continuarse el procedimiento de selección por afinidad en este formato, o bien pueden analizarse los péptidos sobre los clones individuales para determinar la actividad de fijación en un ELISA con fago, o para determinar la especificidad de fijación en un ELISA con fago de completación (Barret, y otros (1992) *Anal. Biochem* 204,357-364). Para identificar las secuencias de los péptidos activos, se secuencian el DNA producido por el huésped fagemido.

65 Selecciones Secundarias

Los ensayos de alto rendimiento que han sido descritos anteriormente pueden ser seguidos por selecciones secundarias a fin de identificar adicionales actividades biológicas que p. ej. le permitirán al experto en la materia distinguir

los agonistas de los antagonistas. El tipo de selección secundaria que se use dependerá de la deseada actividad que tenga que ser sometida a ensayo. Por ejemplo, puede desarrollarse un ensayo en el cual la capacidad para inhibir una interacción entre una proteína de interés y su respectivo ligando pueda ser usada para identificar los antagonistas de un grupo de fragmentos que péptidos aislados mediante una de las selecciones primarias anteriormente descritas.

Por consiguiente, son conocidos en la técnica métodos para generar fragmentos y análogos y someterlos a ensayo para determinar la actividad. Una vez identificada la secuencia esencial de interés, es rutinaria para un experto en la materia la obtención de análogos y fragmentos.

Peptidomimética

La invención también prevé la reducción de los dominios de fijación de proteínas de los polipéptidos Wnt en cuestión para generar miméticos, como p. ej. agentes peptídicos o no peptídicos. Véase, por ejemplo, "Inhibidores peptídicos de la proteína de papillomavirus humano que se fija a la proteína del gen del retinoblastoma", Solicitudes de patente europea EP-412,762A y EP-B31.080A.

Análogos peptídicos no hidrolizables de residuos críticos pueden ser generados usando benzodiazepina (véase, p. ej., Freidinger y otros en *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Países Bajos, 1988), azepina (véase, p. ej., Huffman y otros en *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Países Bajos, 1988), anillos de gamma-lactama sustituida (Garvey y otros en *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Países Bajos, 1988), pseudopéptidos de cetometileno (Ewenson y otros (1986) *J Med Chem* 29:295; y Ewenson y otros en *Peptides: Structure and Function* (Actas del 9º Simposium Americano sobre los Péptidos) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985), núcleos de dipéptidos de giro β (Nagai y otros (1985) *Tetrahedron Lett* 26:647; y Sato y otros (1986) *J Chem Soc Perkin Trans* 1:1231) y β -aminoalcoholes (Gordon y otros (1985) *Biochem Biophys Res Commun* 126:419; y Dann y otros (1986) *Biochem Biophys Res Commun* 134:71).

Proteínas de Fusión

Polipéptidos para modular el nivel de proteína Wnt pueden ser unidos a otra proteína o parte de la misma. Por ejemplo, una proteína Wnt o parte de la misma, tal como la parte de Wnt de fijación a Frizzled, puede ser unida operativamente a otra mitad de polipéptido para aumentar la solubilidad. Los ejemplos de una proteína que puede ser unida a Wnt o partes de la misma incluyen una proteína de plasma o un fragmento de la misma, lo cual puede mejorar la vida media circulante de la Wnt. Por ejemplo, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión Wnt-inmunoglobulina (Ig) en la cual la secuencia Wnt está unida a una secuencia derivada de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Han sido descritos varios constructos de proteínas de fusión solubles en los que el dominio extracelular de una glicoproteína de superficie celular está fusionado con la región F(c) constante de una inmunoglobulina. Por ejemplo, Capon y otros (1989) *Nature* 337(9):525-531 dan una orientación sobre cómo generar un análogo de CD4 de mayor duración uniendo el CD4 a una inmunoglobulina (IgG1). Véanse también Capon y otros, Patentes U.S. Números 5.116.964 y 5.428.130 (constructos de fusión CD4-IgG); Linsley y otros, Patente U.S. Número 5.434.131 (constructos de fusión CTLA4-IgG1 y B7-IgG1); Linsley y otros (1991) *J. Exp. Med* 174:561-569 (constructos de fusión CTLA4-IgG1); y Linsley y otros (1991) *J. Exp. Med* 173:721-730 (constructos de fusión CD28-IgG1 y B7-IgG1). Tales proteínas de fusión han demostrado ser útiles para modular las interacciones entre receptor y ligando y reducir la inflamación *in vivo*. Por ejemplo, han sido usadas *in vivo* proteínas de fusión en las cuales un dominio extracelular de proteínas de receptor del factor de necrosis tumoral de superficie celular (TNFR) ha sido unido a una región (Fc) constante de inmunoglobulina. Véanse, por ejemplo, Moreland y otros (1997) *N. Engl. J. Med.* 337(3):141-147; y van der Poll y otros (1997) *Blood* 89(10):3727-3734).

Anticuerpos

La invención también incluye anticuerpos específicamente reactivos con polipéptidos Wnt o Frizzled de un sujeto, así como anticuerpos específicamente reactivos con otras proteínas de la vía de señalización Wnt- β -catenina, como p. ej. intracuerpos. Antisueros anti-proteína/anti-péptido o anticuerpos monoclonales pueden hacerse como aquí se describe usando protocolos estándar (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* redactado por Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)).

Una proteína Wnt o una parte o un fragmento de la misma puede usarse como inmunógeno para generar anticuerpos que fijan a Wnt usando técnicas estándar para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Puede usarse la proteína Wnt de longitud completa, o bien como alternativa pueden usarse como inmunógenos fragmentos peptídicos antígenicos de Wnt.

Típicamente se usa Wnt o un péptido Wnt para preparar anticuerpos inmunizando a un sujeto adecuado (como p. ej. un conejo, una cabra, un ratón u otro mamífero) con el inmunógeno. Una apropiada preparación inmunogénica puede contener, por ejemplo, un péptido Wnt recombinante o un péptido Wnt sintetizado químicamente. Véanse, p. ej., la Patente U.S. N° 5.460.959 y las solicitudes estadounidenses copendientes USSN 08/334.797, USSN 08/231.439, USSN 08/334.455 y USSN 08/928.881, que quedan expresamente incorporadas en su totalidad a la presente por referencia. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de Wnt son conocidas y están descritas, por ejemplo, en Vant Veer y otros (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4:2532-2534, Gavin y otros (1992) *Gene Dev.* 4:2319-2332; Lee y otros

(1995) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:2268-2272; Christiansen y otros (1995) *Mech. Dev.* 51:341-350, Wainwright y otros (1988) *EMBO J.* 7:1743-1748; y la Publicación WO 95/17416 al amparo del PCT. Son también conocidas las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de otros elementos de la vía de señalización Wnt- β -catenina. La preparación puede adicionalmente incluir un adyuvante, tal como el adyuvante completo o incompleto de Freund, o un agente inmunoestimulador similar. La inmunización de un sujeto adecuado con una preparación de Wnt inmunogénica induce una respuesta de anticuerpos anti-Wnt policlonales.

Pueden usarse anticuerpos anti-Wnt o fragmentos de los mismos para inhibir los niveles de proteína Wnt. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos anti-Wnt incluyen los fragmentos F(v), Fab, Fab' y F(ab')₂, que pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como pepsina. En el sentido en el que se la utiliza en la presente, la expresión "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpos monoclonales" se refiere a una población de moléculas anticuerpos que contienen solamente una especie de un sitio de fijación de antígeno capaz de inmunorreaccionar con un determinado epítipo de Wnt. Así, una composición de anticuerpos monoclonales típicamente presenta una única afinidad de fijación para una particular proteína Wnt con la cual inmunorreacciona.

Adicionalmente pueden usarse anticuerpos anti-Wnt producidos por métodos de ingeniería genética, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados que comprenden partes tanto humanas como no humanas y pueden hacerse usando técnicas de DNA recombinante estándar. Tales anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden ser producidos por ingeniería genética usando técnicas de DNA estándar conocidas en el ramo, o sea por ejemplo usando los métodos que se describen en Robinson y otros, Solicitud Internacional N° PCT/US86/02269; Akira, y otros, Solicitud de Patente Europea 184.187; Taniguchi, M., Solicitud de Patente Europea 171.496; Morrison y otros, Solicitud de Patente Europea 173.494; Neuberger y otros, Publicación Internacional N° WO 86/01533 al amparo del PCT; Cabilly y otros, Patente U.S. N° 4.816.567; Cabilly y otros, Solicitud de Patente Europea 125.023; Better y otros, *Science* 240:1041-1043, 1988; Liu y otros, *PNAS* 84:3439-3443, 1987; Liu y otros *J. Immunol.* 139:3521-3526, 1987; Sun y otros *PNAS* 84:214-218, 1987; Nishimura y otros, *Canc. Res.* 47:999-1005, 1987; Wood y otros, *Nature* 314:446-449, 1985; y Shaw y otros, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559, 1988; Morrison, S. L., *Science* 229:1202-1207, 1985; Oi y otros, *BioTechniques* 4:214, 1986; Winter, Patente U.S.5.225.539; Jones y otros, *Nature* 321:552-525, 1986; Verhoeyan y otros, *Science* 239:1534, 1988; y Beidler y otros, *J. Immunol.* 141:4053-4060, 1988.

Adicionalmente puede hacerse usando técnicas estándar un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra Wnt. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos monoclonales humanos en ratones transgénicos o en ratones inmunodeficientes en los que se hayan injertado células humanas productoras de anticuerpos. Métodos para generar tales ratones están descritos, por ejemplo, en Wood y otros publicación WO 91/00906 al amparo del PCT, Kucheralapati y otros, publicación WO 91/10741 al amparo del PCT; Lonberg y otros, publicación WO 92/03918 al amparo del PCT; Kay y otros, publicación WO 92/03917 al amparo del PCT; Kay y otros, publicación WO 93/12227 al amparo del PCT; Kay y otros, publicación WO 94/25585 al amparo del PCT; Rajewsky y otros publicación WO 94/04667 al amparo del PCT; Ditullio y otros, publicación WO 95/17085 al amparo del PCT; Lonberg N. y otros (1994) *Nature* 368:856-859; Green, L.L. y otros (1994) *Nature Genet.* 7:13-21; Morrison, S.L. y otros (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 81:6851-6855; Bruggeman y otros (1993) *Year Immunol* 7:33-40; Choi y otros (1993) *Nature Gent.* 4:117-123; Tuailon y otros (1993) *PNASS* 90:3720-3724; Bruggeman y otros (1991) *Eur J Immunol* 21:1323-1326; Duchosal y otros, publicación WO 93/05796 al amparo del PCT; Patente U.S. Número 5.411.749; McCune y otros (1988) *Science* 241:1632-1639), Kamel. Reid y otros (1988) *Science* 242:1706; Spanopoulou (1994) *Genes & Development* 8:1030-1042; y Shinkai y otros (1992) *Cell* 68:855-868. Un ratón transgénico con anticuerpos humanos o un ratón inmunodeficiente en el que se han injertado células o tejido productores de anticuerpos humanos puede ser inmunizado por Wnt o un péptido Wnt antigénico, y entonces pueden usarse esplenocitos de estos ratones inmunizados para crear hibridomas. Son perfectamente conocidos los métodos de producción de hibridomas.

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos contra Wnt construyendo una biblioteca combinatoria de inmunoglobulinas, tal como una biblioteca de presentación de fagos Fab o una biblioteca de presentación de fagos scFv, usando cDNAs de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina preparados a partir de mRNA sacado de linfocitos de un sujeto. Véanse, p. ej., McCafferty y otros, publicación WO 92/01047 al amparo del PCT; Marks y otros (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597; y Griffiths y otros (1993) *EMBO J* 12:725-734. Adicionalmente, puede generarse una biblioteca combinatoria de regiones variables de anticuerpos mutando un anticuerpo humano conocido. Por ejemplo, una región variable de un anticuerpo humano del que se sepa que se fija a Wnt puede ser mutada por ejemplo a base de usar oligonucleótidos mutagenizados alterados aleatoriamente, para generar una biblioteca de regiones variables mutadas que puede ser entonces sometida a selección para fijación a Wnt. Métodos para introducir mutagénesis aleatoria dentro de las regiones CDR de cadenas pesadas y/o ligeras de inmunoglobulina, métodos para cruzar cadenas pesadas y ligeras aleatorizadas para formar apareamientos y métodos de selección pueden encontrarse, por ejemplo, en Barbas y otros, publicación WO 96/07754 al amparo del PCT; y en Barbas y otros (1992) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:4457-4461.

La biblioteca de inmunoglobulinas puede ser expresada por una población de paquetes de presentación, preferiblemente derivados de fago filamentoso, para formar una biblioteca de presentación de anticuerpos. Ejemplos de métodos y reactivos que se prestan en particular a ser usados para generar una biblioteca de presentación de anticuerpos pueden encontrarse, por ejemplo, en Ladner y otros, Patente U.S. N° 5.223.409; Kang y otros, publicación WO 92/18619 al amparo del PCT; Dower y otros, publicación WO 91/17271 al amparo del PCT; Winter y otros, publicación WO 92/20791 al amparo del PCT; Markland y otros, publicación WO 92/15679 al amparo del PCT; Breitling y otros, publicación WO 93/01288 al amparo del PCT; McCafferty y otros, publicación WO 92/01047 al amparo del PCT; Garrard

y otros publicación WO 92/09690 al amparo del PCT; Ladner y otros, publicación WO 90/02809 al amparo del PCT; Fuchs. y otros (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay y otros (1992) *Hum Antibod Hybridomas*; 3:81-85; Huse y otros (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths y otros (1993) *supra*; Hawkins y otros (1992) *J Mol Biol.* 226:889-896; Clackson y otros (1991) *Nature* 352:624-628; Gram y otros (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad y otros (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom y otros (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; y Barbas y otros (1991) *PNAS* 88:7978-7982. Una vez presentados en la superficie de un paquete de presentación (como p. ej. fago filamentoso), los de la biblioteca de anticuerpos son seleccionados para identificar y aislar los paquetes que expresan un anticuerpo que fija a Wnt. En una realización preferida, la selección primaria de la biblioteca supone una inmunopurificación con una Wnt inmovilizada, y se seleccionan los paquetes de presentación que expresan anticuerpos que fijan a la Wnt inmovilizada.

Secuencias de Ácido Nucleico de Wnt Antisentido

Moléculas de ácido nucleico que son antisentido con respecto a un nucleótido que codifica Wnt pueden ser usadas como agente que inhibe la expresión Wnt. Un ácido nucleico "antisentido" incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria de un ácido nucleico "sentido" que codifica Wnt, o sea que es p. ej. complementaria de la hebra codificante de una molécula de cDNA de doble hebra o complementaria de una secuencia de mRNA. En consecuencia, un ácido nucleico antisentido puede formar enlaces de hidrógeno con un ácido nucleico sentido. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario de toda una hebra codificante de Wnt, o de solamente una parte de la misma. Por ejemplo, puede usarse una molécula de ácido nucleico antisentido que sea antisentido con respecto a la "región codificante" de la hebra codificante de una secuencia de nucleótidos que codifique Wnt.

Son conocidas las secuencias de hebra codificante que codifican Wnt. Por ejemplo, han sido identificados en los humanos al menos 7 genes Wnt (Wnt-1, 2, 3, 4, 5a, 7a y 7b). Véase, p. ej., Vant Veer y otros (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4:2532-2534, Gavin y otros (1992) *Gene Dev.* 4:2319-2332; Lee y otros (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:2268-2272; Christiansen y otros (1995) *Mech. Dev.* 51:341-350, Wainwright y otros (1988) *EMBO J.* 7:1743-1748; y la Publicación WO 95/17416 al amparo del PCT. Dadas las secuencias de hebra codificante que codifican Wnt, los ácidos nucleicos antisentido pueden ser diseñados según las reglas de apareamiento de bases según Watson y Crick. La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria de toda la región codificante de mRNA de Wnt, pero más preferiblemente es un oligonucleótido que es antisentido con respecto a tan sólo una parte de la región codificante o no codificante de mRNA de Wnt. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario de la región que rodea al sitio de inicio de traducción de mRNA de Wnt. Un oligonucleótido antisentido puede tener por ejemplo una longitud de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos. Un ácido nucleico antisentido puede ser construido usando síntesis química y reacciones de ligación enzimática usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (como p. ej. un oligonucleótido antisentido) puede ser sintetizado químicamente usando nucleótidos de los que se dan de manera natural o nucleótidos diversamente modificados diseñados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y sentido, o sea que p. ej. pueden usarse derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden ser usados para generar el ácido nucleico antisentido incluyen los siguientes: 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metiluracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina. Como alternativa, el ácido nucleico antisentido puede ser producido biológicamente usando un vector de expresión en el cual ha sido subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido (es decir que el RNA transcrito desde el ácido nucleico insertado tendrá una orientación antisentido con respecto a un ácido nucleico objetivo de interés).

Genoterapia

Los constructos génicos de la invención pueden también ser usados como parte de un protocolo de genoterapia para administrar ácidos nucleicos que codifiquen una forma agonística o antagonística de un polipéptido Wnt. La invención presenta vectores de expresión para la transfección y expresión *in vivo* de un polipéptido Wnt en determinados tipos de células para reconstituir la función, o como alternativa para antagonizar la función de un polipéptido Wnt en una célula en la cual ese polipéptido es expresado incorrectamente. Los constructos de expresión de polipéptidos Wnt pueden ser administrados en cualquier vehículo biológicamente eficaz, p. ej. en cualquier formulación o composición que sea capaz de suministrar eficazmente el gen Wnt a células *in vivo*. Los enfoques incluyen la inserción del gen en cuestión en vectores virales entre los que se incluyen retrovirus recombinantes, adenovirus, virus adenoasociado y virus del herpes simplex tipo 1, o plásmidos bacterianos o eucarióticos recombinantes. Los vectores virales transfectan las células directamente; y el DNA plasmídico puede ser suministrado con ayuda de, por ejemplo, liposomas catiónicos (lipofectina) o conjugados de polilisina derivatizados (p. ej. conjugados con anticuerpos), gramacidina S, envolturas virales artificiales u otros vehículos intracelulares de este tipo, así como mediante inyección directa del constructo génico o precipitación de CaPO_4 realizada *in vivo*.

Una manera preferida de llevar a cabo la introducción *in vivo* de ácido nucleico en una célula es la de usar un vector viral que contenga ácido nucleico, como p. ej. un cDNA, que codifique un polipéptido Wnt. La infección de células con un vector viral tiene la ventaja de que pueden recibir el ácido nucleico las de una gran proporción de las células objetivo. Adicionalmente, las moléculas codificadas dentro del vector viral, p. ej. por un cDNA contenido en el vector viral, son expresadas eficazmente en las células que han recibido ácido nucleico del vector viral.

Los vectores de retrovirus y los vectores de virus adenoasociado pueden ser usados como sistema de administración de genes recombinantes para la transferencia de genes exógenos *in vivo*, particularmente a humanos. Estos vectores proporcionan un eficaz suministro de genes a las células, y los ácidos nucleicos transferidos quedan integrados de manera estable en el DNA cromosomal del huésped. El desarrollo de líneas celulares especializadas (llamadas "células empaquetadoras") que producen solamente retrovirus de replicación defectuosa ha incrementado la utilidad de los retrovirus para la terapia génica, y están caracterizados retrovirus defectuosos destinados a ser usados en la transferencia de genes a efectos de genoterapia (véase para un estudio de ello Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271). Un retrovirus de replicación defectuosa puede ser empaquetado en viriones que pueden ser usados para infectar una célula objetivo mediante el uso de un virus colaborador mediante técnicas estándar. Pueden encontrarse protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células *in vitro* o *in vivo* con tales virus en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F.M. y otros (reds.) Greene Publishing Associates, (1989), Párrafos 9.10-9.14 y otros manuales de laboratorio estándar. Los ejemplos de retrovirus adecuados incluyen el pLJ, el pZIP, el pWE y el pEM, que son conocidos para los expertos en la materia. Los ejemplos de adecuadas líneas de virus de empaquetamiento para preparar sistemas retrovirales tanto ecotrópicos como anfotrópicos incluyen el ψ Crip, el ψ Cre, el ψ 2 y el ψ Am. Los retrovirus han sido usados para introducir una variedad de genes en muchos tipos de células distintos, incluyendo células epiteliales, *in vitro* y/o *in vivo* (véanse, por ejemplo, Eglitis, *et al* (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:6460-6464; Wilson y otros (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:3014-3018; Armentano y otros (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87:6141-6145; Huber y otros (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:8039; Ferry y otros (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:8377-8381; Chowdhury y otros (1991) *Science* 254:1802-1805; van Beusechem y otros (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:7640-7644; Kay y otros (1992) *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai y otros (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:10892-10895; Hwu y otros (1993) *J Immunol* 150:4104-4115; Patente U.S. N° 4.868.116; Patente U.S. N° 4.980.286; Solicitud WO 89/07136 al amparo del PCT; Solicitud WO 89/02468 al amparo del PCT; Solicitud WO 89/05345 al amparo del PCT y Solicitud WO 92/07573 al amparo del PCT).

Otro sistema de administración de genes virales que es útil en la presente invención utiliza vectores derivados de adenovirus. El genoma de un adenovirus puede ser manipulado de forma tal que codifique y exprese un producto génico de interés pero quede inactivado en cuanto a su capacidad para replicarse en un ciclo de vida viral lítico normal. Véanse, por ejemplo, Berkner y otros (1988) *BioTechniques* 6:616; Rosenfeld y otros (1991) *Science* 252:431-434; and Rosenfeld y otros (1992) *Cell* 68:143-155. Son conocidos para los expertos en la materia adecuados vectores adenovirales derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 dl324 o de otras cepas de adenovirus (como p. ej. las Ad2, Ad3, Ad7, etc.). Los adenovirus recombinantes pueden ser ventajosos en ciertas circunstancias por cuanto que los mismos no son capaces de infectar las células que no se dividen y pueden ser usados para infectar las de una amplia variedad de tipos de células, entre las que se incluyen las células epiteliales (Rosenfeld y otros (1992) citado *supra*). Además, la partícula vírica es relativamente estable y se presta a purificación y concentración, y, como se ha indicado anteriormente, puede ser modificada para afectar al espectro de infectividad. Adicionalmente, el DNA adenoviral introducido (y el DNA foráneo ahí contenido) no es integrado en el genoma de una célula huésped, sino que se mantiene episomal, evitando con ello los problemas potenciales que pueden producirse como resultado de una mutagénesis insercional *in situ* donde el DNA introducido queda integrado en el genoma del huésped (como p. ej. el DNA retroviral). Además, la capacidad de transporte del genoma adenoviral para DNA foráneo es grande (de hasta 8 kilobases) con respecto a otros vectores de suministro de genes (Berkner y otros citado *supra*; Haj-Ahmand y Graham (1986) *J. Virol.* 57:267).

Aun otro sistema de vector viral que es útil para el suministro del gen en cuestión es el virus adenoasociado (AAV). Un virus adenoasociado es un virus defectuoso que se da manera natural y requiere otro virus, tal como un adenovirus o un virus herpes, como virus colaborador para una eficaz replicación y un ciclo de vida productivo. (Para un estudio de ello, véase Muzyczka y otros (1992) *Curr. Topics in Micro. and Immunol.* 158:97-129). Un virus adenoasociado es también uno de los pocos virus que puede integrar su DNA en células de las que no se dividen, y que presenta una alta frecuencia de integración estable (véanse, por ejemplo, Flotte y otros (1992) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356; Samulski y otros (1989) *J. Virol.* 63:3822-3828; y McLaughlin y otros (1989) *J. Virol.* 62:1963-1973). Pueden ser empaquetados y pueden integrarse vectores que contengan tan pocos como 300 pares de bases de AAV. El espacio para el DNA exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Puede usarse para introducir DNA en células un vector de AAV tal como el descrito en Tratschin y otros (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260. Han sido introducidos en distintos tipos de células usando vectores de AAV los de una variedad de ácidos nucleicos (véanse, por ejemplo, Hermonat y otros (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 81:6466-6470; Tratschin y otros (1985) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Wondisford y otros (1988) *Mol. Endocrinol.* 2:32-39; Tratschin y otros (1984) *J. Virol.* 51:611-619; y Flotte y otros (1993) *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790).

Además de los métodos de transferencia viral tales como los anteriormente ilustrados, pueden también emplearse para ocasionar la expresión de un polipéptido Wnt en el tejido de un animal métodos no virales. En su mayoría, los métodos no virales de transferencia de genes se basan en los mecanismos normales que son usados por las células de mamífero para la captación y el transporte intracelular de macromoléculas. En realizaciones preferidas, los sistemas

no virales de suministro de genes de la presente invención se basan en vías endocíticas para la captación del gen Wnt en cuestión por parte de la célula objetivo. Los ejemplos de sistemas de suministro de genes de este tipo incluyen sistemas de origen liposomal, conjugados de polilisina y envolturas virales artificiales.

En una realización representativa, un gen que codifique un polipéptido Wnt puede estar atrapado en liposomas que lleven cargas positivas en su superficie (como p. ej. lipofectinas) y que (opcionalmente) estén identificados con anticuerpos contra los antígenos de superficie celular del tejido objetivo (Mizuno y otros (1992) *No Shinkei Geka* 20:547-551; publicación WO91/06309 al amparo del PCT; solicitud de patente japonesa 1047381 y publicación de patente europea EP-A-43075).

En escenarios clínicos, los sistemas de suministro de genes para el gen Wnt terapéutico pueden ser introducidos en un paciente por cualquiera de los de una serie de métodos que son todos ellos perfectamente conocidos en la técnica. Por ejemplo, una preparación farmacéutica del sistema de suministro de genes puede ser introducida sistémicamente, p. ej. mediante inyección intravenosa, y la específica transducción de la proteína en las células objetivo se produce predominantemente desde la especificidad de transfección que es proporcionada por el vehículo de suministro de genes, desde la expresión del tipo de célula o del tipo de tejido debido a las secuencias reguladoras transcripcionales que controlan la expresión del gen receptor, o desde una combinación de las mismas. En otras realizaciones está más limitado el suministro inicial del gen recombinante, siendo muy localizada la introducción en el animal. Por ejemplo, el vehículo de suministro de genes puede ser introducido mediante catéter (véase la Patente U.S. 5.328.470) o mediante inyección estereotáctica (véase p. ej. Chen y otros (1994) *PNAS* 91: 3054-3057).

La preparación farmacéutica del constructo de terapia génica puede constar esencialmente del sistema de suministro de genes en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la cual esté embebido el vehículo de suministro de genes. Como alternativa, cuando el sistema de suministro de genes completo puede ser producido intacto desde células recombinantes, como p. ej. vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede comprender una o varias células que produzcan el sistema de suministro de genes.

En otras realizaciones preferidas pueden usarse enfoques de terapia génica *ex vivo*.

Celuloterapia

La Wnt puede también ser incrementada en un sujeto a base de introducir en una célula, como p. ej. un fibroblasto, un queratinocito o una célula epitelial, como p. ej. una célula de folículo piloso, como p. ej. una célula DP, una secuencia de nucleótidos que module la producción de Wnt, como p. ej. una secuencia de nucleótidos que codifique un péptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo, una secuencia promotora, como p. ej. una secuencia promotora de un gen Wnt o de otro gen; una secuencia potenciadora, como p. ej. una región no traducida (UTR) 5', como p. ej. una UTR 5' de un gen Wnt o de otro gen, una UTR 3', como p. ej. una UTR 3' de un gen Wnt o de otro gen; un sitio de poliadenilación; una secuencia aislante; u otra secuencia que module la expresión de Wnt. La célula puede ser entonces introducida en el sujeto.

Las células primarias y secundarias a manipular genéticamente pueden ser obtenidas de los de una variedad de tejidos e incluyen tipos de células que pueden mantenerse propagadas en cultivo. Por ejemplo, las células primarias y secundarias incluyen fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales (como p. ej. células DP), células endoteliales, células gliales, células neurales, elementos formados de la sangre (como p. ej. linfocitos y células de médula ósea), células musculares (mioblastos) y precursores de estos tipos de células somáticas. Las células primarias son preferiblemente obtenidas del individuo a quien le son administradas las células primarias o secundarias manipuladas genéticamente. Sin embargo, las células primarias pueden ser obtenidas de un dador (distinto del receptor) de la misma especie o de otra especie (como p. ej. un ratón, una rata, un conejo, un gato, un perro, un cerdo, una vaca, un pájaro, una oveja, una cabra o un caballo).

La expresión "célula primaria" incluye las células que están presentes en una suspensión de células aislada de una fuente de tejido de vertebrado (antes de ser puestas en placa de cultivo, es decir antes de ser unidas a un sustrato de cultivo tisular tal como una cápsula o un frasco), las células que están presentes en un explante sacado de tejido, siendo ambos de los anteriores tipos de células cultivadas en placas de cultivo por vez primera, y las suspensiones de células obtenidas de estas células cultivadas en placa de cultivo. La expresión "célula secundaria" o "cepa celular" se refiere a las células en todos los subsiguientes pasos de cultivo. Esto quiere decir que la primera vez que una célula primaria cultivada en placa de cultivo es retirada del sustrato de cultivo y puesta de nuevo en placa de cultivo (subcultivada), recibe aquí el nombre de célula secundaria, al igual como todas las células de los pases subsiguientes. Las células secundarias son cepas celulares que constan de células secundarias que han sido puestas en subcultivo una o varias veces. Una cepa celular consta de células secundarias que: 1) han sido puestas en subcultivo una o varias veces; 2) presentan un número finito de duplicaciones de la población media en cultivo; 3) presentan las propiedades de crecimiento dependiente del anclaje e inhibido por contacto (la dependencia del anclaje no es de aplicación a las células que son propagadas en cultivo en suspensión); y 4) no están inmortalizadas. Una "cepa celular clonal" está definida como una cepa celular que tiene su origen en una única célula fundadora. Una "cepa celular heterogénea" está definida como una cepa celular que tiene su origen en dos o más células fundadoras.

Las células primarias o secundarias que tienen su origen en un vertebrado, y en particular en un mamífero, pueden ser transfectadas con una secuencia de ácido nucleico exógeno, lo cual incluye a una secuencia de ácido nucleico que

codifique un péptido señal y/o a una secuencia de ácido nucleico heterólogo que p. ej. codifique Wnt, y producen el producto codificado de manera estable y reproducible *in vitro* e *in vivo*, a lo largo de prolongados periodos de tiempo. Un aminoácido heterólogo puede también ser una secuencia reguladora, como p. ej. un promotor, que ocasione la expresión, y p. ej. la regulación hacia arriba o expresión inducible, de una secuencia de Wnt endógena. Una secuencia de ácido nucleico exógeno puede ser introducida en una célula primaria o secundaria mediante recombinación homóloga como se describe, por ejemplo, en la Patente U.S. N° 5.641.670, cuyo contenido queda incorporado a la presente por referencia.

Las células primarias o secundarias transfectadas pueden también incluir DNA que codifique un marcador seleccionable que les confiera un fenotipo seleccionable, facilitando su identificación y aislamiento. Son parte de la presente invención los métodos para producir células primarias y secundarias transfectadas que expresen de manera estable DNA sintético exógeno, cepas celulares clonales y cepas celulares heterogéneas de tales células transfectadas, los métodos para producir las cepas celulares heterogéneas clonales y los métodos para tratar o prevenir un estado anormal o indeseable mediante el uso de poblaciones de células primarias o secundarias transfectadas.

15 *Transfección de Células Primarias o Secundarias de Cepas Celulares Clonales o Heterogéneas*

El tejido de vertebrado puede obtenerse por métodos estándar tales como una biopsia por punción u otros métodos quirúrgicos para obtener una fuente tisular del tipo de célula primaria de interés. Por ejemplo, se usa la biopsia por punción o la retirada de un folículo piloso para obtener una fuente de fibroblastos, queratinocitos o células endoteliales, como p. ej. células de folículo piloso o células DP. Se obtiene del tejido una mezcla de células primarias usando métodos conocidos tales como la digestión enzimática o la toma de un explante. Si se usa digestión enzimática, pueden usarse enzimas tales como colagenasa, hialuronidasa, dispasa, pronasa, tripsina, elastasa y quimotripsina.

La mezcla de células primarias resultante puede ser transfectada directamente, o bien puede ser primeramente puesta en cultivo, retirada de la placa de cultivo y puesta nuevamente en suspensión antes de realizar la transfección. Las células primarias o las células secundarias son combinadas con secuencia de ácido nucleico exógeno para p. ej. integrarla de manera estable en sus genomas, y son tratadas a fin de llevar a cabo la transfección. La secuencia de ácido nucleico exógeno puede opcionalmente incluir DNA que codifique un marcador seleccionable. La secuencia de ácido nucleico exógeno y el DNA que codifica al marcador seleccionable pueden estar en constructos independientes o en un único constructo. Se usa una cantidad de DNA apropiada para asegurar que sea producida al menos una célula transfectada de manera estable que contenga y exprese apropiadamente el DNA exógeno. En general se usan aproximadamente de 0,1 a 500 μ g de DNA.

En el sentido en el que se le utiliza en la presente, el vocablo “transfección” incluye a una variedad de técnicas para introducir un ácido nucleico exógeno en una célula, incluyendo la precipitación de fosfato cálcico o cloruro cálcico, la microinyección, la transfección mediada por DEAE-dextrina, la lipofección o la electroforación.

La electroforación es realizada al voltaje y a la capacitancia (y con la correspondiente constante de tiempo) aproximadamente necesarios para redundar en la entrada del constructo o de los constructos de DNA en las células primarias o secundarias. La electroforación puede ser realizada dentro de una extensa gama de voltajes (p. ej. de 50 a 2000 voltios) y con la correspondiente capacitancia. Se usa generalmente DNA total de aproximadamente 0,1 a 500 μ g.

Pueden también usarse para transfectar las células métodos tales como el de la precipitación de fosfato cálcico, la precipitación de fosfato cálcico modificada y la precipitación de polibreno, la fusión de liposomas y el suministro de genes mediado por receptores. Las células primarias o secundarias pueden ser también transfectadas usando microinyección. Una célula transfectada de manera estable puede ser entonces aislada y cultivada y subcultivada bajo las condiciones de cultivo adecuadas y por espacio de un periodo de tiempo suficiente para propagar de manera estable las células secundarias transfectadas y producir una cepa celular clonal de células secundarias transfectadas. Como alternativa, se realiza el cultivo y el subcultivo de más de una célula transfectada, lo cual redundará en la producción de una cepa celular heterogénea.

Las células primarias o secundarias transfectadas experimentan una duplicación lo suficientemente cuantiosa como para producir una cepa celular clonal o una cepa celular heterogénea de proporciones suficientes como para aportar a un individuo en cantidades eficaces la proteína terapéutica. En general, por ejemplo, 0,1 cm² de piel de biopsia se supone que contienen 1.000.000 de células; y una célula se usa para producir una cepa celular clonal y experimenta aproximadamente 27 duplicaciones para producir 100 millones de células secundarias transfectadas. Si tiene que producirse una cepa celular heterogénea a partir de una población transfectada original de aproximadamente 1.000.000 de células, se necesitan solamente 10 duplicaciones para producir 100 millones de células transfectadas.

El número de células necesarias en una cepa celular heterogénea clonal transfectada es variable y depende de una variedad de factores entre los que se incluyen, aunque sin carácter limitativo, el uso de las células transfectadas, el nivel funcional del DNA exógeno en las células transfectadas, el sitio de implantación de las células transfectadas (por ejemplo, el número de células que puede usarse se ve limitado por el sitio anatómico de implantación) y la edad, el área superficial y el estado clínico del paciente. Para poner estos factores en perspectiva, para suministrar niveles terapéuticos de hormona de crecimiento humano a un paciente de 10 kg que esté por lo demás sano pero tengo deficiencia de hormona de crecimiento aislada, serían aproximadamente necesarios de cien a quinientos millones de fibroblastos transfectados (el volumen de estas células es aproximadamente el de la punta del pulgar del paciente).

Implantación de Cepa Celular Clonal o Cepa Celular Heterogénea de Células Secundarias Transfectadas

Las células transfectadas, como p. ej. células producidas como aquí se describe, pueden ser introducidas en un individuo a quien deba serle administrado el producto. La cepa celular clonal o la cepa celular heterogénea es entonces
 5 introducida en un individuo. Pueden usarse varias rutas de administración y varios sitios (como p. ej. la implantación renal subcapsular, subcutánea, en el sistema nervioso central (incluyendo la intratecal), intravascular, intrahepática, intraesplénica, intraperitoneal (incluyendo la intraomental) e intramuscular). Una vez implantadas en el individuo, las células transfectadas producen el producto codificado por el DNA heterólogo o son afectadas por el propio DNA heterólogo. Por ejemplo, un individuo que padezca de una afección relacionada con la angiogénesis indeseada es
 10 candidato a la implantación de células productoras de Wnt.

Puede hacerse al individuo una pequeña biopsia de piel; siendo éste un procedimiento sencillo que puede ser llevado a cabo sin internar al paciente. El pedazo de piel se toma por ejemplo de debajo del brazo, y puede necesitarse aproximadamente un minuto para retirarlo. La muestra es elaborada para así obtener como resultado de ello el
 15 aislamiento de la célula del paciente (como p. ej. fibroblastos) y manipulada genéticamente para producir Wnt u otra proteína o molécula que induzca la producción de Wnt. Sobre la base de la edad, del peso y del estado clínico del paciente, el requerido número de células es cultivado en cultivo a gran escala. Todo el proceso vendría a requerir 4-6 semanas, y al final de ese periodo de tiempo se procede a introducir en el individuo el número apropiado de células manipuladas genéticamente, de nuevo sin internar al paciente (p. ej. inyectándolas bajo la piel del paciente, p. ej. en el
 20 cuero cabelludo o en la cara). El paciente es ahora capaz de producir Wnt que puede mejorar los síntomas de pérdida capilar.

Para algunos éste será un tratamiento que se hará una sola vez, y para otros será necesaria una pluralidad de tratamientos de celuloterapia.

Como sugiere este ejemplo, las células que se usen serán generalmente células manipuladas genéticamente de manera específica del paciente. Es sin embargo posible obtener células de otro individuo de la misma especie o de una especie distinta. El uso de tales células puede requerir la administración de un inmunosupresor, la alteración de antígenos de histocompatibilidad, o el uso de un dispositivo de barrera para impedir el rechazo de las células
 30 implantadas.

Las células primarias o secundarias transfectadas pueden ser administradas en solitario o en conjunción con una barrera o agente para inhibir la respuesta inmune contra la célula en un sujeto receptor. Por ejemplo, puede serle administrado a un sujeto un inmunosupresor para inhibir o interferir en la respuesta normal en el sujeto. Preferiblemente,
 35 el agente inmunosupresor es un fármaco inmunosupresor que inhibe la actividad de las células T o las células B en un sujeto. Están disponibles comercialmente ejemplos de tales fármacos inmunosupresores (siendo p. ej. la ciclosporina A suministrada comercialmente por la Sandoz Corp., de East Hanover, NJ).

Un agente inmunosupresor, como p. ej. un fármaco, puede serle administrado a un sujeto a razón de una dosificación suficiente para lograr el efecto terapéutico deseado (como p. ej. la inhibición del rechazo de las células). Son conocidas en la técnica las gamas de dosificaciones para fármacos inmunosupresores. Véanse, p. ej., Freed y otros (1992) *N. Engl. J. Med.* 327:1549; Spencer y otros (1992) *N. Engl. J. Med.* 327:1541, y Widner y otros (1992) *n. Engl. J. Med.* 327:1556. Los valores de dosificación pueden variar según factores tales como el estado morbos, la edad, el sexo y el peso del individuo.

Otro agente que puede ser usado para inhibir la actividad de las células T en un sujeto es un anticuerpo o un fragmento o derivado del mismo. Son conocidos en la técnica anticuerpos capaces de agotar o secuestrar las células T *in vivo*. Pueden usarse antisueros policlonales, como por ejemplo suero anti-linfocitos. Como alternativa, pueden usarse uno o varios anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos agotadores de las células T preferidos incluyen anticuerpos
 50 monoclonales que se fijan al ligando CD2, CD3, CD4, CD8 o CD40 en la superficie celular. Tales anticuerpos son conocidos en la técnica y pueden ser suministrados comercialmente, por ejemplo, por la Colección Americana de Cultivos Tipo. Un anticuerpo preferido para fijarse al CD3 en las células T humanas es el OKT3 (ATCC CRL 8001).

Un anticuerpo que agote, secuestre o inhiba las células T dentro de un sujeto receptor puede ser administrado en una dosis por espacio de un apropiado periodo de tiempo para inhibir el rechazo de las células tras el trasplante. Los anticuerpos son preferiblemente administrados por vía intravenosa en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable (como p. ej. solución salina).

Una ventaja del uso de células transfectadas o secundarias es la de que a base de controlar el número de células
 60 que se introduce en un individuo puede controlarse la cantidad de proteína suministrada al cuerpo. Adicionalmente, en algunos casos es posible retirar las células transfectadas si no sigue habiendo necesidad del producto. Una adicional ventaja del tratamiento realizado mediante el uso de células primarias o secundarias transfectadas de la presente invención es la de que la producción del producto terapéutico puede ser regulada, tal como mediante la administración de cinc, esteroides o un agente que afecte a la transcripción de una proteína, un producto o un producto de ácido nucleico o afecte a la estabilidad de un producto de ácido nucleico.

Administración

Un agente que module el nivel de expresión de una proteína Wnt puede ser administrado a un sujeto por métodos estándar. Por ejemplo, el agente puede ser administrado por las de una serie de distintas rutas entre las que se incluyen la intravenosa, la intradérmica, la subcutánea, la oral (p. ej. mediante inhalación), la transdérmica (tópica) y la transmucosal. En una realización, el agente modulador de Wnt puede ser administrado por vía tópica.

El agente que modula los niveles de proteína Wnt, como p. ej. moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, fragmentos o análogos de Wnt, moduladores de Wnt y anticuerpos anti-Wnt (que también reciben aquí el nombre de “compuestos activos”) puede ser incorporado a composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un sujeto, como p. ej. un humano. Tales composiciones típicamente incluyen la molécula de ácido nucleico, el polipéptido, el modulador o el anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En el sentido en el que se la utiliza en la presente, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cualesquiera de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y sustancias similares que son compatibles con la administración farmacéutica. Es conocido el uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, tales medios pueden ser usados en las composiciones de la invención. Pueden ser también incorporados a las composiciones compuestos activos suplementarios.

Una composición farmacéutica puede hacerse de forma tal que sea compatible con su ruta de administración prevista. Las soluciones o suspensiones que se usen para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los componentes siguientes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijados, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ser ajustado con ácidos o bases tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral puede ir envasada en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiple hechos de vidrio o de plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para ser usadas como composiciones inyectables incluyen las dispersiones o soluciones acuosas estériles (cuando haya hidrosolubilidad) y los polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen la salina fisiológica, el agua bacteriostática, el Cremophor EL^{MF} (MF = marca de fábrica) (BASF, de Parsippany, NJ) o la salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y deberá ser fluida hasta el punto de poder ser fácilmente inyectada con jeringa. La composición debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe quedar protegida contra la acción contaminante de microorganismos tales como las bacterias y los hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (como por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y sustancias similares) y adecuadas mezclas de los mismos. La correcta fluidez puede ser mantenida, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del requerido tamaño de partículas en el caso de la dispersión y mediante el uso de agentes superficiales. Puede lograrse impedir la acción de los microorganismos mediante distintos agentes antibacterianos y antifúngicos, como por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y sustancias similares. En muchos casos será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, como por ejemplo azúcares y polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro sódico. Puede lograrse la prolongada absorción de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, como por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo (como p. ej. un polipéptido Wnt o un anticuerpo anti-Wnt) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno de los ingredientes o una combinación de los ingredientes que han sido enumerados anteriormente, según se requiera, y efectuando a continuación esterilización con filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes que se requieran de entre los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el de secado al vacío y el de secado por congelación, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente sometida a filtración estéril.

Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un vehículo comestible. Dichas composiciones orales pueden ir encerradas en cápsulas de gelatina o comprimidas en forma de tabletas. A efectos de administración terapéutica oral, el compuesto activo puede ir incorporado en excipientes y puede ser usado en forma de tabletas, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales pueden ser también preparadas usando un vehículo fluido destinado al uso como colutorio, siendo el compuesto en el vehículo fluido aplicado oralmente y usado como enjuague y escupido o tragado. Pueden incluirse como parte de la composición agentes de fijación y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y presentaciones similares pueden contener cualesquiera de los ingredientes que se indican a continuación o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o

Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sucrosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o saborizante de naranja.

La administración sistémica puede también ser por vía transmucosal o transdérmica. Para administración transmu-
cosal o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a atravesar. Tales penetrantes
son del dominio público e incluyen, por ejemplo para administración transmucosal, detergentes, sales de la bilis y de-
rivados de ácido fusídico. La administración transmucosal puede ser llevada a cabo mediante el uso de sprays nasales
o supositorios. Para administración transdérmica se hacen con los compuestos activos como es del dominio público en
la técnica ungüentos, pomadas, geles o cremas. Tales formulaciones transdérmicas pueden ser aplicadas a la piel para
estimular o inhibir el crecimiento capilar.

En una realización, los compuestos activos son preparados con vehículos que protegerán al compuesto contra
la rápida eliminación fuera del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes
y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles biodegradables tales como
vinilacetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, polioctoésteres y ácido poliláctico. Resultarán
obvios para los expertos en la materia los métodos de preparación de tales formulaciones. Los materiales pueden
ser también obtenidos comercialmente de la Alza Corporation y de la Nova Pharmaceuticals, Inc. Pueden también
usarse como vehículos farmacéuticamente aceptables suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a
células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales). Éstas pueden ser preparadas según métodos
conocidos para los expertos en la materia, por ejemplo como se describe en la Patente U.S. N° 4.522.811.

Las moléculas de ácido nucleico que aquí se describen pueden ser insertadas en vectores y usadas como vectores
de terapia génica. Los vectores de terapia génica pueden ser suministrados a un sujeto por ejemplo mediante inyección
intravenosa, administración local (véase la Patente U.S. 5.328.470) o inyección estereotáctica (véase p. ej. Chen y
otros, *PNAS* 91:3054-3057, 1994). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de
terapia génica en un diluyente aceptable, o bien puede incluir una matriz de liberación lenta en la cual esté embebido
el vehículo de suministro de genes. Como alternativa, cuando el vector de suministro de genes completo pueda ser
producido intacto desde células recombinantes, como p. ej. vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede
incluir una o varias células que produzcan el sistema de suministro de genes.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar incluidas en un envase, paquete o dispensador junto con instruccio-
nes para la administración.

El agente que modula el nivel de proteína Wnt puede ser administrado mediante administración local, como p. ej.
administración tópica. El agente puede ser aplicado en una sola vez, o bien puede ser administrado continuamente, o
sea que p. ej. el agente es administrado con una frecuencia suficiente como para que el efecto del nivel de proteína
Wnt se mantenga por espacio de un periodo de tiempo seleccionado de p. ej. 5, 10, 20, 30, 50, 90, 180 o 365 días o
más. Puede también repetirse la administración de un agente que module, o sea que p. ej. incremente o inhiba, el nivel
de una proteína Wnt, como p. ej. un polipéptido Wnt o un anticuerpo anti-Wnt.

Otras Realizaciones

Se entiende que si bien la invención ha sido descrita en conjunción con la descripción detallada de la misma, la
precedente descripción pretender ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que queda definido por el alcance
de las reivindicaciones acompañantes. Quedan dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes otros aspectos,
ventajas y modificaciones.

Otras realizaciones quedan dentro de las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Método que es para estimular el crecimiento capilar en un sujeto y comprende el paso de:

(a) administrar un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo; o

(b) administrar una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo

a un sujeto, estimulando con ello el crecimiento capilar.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el Wnt es incrementado en una célula de papila dérmica del sujeto.

3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que es administrado un polipéptido Wnt o un fragmento funcional del mismo.

4. El método de la reivindicación 3, en el que es administrado un polipéptido Wnt.

5. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que es administrada una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido Wnt.

6. El método de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polipéptido Wnt es Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt7a o Wnt7b.

7. Método que es para valorar si un sujeto está en situación de riesgo de pérdida capilar y comprende el paso de detectar la presencia o ausencia de una lesión genética en un gen Wnt o la expresión incorrecta de un gen Wnt, valorando con ello si un sujeto está en situación de riesgo de pérdida capilar.

8. El método de la reivindicación 7, en el que el gen Wnt es Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt7a o Wnt7b.

9. El método de la reivindicación 7, en el que la lesión genética o la expresión incorrecta es detectada en un folículo piloso del sujeto.

10. El método de la reivindicación 7, en el que la subexpresión de Wnt es indicativa de un riesgo de pérdida capilar.

11. Método que es para identificar un compuesto capaz de estimular el crecimiento capilar y comprende los pasos de:

poner a una célula capaz de expresar un polipéptido Wnt en contacto con un compuesto de ensayo; y

determinar el nivel de expresión de ácido nucleico o polipéptido Wnt en la célula, donde un compuesto capaz de incrementar la expresión de ácido nucleico o polipéptido Wnt es indicativo de un compuesto capaz de estimular el crecimiento capilar,

identificando con ello un compuesto capaz de estimular el crecimiento capilar.

12. El método de la reivindicación 11, en el que el polipéptido Wnt es Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt7a o Wnt7b.

13. El método de la reivindicación 11, en el que el compuesto de ensayo es un fragmento o análogo de Wnt.

14. El método de la reivindicación 11, en el que la célula es una célula de folículo piloso.

15. Método que es para identificar un compuesto capaz de inhibir el crecimiento capilar y comprende los pasos de:

poner a una célula capaz de expresar un polipéptido Wnt en contacto con un compuesto de ensayo; y

determinar el nivel de expresión de ácido nucleico o polipéptido Wnt en la célula, donde un compuesto capaz de reducir la expresión de ácido nucleico o polipéptido Wnt es indicativo de un compuesto capaz de inhibir el crecimiento capilar,

identificando con ello un compuesto capaz de inhibir el crecimiento capilar.

16. El método de la reivindicación 15, en el que el polipéptido Wnt es Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt7a o Wnt7b.

17. El método de la reivindicación 15, en el que el compuesto de ensayo es un antagonista de Wnt.

18. El método de la reivindicación 15, en el que la célula es una célula de folículo piloso.

ES 2 290 125 T3

19. Método que es para cultivar una célula de papila dérmica (DP) y comprende el paso de cultivar la célula DP en presencia de un nivel incrementado de Wnt o un agente que imita un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt.

5 20. El método de la reivindicación 19, en el que el agente es cloruro de litio.

21. El método de la reivindicación 19, en el que es añadido al cultivo un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo.

10 22. El método de la reivindicación 19, en el que la célula DP es cultivada en presencia de una célula que expresa un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo.

15 23. Medio de cultivo para células de papila dérmica (DP) que comprende: un polipéptido Wnt o un fragmento funcional o análogo del mismo, o un agente que imita un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt.

24. El medio de cultivo de la reivindicación 23, en el que el agente es cloruro de litio.

20 25. Método que es para estimular o mantener la expresión génica de la fase de anágeno en una célula de papila dérmica (DP) y comprende el paso de incrementar el nivel de proteína Wnt o imitar un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt en la célula DP.

26. El método de la reivindicación 25, en el que la proteína Wnt es Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt7a o Wnt7b.

25 27. El método de la reivindicación 25, en el que el paso de imitar un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt comprende el paso de inhibir la fosforilación de β -catenina en la célula DP.

28. El método de la reivindicación 25, en el que el paso de imitar un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt en la célula DP comprende el paso de poner a la célula en contacto con cloruro de litio.

30 29. Método que es para proporcionar y mantener un injerto de células de papila dérmica (DP) y comprende el paso de cultivar una célula DP sacada a un sujeto bajo condiciones que inducen o imitan un efecto de transducción de señales estimulada por Wnt, proporcionando y manteniendo con ello un injerto de células de papila dérmica (DP).

35 30. El método de la reivindicación 29, en el que la célula de papila dérmica es cultivada en presencia de Wnt o un fragmento o análogo del mismo.

40 31. El método de la reivindicación 29, en el que la célula de papila dérmica es cultivada en presencia de cloruro de litio.

32. El método de la reivindicación 29, en el que la célula de papila dérmica es cultivada en presencia de β -catenina y/o LEF-1.

45 33. El método de la reivindicación 29, en el que la célula de papila dérmica es cultivada en presencia de un agente que inhibe la fosforilación de β -catenina.

34. El método de la reivindicación 29, en el que la célula de papila dérmica es cultivada en presencia de un agente que inhibe la quinasa GSK3 β .

50 35. El método de la reivindicación 29, en el que la célula de papila dérmica es cultivada en presencia de un agente que estimula la acumulación de β -catenina.

36. El método de la reivindicación 29, en el que la célula DP es devuelta al mismo sujeto o a un sujeto distinto.

55 37. Uso de:

(a) un polipéptido Wnt o fragmento funcional o análogo del mismo; o

60 (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido Wnt o fragmento funcional o análogo del mismo; en la preparación de un medicamento para estimular el crecimiento capilar en un sujeto.

38. El uso de la reivindicación 37, en el que el crecimiento capilar es estimulado mediante el incremento de Wnt en una célula de papila dérmica del sujeto.

65 39. El uso de la reivindicación 37 ó 38, en el que se usa un polipéptido Wnt o un fragmento funcional del mismo.

ES 2 290 125 T3

40. El uso de la reivindicación 39, en el que se usa un polipéptido Wnt.

41. El uso de la reivindicación 37 ó 38, en el que se usa una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido Wnt.

42. El uso de las reivindicaciones 37 a 41, en el que el polipéptido Wnt es Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt7a o Wnt7b.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65