



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 345 256**

⑮ Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **04765894 .3**

⑯ Fecha de presentación : **08.10.2004**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1673475**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.2006**

⑭ Título: **Composiciones para diagnosis y terapia de enfermedades asociadas con la expresión aberrante de futrinas (R-Espondinas) y/o Wnt.**

⑩ Prioridad: **10.10.2003 EP 03023000**

⑬ Titular/es: **Deutsches Krebsforschungszentrum
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.09.2010

⑭ Inventor/es: **Niehrs, Christof;
Wu, Wei;
Klinka, Andrei y
Kazanskaya, Olga**

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.09.2010

⑭ Agente: **Justo Bailey, Mario de**

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

Composiciones para diagnosis y terapia de enfermedades asociadas con la expresión aberrante de futrinas (R-Espondinas) y/o Wnt.

5 La presente invención se refiere a composiciones útiles para la diagnosis y terapia de enfermedades asociadas con la expresión aberrante de los genes que codifican las proteínas Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 (=R-Espondina 2, 3, 1 y 4, respectivamente). Estas enfermedades incluyen tumores de v.g. la mama, el ovario, hígado, útero, cérvix, colon, pulmón, ovario, recto, testículo, páncreas, huesos y piel, así como enfermedades que implican músculo, hueso, metabolismo de 10 lípidos y glucosa, y obesidad. La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que contiene un compuesto que es capaz de modificar (a) la expresión del gen que codifica Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 o (b) la actividad de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4.

15 La cascada de señalización Wnt juega un papel crucial en lo que respecta a la regulación de la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células durante la embriogénesis, y el adulto como se muestra, v.g., en *Drosophila*, *Xenopus* y ratones (Nusse y Varmus, *Cell* 69 (1992), 1073-1087). Los genes Wnt codifican glicoproteínas secretoras que activan una cascada de señalización bien caracterizada por la vía de un receptor Wnt denominado "frizzled" (ensortijado).

20 La cascada de señalización Wnt y sus componentes juegan también un papel importante en diversas enfermedades, lo que hace deseable modular su actividad:

i) *Cáncer*

25 La tumorigénesis representa un proceso multietápico complejo en el cual se cree que cambios genéticos y factores ambientales desregulan los procesos celulares que controlan la proliferación y diferenciación de las células. Varios estudios indican que una cascada de señalización Wnt aberrante está implicada en el desarrollo de cáncer de colon, cáncer de mama y melanoma (Pfeifer, *Science*, 275 (1997), 1752-1753; Polakis, *Genes Dev.* 14 (2000), 1837-1851). El primer gen codificante de una proteína de la cascada de señalización Wnt, *int-1*, fue aislado del virus del tumor 30 mamario del ratón (MMTV) y pudo demostrarse que se trata de un oncogén. Por consiguiente está bien establecido que una regulación aberrante de la actividad Wnt y/o componentes de la cascada de señalización Wnt aguas abajo de la señal Wnt, v.g., beta-catenina y APC, están implicadas en la tumorigénesis.

ii) *Enfermedad ósea*

35 Las señales Wnt promueven la formación de hueso (v.g. Yang, *Development*, 130 (2003), 1003-15; Fischer, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 30870-30878). Coherenteamente con esta idea, una mutación de aumento de función del receptor Wnt LRP5 causa enfermedad grave de los huesos (Boyden, *et al.*, 346 (2002) *N Engl J Med*, 1513-21.; Little, *et al.*, 70 (2002) *Am J Hum Genet*, 11-9.). Inversamente, la desactivación de las mutaciones en LRP5 conduce a un síndrome de 40 osteoporosis-pseudoglioma en humanos (Kato, *et al.*, 157 (2002) *J Cell Biol*, 303-14.; Gong, *et al.*, 107 (2001) *Cell*, 513-23.).

iii) *Enfermedad oftálmica*

45 La desactivación de la mutación en el receptor Wnt LRP5 conduce a pseudoglioma en humanos y malformaciones de los ojos en los ratones (Mato, *et al.*, 157 (2002) *J Cell Biol* 303-314; Gong, *et al.*, 107 (2001) *Cell*, 513-523).

iv) *Riñón*

50 La señalización aberrante Wnt está implicada en la fibrosis renal (Surendran, *Am J Physiol Renal Physiol* 282 (2002) 431-441) y la enfermedad de riñón poliquístico (Saadi-Khedouci, *Oncogene* 20 (2001) 5972-5981).

v) *Metabolismo de lípidos y glucosa, obesidad*

55 La deficiencia del receptor Wnt LRP5 en los ratones conduce a niveles incrementados de colesterol en plasma en los ratones alimentados con una dieta rica en grasa, debido al aclaramiento hepático reducido de los residuos de quilomicrones. Adicionalmente, cuando se alimentan con una dieta normal, los ratones deficientes en LRP5 exhiben una tolerancia notablemente empeorada a la glucosa (Fujino, *et al.*, 100 (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 229-234.) La administración del antagonista de LRP5 Dkk1 a los ratones reduce la absorción de glucosa en diversas líneas de 60 células y disminuye la deposición de grasa (WO 02/066509).

65 Está claro por consiguiente, partiendo de lo anterior, que el camino de señalización Wnt está implicado en una diversidad de enfermedades humanas. Sin embargo, están insuficientemente disponibles medios para la terapia o diagnóstico de las enfermedades asociadas con una cascada de señalización Wnt disgregada. Por ello, el uso de marcadores moleculares fiables de diagnóstico sería útil para una comprensión de la base molecular de las enfermedades asociadas con una cascada de señalización Wnt aberrante. Puede esperarse que tales marcadores sean también útiles para terapia y para el desarrollo de nuevas vías terapéuticas para tratamiento de las enfermedades dependientes de la cascada de señalización Wnt, como se ha detallado arriba.

ES 2 345 256 T3

Así pues, el problema técnico que subyace en la presente invención es proporcionar medios para diagnosis y terapia de enfermedades asociadas con una cascada de señalización Wnt aberrante.

La solución a dicho problema técnico se obtiene por la provisión de las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Durante los experimentos que condujeron a la presente invención, pudieron identificarse 4 genes, *Futrina 1, 2, 3, y 4*, cuyos productos son moduladores del camino Wnt. *Futrina 2* se identificó previamente como hPWTsr (Chen *et al.*, 29 (2002), Mol. Biol. Rep. 287-292), una proteína de papel o función anteriormente desconocido, expresada en numerosos tipos de células. Adicionalmente, la *Futrina humana 1, 2, 3 y 4* fueron descritas como Polipéptidos Semejantes a Factores del Crecimiento de las Células Madre, que son capaces de promover proliferación de las células madre hematopoyéticas (WO-A-01/77169; WO-A-01/07611).

En la presente invención, se demuestra por primera vez lo que sigue: 1) las *Futrinas* intensifican la señalización Wnt y esto tiene relevancia fisiológica dado que la inhibición de *Futrina 1 ó 2* da como resultado la inhibición de la cascada de señalización Wnt (señalización Wnt/β-catenina). Estos datos demuestran que las *Futrinas* pueden considerarse como moduladores Wnt. La *Futrina 1* (*Rspo2*) es coexpresada con y regulada positivamente por las señales Wnt y tiene efectos sinérgicos con Wnt para activar β-catenina. El análisis de la interacción funcional con los componentes del camino Wnt/β-catenina sugiere que *Rspo2* funciona extracelularmente al nivel de la interacción receptor-ligando. 2) Experimentos con morfolino antisentido en embriones de *Xenopus* y experimentos de RNAi en células HeLa revelaron que *Rspo2* es necesaria para la señalización Wnt/β-catenina. En embriones de *Xenopus* empobrecidos en *Rspo2*, los marcadores musculares *myoD* y *myf5* no pueden activarse y el desarrollo muscular posterior resulta deteriorado. Los resultados indican que *Rspo2* es un nuevo activador de la cascada Wnt/β-catenina. Así, las *Futrinas* como *Rspo2* (*Futrina 1*) son útiles para la diagnosis y el desarrollo de terapias para enfermedades mediadas Wnt-LRP, con inclusión, pero sin carácter limitante, de la supresión de tumores, formación de hueso, metabolismo de colesterol y glucosa (con inclusión de la diabetes), obesidad, enfermedad renal y enfermedad oftálmica. 3.) Dado que los datos obtenidos demuestran que se requiere *Futrina 1* para la formación de músculo, *Futrina 1* es útil para la diagnosis y el desarrollo de terapias para enfermedades relacionadas con los músculos, con inclusión de la regeneración muscular. 3.) Los datos demuestran que las *Futrinas* se expresan aberrantemente en una diversidad de tumores humanos. Así pues, las *Futrinas* son útiles para la diagnosis de tumores y el desarrollo de terapias del cáncer. Por ejemplo, se ha encontrado que en la mayoría de los tumores, la expresión de *Futrinas 1-3* está reducida radicalmente (colon, estómago, pulmón, tumores de recto para *Futrina 1*, mama, ovario, vejiga, útero, cérvix, tumores de recto para *Futrina 2*, tumores de útero y cérvix para *Futrina 3*). En un pequeño número de casos, la expresión de *Futrina 1-3* está regulada en sentido creciente (un caso de tumor de estómago para *Futrina 1 y 2*, tumor de ovario para *Futrina 3*). *Futrina 4* exhibe un nivel muy bajo de expresión en la mayoría de los tejidos estudiados, excepto en el ovario.

Así pues, la inhibición de la cascada de señalización Wnt por inhibición de la expresión/actividad de las *Futrinas* o por estimulación de la expresión/actividad de las *Futrinas* tendrá un efecto terapéutico. Análogamente, la activación de la cascada de señalización Wnt por disminución de la expresión de *Futrina* y/o por represión de la actividad del polipéptido propiamente dicho tendrá un efecto terapéutico.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Identificación de *Futrina 1 (Rspo2)* de *Xenopus*

El informador TOP-FLASH, el DNA vector de agrupaciones de 250 clones cada una y pCSfrizzled8 se co-transfectoron. Se llevaron a cabo ensayos de informadores luciferasa en células 293T en placas de 96 pocillos por duplicado como se ha descrito (Wu *et al.*, Curr Biol 10 (2000), 1611-1614). La actividad de luciferasa se normalizó contra la actividad de Renilla-luc cotransfектada utilizando un kit comercial (Clonetech). RLU: unidades relativas de luciferasa.

Figura 2: *Futrina 1 (Rspo2)* promueve la señalización Wnt/β-catenina

(A) Identificación de *Rspo2* de *Xenopus* por cribado de la expresión.

Se llevó a cabo un cribado de la expresión en células 293T transfectadas con un informador sensible a Wnt (TOP-FLASH) y agrupaciones de DNA plasmídico de una biblioteca de cDNA de ojos de *Xenopus*. RLU: unidades relativas de luz.

(B) El término C de *Rspo2* media la retención en la superficie celular.

Se transfectaron *Rspo2* marcada con Myc (wt) o *Rspo2ΔC* (ΔC) en células 293T, y se analizaron el lisado de células y el medio por transferencia Western. Co, células no transfectadas.

(C) *Rspo2* activa la señalización Wnt/β-catenina. Se llevaron a cabo ensayos del informador TOPFLASH de luciferasa en células 293T con los DNAs transfectados siguientes: *Wnt1* de ratón (Wnt) 5 ng; *frizzled8* (fz) de ratón, 1 ng; *Rspo2* de *Xenopus* (*Rspo2*), 0,1, 0,3, 0,9 y 2,7 ng.

ES 2 345 256 T3

(D) Rspo2 intensifica la señalización Wnt3a. Se añadieron Wnt3a de ratón, Rspo2ΔC de *Xenopus* (Rspo2ΔC) o medios falsamente acondicionados a células 293C seguido por ensayos informadores luciferasa TOPFLASH.

(E) Rspo2 estabilizada la β -catenina. (arriba) Se trataron células 293T con Rspo2ΔC, Wnt3a o medios falsamente acondicionados durante 1 ó 4 horas como se indica. Se sometieron fracciones de citosol a transferencia Western y se sondaron respecto a β -catenina y α -tubulina (control de carga). (abajo) Tinción inmunohistoquímica de β -catenina en células SHEP después de tres horas de tratamiento con los medios acondicionados indicados. Las puntas de flecha indican β -catenina nuclear. El porcentaje de células que exhibían la tinción representada es 90% (Co), 85% (rspo2), 80% (Wnt3a) y 90% (Wnt3a+Rspo2).

(F) Análisis de dominios de Rspo2. (arriba) Dibujo esquemático de Rspo2 de *Xenopus* y constructos de delección. sp, péptido señal; FU1, 2, dominios semejantes a furina; TSP1, dominio de trombospondina tipo 1; C, término C cargado positivamente. (abajo) Se llevaron a cabo ensayos con el informador luciferasa TOPFLASH en células 293T con los constructos indicados. Se configuró una producción igual de proteínas por transferencia Western (datos no presentados).

Figura 3: Alineación de ácido nucleico multisecuencia de cDNAs codificantes de Futrina humana 1, 2, 3 y 4 y Futrina 1 de *Xenopus*

Los nucleótidos idénticos se resaltan en negro. Todas las secuencias de ácido nucleico comienzan con el codón ATG iniciador de la traducción indicado con un asterisco.

Figura 4: Alineación multisecuencia de aminoácidos de Futrina humana 1, 2, 3 y 4 deducida de los cDNAs humanos (véase la Figura 3)

Los aminoácidos idénticos se resaltan en negro, los aminoácidos similares se muestran en gris.

Figura 5: Las Futrinas promueven la señalización Wnt

Experimentos de cotransfección en células 293T. Se llevaron a cabo ensayos con el informador luciferasa sensible a Wnt en placas de 96 pocillos por triplicado como se ha descrito (Wu *et al.*, Curr Biol 10 (2000), 1611-1614). La actividad de luciferasa se normalizó contra la actividad de Renilla utilizando un kit comercial (Clonetech). Wnt1 = Wnt1 de ratón, fz8 = frizzled8 de ratón, Futr1 = Futr1 de *Xenopus*, Wnt3a = Wnt3a de ratón, (0,1 ng) en A indica la cantidad de DNA plasmídico transfectada por pocillo, RLU = unidades relativas de luciferasa.

Figura 6: Comparación de secuencias de las proteínas Rspo humanas (hR-espondina 1 a 4)

(A) Alineación de proteínas Rspo humanas (h) (correspondiente a las alineaciones de Futz1-4 humana en la Figura 4, excepto que se utilizan designaciones diferentes). El péptido señal, los dominios semejantes a furina y el dominio de trombospondina tipo 1 están subrayados y los aminoácidos conservados se muestran en negro.

(B, C) Matriz de homología de Rspo que muestra una vista de conjunto de la identidad de aminoácidos en % entre las proteínas Rspo humanas (B) y entre las proteínas Rspo2 de *Xenopus* (X) o ratón (m) y proteínas Rspo humanas, respectivamente (C).

Figura 7: Futrina humana 1 y 2 son necesarias para la señalización Wnt

Se transfecaron células HeLa en placas de 24 pocillos con el informador Wnt 7LEF-Rev-fosLuc y los plásmidos pRL-TK y pSuper que producen o bien siRNA contra Futr1 y 2 humanas o un control sin sentido. Tres días después de la transfección, se añadió medio acondicionado Wnt3a de ratón al cultivo para estimular la señalización Wnt. Veinticuatro horas más tarde, se determinó la actividad de luciferasa.

Figura 8: Análisis de la expresión de R-espondinas de *Xenopus* y ratón

A) Expresión de Rspo2 durante el desarrollo de *Xenopus* en las etapas embrionarias que se indican, analizada por RT-PCR. Se utilizó para normalización histona H4. -RT, control de transcripción inversa negativa.

(B-H) Hibridaciones *in situ* del montaje entero en *Xenopus* de los genes indicados. (B) Embriones en etapa 11, vista dorso-vegetal; dbl, labio blastoporal dorsal. (C) Embrión de etapa 12, vista dorsal con la parte anterior hacia arriba. Un dominio de expresión neural se indica por una punta de flecha. (D) Embrión de la etapa 15, vista dorsal con la parte anterior hacia arriba. (E) Embrión de la etapa 14, vista dorsal con la parte anterior hacia arriba. (F-G) Embriones de la etapa del primordio de la cola; ba, arcos branquiales; cm, musculatura craneal; di, diencéfalo; dnt, tubo neural dorsal; mbh, límite cerebro medio-cerebro posterior; ov, vesícula auricular; pn, pronefros; pdm, proctodeum; s, somitos; tb, mesodermo del primordio de la cola. El recuadro en F muestra una sección transversal al nivel indicado por la punta de flecha, mostrando la expresión en el tubo neural dorsal y en las partes extremas dorsales y ventrales de los somitos. (H) Cerebro del renacuajo de *Xenopus* disecado (vista lateral) que muestra la expresión en diencéfalos (di) y zona limitante intralámica (zli), donde se expresa el erizo sónico (recuadro). dt, vt, tálamo dorsal y ventral, respectivamente, sc, médula espinal; tel, telencéfalo.

ES 2 345 256 T3

(I-M) Hibridaciones *in situ* del montaje entero en el ratón de los genes indicados. (I) Primordios de los miembros de embriones de ratón de 12,5 días. AER, reborde ectodérmico apical.

(J) Embrión de ratón de 7,5 días que muestra la expresión de *Rspo3* en la línea primitiva.

(K-M) Embriones de ratón de 9,5 días. di, diencéfalo; dnt, tubo neural dorsal; met (sic), metencéfalo; tel, telencéfalo.

Figura 9: *Regulación de las R-espondinas de Xenopus por señalización Wnt*

(A) Comparación del patrón de expresión de *XRspo2*, *XWnt8* y *XWnt3a* en embriones tempranos de néurula por hibridación *in situ* del montaje entero. Vista dorsal, parte anterior hacia arriba.

(B) (arriba) Diagrama del experimento. Se inyectaron embriones de la etapa de cuatro células con 50 pg de pCS-ppl (prolactina), pCSWnt8 o pCS- β -catenina en cada blastómero, se disecaron las DMZs, se cultivaron hasta el equivalente de la etapa 11 y se analizaron por RT-PCR. (abajo) Análisis RT-PCR de los genes indicados. -RT = control de transcripción inversa negativo.

(C-E) Se inyectaron embriones de la etapa de 4 células con 50 pg de pCS-Wnt8, pCS-Wnt3a o pCS-ppl en un solo blastómero y se fijaron en la etapa 11 para hibridación *in situ* con *XRspo2*.

Figura 10: *Se requiere Fitrina 2 para la fracción de músculo*

A. El empobrecimiento en Fitrina 1 causa regulación decreciente de los marcadores musculares precoces y defectos musculares. (A, C, E, G, I, K) Embriones inyectados con oligomorfólico de control (5 ng), con Fut-1-Mo (5 ng). Los oligos se mezclaron con el mRNA trazador de linaje (LacZ) (mancha azul) en (C, D, E, F, G, H) o RNA de prolactina (ppl), visualizado por hibridación *in situ* (mancha roja) (A, B, J, K, L). La hibridación *in situ* con sondas a Xmyf5 (A, B), XmyoD (C, D), Xbra (E, F), Xnot (G, H) y actina muscular (I-L) (tinción magenta). Los embriones en K y L están cortados transversalmente. Obsérvese la reducción de músculo en (L) (lado derecho).

B. Fut1-Mo actúan específicamente para inhibir la traducción de sus constructos de DNA cognados cuando se sobreexpresan en embriones. Se inyectó mRNA (fut1 marcado con mycC-terminal) ecuatorialmente en ambos blastómeros en embriones de la etapa de dos células. Los mismos embriones se inyectaron luego en la etapa de 8 células con 5 ng de Fut1-Mo (pista 3) o morfolino de control (pista 2) en todos los blastómeros vegetales y se recogieron en la etapa 11. La proteína Fitrina 1 marcada se visualizó luego con un anticuerpo A-myc.

C. Rescate de la reducción del marcador muscular causada por Fut1-Mo por coinyección de mRNA de XFut1 que contenía mutaciones puntuales en la región 5' correspondiente a oligomorfólico. Se coinyectaron los embriones con 5 ng de Fut1-Mo (1, 2) con 50 pg de ppl o mRNA de XFut1 radialmente en un solo blastómero en la etapa de 4 células.

Se analizó la expresión de myoD (1, 3) y myf5 (2, 4) por hibridación *in situ*. Todos los embriones se agruparon en tres clases (ejemplos para myoD se muestran en la parte inferior de la figura: embriones con nivel de expresión en el lado inyectado de 1-30% (clase A); 30-60% (clase B); y 70-100% (clase C) del nivel normal. Las barras representan el porcentaje de los embriones correspondiente al tipo A, B o C. (n para Fut-Mo+ppl: 57 embriones para myoD, 45 embriones para myf5; n para Fut-Mo+mRNA Ffut1: 39 embriones para myoD y 41 embriones para myf5).

Figura 11: *Rspo2 promueve diferenciación neural y muscular en Xenopus*

(A) Se inyectaron animalmente (sic) embriones en la etapa de 4 células con 100 pg de *Rspo2*, 100 pg de *XWnt8* o 200 pg de mRNA de β -catenina en cada blastómero. En la etapa 8, las capas animales se disecaron, se cultivaron hasta la etapa equivalente 18 y se analizaron respecto a la expresión de los genes marcadores indicados, -RT, control de transcripción inversa negativo.

(B) Se inyectaron embriones de la etapa de dos células con 100 pg de *Rspo2* o mRNA de *prolactina* (ppl) en cada blastómero. Obsérvese las glándulas de cemento ectópicas (punta de flecha) y el eje corporal acortado en el embrión inyectado con *Rspo2*.

(C-J) Hibridaciones *in situ* del montaje entero de los genes indicados. Embriones en la etapa de 8 células con 100 pg de mRNAs de *Rspo2* o *ppl* como se indica en un blastómero animal. Se coinyectó mRNA de lacZ como trazador de linaje en todos los paneles excepto C, G y H.

(G-H) Néurulas de la etapa 15 en vista anterior.

(I-J) Gástrulas de la etapa 11 en vista vegetal con la parte dorsal hacia arriba.

(K-N) *Rspo2* promueve la formación de músculo. (K) Diagrama de los experimentos. Se inyectaron embriones de la etapa de cuatro células con 50 pg de constructos de DNA plasmídico en todos los blastómeros, se explantaron los

ES 2 345 256 T3

fragmentos indicados en la etapa 10,5, se cultivaron, y se procesaron por hibridación *in situ* del montaje entero (M) de RT-PCR (N).

5 (L) VMZ equivalente de la etapa 40 de explantes LMZ. Obsérvense las estructuras semejantes a cola en Wmzs de los embriones inyectados con *Rspo2*.

(M) Hibridación *in situ* de VMZs de la etapa 25 para actina muscular.

10 (N) Análisis RT-PCR para los genes indicados en los explantes VMZ equivalentes de la etapa 25 y DMZ equivalentes de la etapa 11. Xdd1, dominante negativo. *Xenopus dishevelled*; Co, preprolactina.

Figura 12: *Rspo2* interfiere con *BMP-4*, *Activina* y *Nodal*, pero no con *FGF* en *Xenopus*

15 (A-D) Se inyectaron animalmente (sic) embriones en la etapa de 4 células con los RNAs indicados. En la etapa 8, se disecaron las capas animales, se cultivaron hasta el equivalente a la etapa 10 y se analizaron respecto a la expresión de *Vent2* (A) o *Xbra* (B-D). -RT, control de transcripción inversa negativo. Como control se utilizaron embriones inyectados con 100 pg de *preprolactina* (*ppl*). Cantidades de mRNAs utilizadas: 100 pg *Rspo2*, 50 pg o 250 pg de *BMP-4*, 50 pg de *activina*, 25 ó 100 pg *Wnt8*, 200 pg de β -catenina, 50 ó 100 pg de *Xnr1*, 2 ó 20 pg de *FGF8*.

20 Figura 13: Se requiere *Rspo2* de *Xenopus* para formación de músculo

25 Rspo2Mo inhibe específicamente la traducción de su DNA cognado. Arriba, diagrama del experimento. Se inyectaron embriones de *Xenopus* de la etapa de dos células con 100 pg de mRNA de *Rspo2* marcado con Myc en la región animal, en la etapa de 8 células, se inyectaron luego los mismos embriones con 5 ng de *Rspo2Mo* de CoMo en todos los blastómeros de los animales, se cosecharon en la etapa 11 y se procesaron respecto a análisis por transferencia Western de *Rspo2* marcado con Myc y α -tubulina.

30 (B) El empobrecimiento en la proteína *Rspo2* causa defectos musculares y regulación decreciente de los marcadores miogeneicos. Se inyectaron embriones en la etapa de 4 células en posición ecuatorial en un solo blastómero con 5 ng de oligonucleótidos morfolino de control (CoMo) o *Rspo2Mo* como se indica junto con 50 pg de mRNA de *ppl* o 50 pg de RNA *LacZ* como trazador de linaje y se analizaron en la etapa gastrular del primordio de la cola por hibridación *in situ* para los genes indicados. En (a-f) se utilizó hibridación doble *in situ* para el gen de interés (azul oscuro) y para *ppl* (rojo). (a-d) Embriones de la etapa 25. (a-b): miotomas, visualizados por expresión de actina muscular, muestran malformaciones en el lado inyectado con *Rspo2Mo* (d). (c-d) Sección transversal a nivel del tronco que muestra volumen muscular reducido en (d). (e-h): expresión de *myf5* y *myoD* (azul oscuro) está regulada en sentido decreciente en la región inyectada con *Rspo2Mo* (rojo en e,f o azul claro en g,h). (i-l): la expresión de *Xbra* y *Xnot2* (azul oscuro) no se ve afectada en la región de las inyecciones de *Rspo2Mo* (azul claro).

40 (C) *Rspo2Mo* actúa específicamente. Rescate de la reducción de *myf5* por mRNA de *Rspo2* coinyectado. Se inyectaron embriones en la etapa de 4 células en un solo blastómero con 5 ng de morfolino de control (CoMo), *Rspo2Mo*, 50 pg de mRNA de *ppl* de (sic) 50 pg de mRNA de *Rspo2* que contenía desapareamientos respecto a *Rspo2Mo*. La expresión de *myf5* se analizó por hibridación *in situ* en la etapa gastrular. Se indica el porcentaje de embriones con expresión fuertemente afectada (A), moderadamente reducida (B) y normal de *myf5* (C) como se exhibía en los embriones representativos. Se calculó la desviación estándar a partir de 3 experimentos independientes.

45 (D) *Rspo2Mo* bloquea la señalización Wnt aguas arriba de *dishevelled* durante la formación de músculo. Se inyectaron radialmente embriones en la etapa de 4 células con 5 ng de *Rspo2Mo* o CoMo, 50 pg de *pCS-XWnt8*, *pCS-dishevelled* (Xudsh), *GSK-3 β* pCS-dominante negativo (dnGSK) o *pCS- β -catenina*. En la etapa 10,5, se explantaron DMZs (a) o VMZs (b) o LMZs (c-d) y se cultivaron hasta la etapa 11 (a, c) o 25 (d, d) para análisis RT-PCR de los genes indicados. -RT: control de transcripción inversa negativo.

Figura 14: Se requieren R-espondinas para la señalización Wnt en células HeLa

55 (A) Análisis RT-PCR que muestra la expresión diferencial de *Rspo1-4* humanas en líneas de células HeLa y 293T. Se utilizó actina para normalización.

(B) Especificidad de siRNAs. Se cotransfectaron células 293T con pSuper-*Rspo2* ó-3 (siRNA), *Rspo3* marcada con FLAG y GFP (control de transfección). La expresión de *Rspo3* y GFP se analizó por transferencia Western.

60 (C-D) Se requieren R-espondinas para señalización Wnt/ β -catenina en células HeLa. Ensayo del informador luciferasa Wnt en células HeLa cotransfectadas con los constructos indicados. Se añadió *Wnt3a* como medio acondicionado. RLU, unidades relativas de luz.

Figura 15: La expresión de *futrina* está desregulada en diversos tumores humanos

65 La expresión de *Futrina 1, 2, 3 y -4* o ubiquitina (para mostrar carga igual) se analizó por hibridación radiactiva en mRNAs desplegados (Clontech, Cancer Profiling Array II) de muestras de tejido normal y canceroso de diferentes pacientes. Abreviaturas: N, tejidos normales; T, tejidos tumorales.

ES 2 345 256 T3

Figura 16: *Expresión de R-espondinas humanas en muestras tumorales*

5 Análisis por transferencia de mancha de *Rspo1*, 2 y 3 humanas en muestras normales y tumorales. Las mismas muestras de cDNA (Cancer Profiling Array II, Clontech) se hibridaron con *Rspo1*, 2, 3 y *humanas* y sondas de *ubiquitina*. (arriba) La Cancer Profiling Array contiene pares de cDNAs de muestras tumorales y de tejidos normales correspondientes de pacientes individuales y aplicadas paralelamente como se indica. Las abreviaturas de los órganos son: br, mama; ov, ovario; co, colon; st, estómago; lu, pulmones; riñón; bi, vejiga; vi, vulva; pr, próstata; tr, tráquea; liv, hígado; ut, útero; ce, cérvix; re, recto; th, glándula tiroides; te, testículos; sk, piel; sin, intestino delgado; pa, páncreas.

10 Figura 17: *Interacción de R-espondinas con componentes del camino de señalización Wnt/β-catenina*

(A-C) Ensayo del informador luciferasa Wnt en células 293T co-transfектadas con los constructos indicados. Los resultados se indican como número de veces de estimulación respecto al informador solo. Las dosis de DNA eran 5 ng *Wnt1*, 1 ng de *Fz8*, 3 ng de *LRP6*, 10 ng de *axina*, 10 ng de *dntf3*, 5 ng de *dkk1*, 10 ng de *Xdsh*, y 1 ng *Wnt3a*.

15 La presente descripción se refiere a una composición de diagnóstico que comprende:

20 (a) al menos una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica Fitrina 1, 2, 3 ó 4 como se representa en la Figura 3; y/o

25 (b) al menos una molécula de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que codifica Fitrina 1, 2, 3 ó 4 como se representa en la Figura 4 o 6a; y/o

30 (c) al menos una molécula de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida a una molécula de ácido nucleico de (a) y que codifica un polipéptido con la actividad biológica de Fitrina 1, 2, 3 ó 4; y/o

(d) al menos un fragmento de (a), (b) o (c) que tiene la actividad biológica de Fitrina 1, 2, 3 ó 4;

(e) al menos una molécula de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la secuencia de la molécula de ácido nucleico de (a), (c) o (d) debido a la degeneración del código genético, y/o

35 (f) al menos un ligando capaz de fijarse específicamente a la molécula de (a), (b), (c), (d) o (e).

35 Como se utiliza en esta memoria, el término “polipéptido” se refiere no sólo a polipéptidos codificados por las secuencias de nucleótidos/aminoácidos que se representan en Figura 3 y/o 4, sino también a polipéptidos que difieren en secuencia de aminoácidos debido a inserción, delección y/o sustitución de uno o más aminoácidos y que muestran al menos una actividad biológica de una Fitrina, v.g. la capacidad de promover la señalización Wnt. Preferiblemente, los ácidos nucleicos y/o polipéptidos afines son ácidos nucleicos y/o polipéptidos cuya secuencia muestra una identidad de al menos 40%, en particular una identidad de al menos 65%, preferiblemente de al menos 80%, de modo particularmente preferido de al menos 90% respecto a las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos codificados por las secuencias de nucleótidos que se muestran en Figura 3.

40 Las moléculas de ácido nucleico útiles como sondas pueden ser moléculas tanto de DNA como de RNA, siendo preferiblemente moléculas de DNA monocatenario. Las mismas pueden aislarse de fuentes naturales o pueden sintetizarse de acuerdo con métodos conocidos.

45 Como sonda de hibridación pueden utilizarse moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, que tienen una secuencia de nucleótidos que es exacta o básicamente complementaria a una secuencia de nucleótidos como la representada en las Figuras 3 y 4 o 6a, respectivamente, o partes de estas secuencias. Los fragmentos utilizados como sonda de hibridación pueden ser fragmentos sintéticos que se produjeron por medio de métodos de síntesis convencionales.

50 Como se utiliza en esta memoria, el término “hibridación” se refiere a hibridación en condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente en condiciones severas como se describe, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Sin embargo, en ciertos casos, puede detectarse también una molécula de ácido nucleico hibridante en condiciones de hibridación de menor severidad. Los cambios en la severidad de hibridación y la detección de señales se realizan fundamentalmente por la manipulación de la concentración de formamida (los porcentajes menores de formamida dan como resultado una severidad reducida), condiciones de sales, o temperatura. Por ejemplo, condiciones de severidad menor incluyen una incubación durante una noche a 37°C en una solución que comprende 6X SSPE (20X SSPE = NaCl 3M; NaH₂PO₄ 9,2M; EDTA 0,02M, pH 7,4), 0,5% SDS, 30% formamida, 100 µg/ml de DNA bloqueante de esperma de salmón, seguido por lavados a 50°C con 1X SSPE, 0,1% SDS. Adicionalmente, para alcanzar una severidad menor aún, los lavados efectuados después de severa pueden realizarse a concentraciones mayores de sal (v.g. 5x SSC). Las variaciones en las condiciones anteriores pueden realizarse por la inclusión y/o sustitución de reactivos de bloqueo alternativos utilizados para suprimir el ruido de fondo en los experimentos de hibridación. La inclusión de reactivos de bloqueo específicos puede requerir modificación de las condiciones de hibridación arriba descritas, debido a problemas con la compatibilidad.

ES 2 345 256 T3

El término “ligando” como se utiliza en esta memoria, hace referencia a cualquier molécula que sea capaz de fijarse específicamente a Fitrina 1, 2, 3 ó 4, permitiendo así determinar el nivel de moléculas receptoras. Ejemplos de tales moléculas incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas o moléculas pequeñas. La molécula puede ser el ligando natural de Fitrinas, o puede estar relacionada estrechamente con dicho ligando, v.g., un fragmento del ligando, 5 o un sustrato natural, un mimético estructural o funcional; véase, v.g. Colligan, *Current Protocols in Immunology* 1 (2) (1991); capítulo 5. En cualquier caso, la molécula puede aislarse o diseñarse razonablemente utilizando técnicas conocidas; véase también más adelante.

Preferiblemente, el ligando es un anticuerpo. El término “anticuerpo” se refiere preferiblemente a anticuerpos que 10 están constituidos esencialmente por anticuerpos monoclonales agrupados con especificidades de epítope diferentes, así como preparaciones de anticuerpos monoclonales distintas. Los anticuerpos monoclonales se producen a partir de un antígeno que contiene Fitrina 1, 2, 3 ó 4 o fragmentos del mismo por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, v.g., Köhler *et al.*, *Nature* 256 (1975), 495). Como se utiliza en esta memoria, el término “anticuerpo” (Ab) o “anticuerpo monoclonal” (Mab) debe entenderse que incluye moléculas intactas así como fragmentos de 15 anticuerpo (tales como, por ejemplo, fragmentos FAB y F(ab')2) que son capaces de fijarse específicamente a Fitrina 1, 2, 3 y/o 4. Los fragmentos FAB y F(ab')2 carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos fijación de tejido inespecífico que un anticuerpo intacto. (Wahl *et al.*, *J. Nucl. Med.* 24:316-325 (1983)). Así pues, se prefieren estos fragmentos, así como los productos de una biblioteca de expresión de FAB u otra inmunoglobulina. Además, los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos 20 químicos, monocatenarios, y humanizados.

Para ciertos propósitos, v.g. métodos de diagnóstico, la molécula de ácido nucleico utilizada como sonda o el ligando, v.g., anticuerpo, pueden marcarse de modo detectable, por ejemplo, con un radioisótopo, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un quelato metálico, o una enzima.

25 Los fragmentos de ácido nucleico pueden utilizarse, por ejemplo, como sondas o iniciadores en los ensayos de diagnóstico descritos más adelante y hacen posible, v.g., el análisis de la expresión de Fitrina 1, 2, 3, ó 4 por determinación del nivel de mRNA o la determinación de mutaciones en la región codificante o regiones reguladoras que conducen a moléculas de polipéptido con actividad alterada, v.g. destruida, o que conducen a expresión alterada. 30 Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico son oligonucleótidos que tienen una longitud de al menos 10, en particular de al menos 15 y de modo particularmente preferido de al menos 50 nucleótidos. Estas moléculas de ácido nucleico de la invención pueden utilizarse también, por ejemplo, como iniciadores para una reacción PCR.

La presente invención se define por las reivindicaciones.

35 La presente descripción se refiere también al uso de una molécula de ácido nucleico o ligando como se ha definido arriba, para la preparación de una composición de diagnóstico para la diagnosis de una enfermedad asociada con (a) expresión aberrante de Fitrina 1, 2, 3 ó 4 y/o (b) actividad aberrante de un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3, ó 4.

40 En una realización preferida, la diana a la que se hibrida la molécula de ácido nucleico es un mRNA.

La presente descripción proporciona también un método de diagnosis de una enfermedad asociada con (a) expresión aberrante de Fitrina 1, 2, 3, ó 4 y/o (b) actividades o cantidades aberrantes de un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3, ó 4 en un individuo, que comprende:

45 (a) determinar (a) la cantidad de expresión de Fitrina 1, 2, 3, ó 4 y/o (b) la cantidad de polipéptido de Fitrina 1, 2, 3, y/o 4 biológicamente activo en una muestra biológica; y

50 (b) diagnosticar una enfermedad asociada con (a) expresión aberrante de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 y/o (b) actividades o cantidades aberrantes de un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3, y/o 4 ó un riesgo para el desarrollo de dicha enfermedad basado en una cantidad de expresión alterada de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 y/o (b) actividades o cantidades alteradas de polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 biológicamente activo comparadas con un control.

55 Los formatos de ensayo adecuados son bien conocidos por las personas expertas en la técnica y, adicionalmente, se describen más adelante. Muestras de control positivas adecuadas que expresan proteínas Fitrina humanas son, v.g., las células HEK293.

60 El polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 ó 4 o el mRNA correspondiente v.g. en fluidos o tejidos biológicos, puede detectarse directamente *in situ*, v.g., por hibridación *in situ*, o puede aislarse de otros componentes celulares por métodos comunes conocidos por los expertos en la técnica antes de ponerse en contacto con una sonda. Los métodos de detección incluyen análisis por transferencia Northern, protección de RNAsas, métodos *in situ*, v.g. hibridación *in situ*, métodos de amplificación *in vitro* (PCR, LCR, QRNA-replicasa o transcripción/amplificación de RNA (TAS, 3SR), 65 transferencia inversa por puntos descrita en EP-B1 0237362), inmunoensayos, transferencia Western y otros ensayos de detección que son conocidos por los expertos en la técnica.

ES 2 345 256 T3

La sonda (v.g. un anticuerpo específico u oligonucleótido específico) de la composición de diagnóstico puede estar marcada detectablemente. En una realización preferida, dicha composición de diagnóstico contiene un anticuerpo anti-Futrina 1, 2, 3 y/o 4 y permite dicha diagnosis, v.g. por ELISA y contiene el anticuerpo fijado a un soporte sólido, por ejemplo, una cápsula de microtitulación de poliestireno o papel de nitrocelulosa, utilizando métodos conocidos en la técnica. Alternativamente, dichas composiciones de diagnóstico están basadas en un RIA y contienen dicho anticuerpo marcado con un isótopo radiactivo. Marcadores de ensayo de anticuerpos adecuados se conocen en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como, glucosa-oxidasa, y radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^{3}H), indio (^{112}In), y tecnecio, rodamina, y biotina. Además de ensayar los niveles de Futrina en una muestra biológica, el polipéptido puede detectarse también *in vivo* por formación de imagen. Identificadores o marcadores de anticuerpos para obtención de imágenes *in vivo* de proteínas incluyen los detectables por radiografía de rayos X, NMR O ESR. Para la radiografía de rayos X, marcadores adecuados incluyen radioisótopos tales como bario o cesio, que emiten radiación detectable pero no son abiertamente nocivos para el individuo. Marcadores adecuados para NRM y ESR incluyen aquéllos que tienen un espín característico detectable, tales como deuterio, que pueden incorporarse en el anticuerpo por marcación de nutrientes para el hibridoma relevante. Se introduce en el mamífero (por ejemplo, por vías parenteral, subcutánea o intraperitoneal) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico de proteína que ha sido marcado con un resto detectable de formación de imagen apropiado, tal como un radioisótopo (por ejemplo ^{131}I , ^{112}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), una sustancia radio-opaca, o un material detectable por resonancia magnética nuclear. Se comprenderá en la técnica que el tamaño del individuo y el sistema de obtención de imágenes utilizado determinarán la cantidad del resto de formación de imagen necesaria para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de un resto de radioisótopo, para un individuo humano, la cantidad de radiactividad inyectada estará comprendida normalmente entre aproximadamente 5 y 20 milicuries de $^{99\text{m}}\text{Tc}$. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo marcado se acumula luego preferentemente en la localización de las células que contienen el polipéptido de Futrina específico. La obtención de imágenes de tumores *in vivo* se describe, v.g., en S.W. Burchiel *et al.*, Burchiel *et al.*, "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments". (Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel y B.A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)).

En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a un método para identificar una pareja de fijación para un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 que comprende:

30 (a) poner en contacto dicho polipéptido con un compuesto a cribar; y
(b) determinar si el compuesto afecta a una actividad del polipéptido.

35 La descripción incluye también un método de identificación de compuestos que se fijan a un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 que comprende los pasos de:

(a) incubar un compuesto de fijación candidato con dicho polipéptido; y
40 (b) determinar si se ha producido fijación.

Los polipéptidos de Futrina 1, 2, 3 ó 4 pueden utilizarse para cribado de proteínas u otros compuestos que se fijan a Futrina 1, 2, 3 ó 4 o de proteínas u otros compuestos a los cuales se fija Futrina 1, 2, 3 y/o 4. La fijación de Futrina 1, 2, 3 ó 4 y la molécula puede activar (agonista), aumentar, inhibir (antagonista) o reducir la actividad de Futrina 1, 2, 3 ó 4 o de la molécula fijada. Ejemplos de tales moléculas incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas (v.g. ligandos), o moléculas pequeñas.

50 Preferiblemente, la molécula está estrechamente relacionada con el ligando natural de Futrina 1, 2, 3 ó 4, v.g., un fragmento del ligando, o un sustrato natural, un ligando, un mimético estructural o funcional; véase, v.g., Coligan, Current Protocols in Immunology 1(2) (1991); capítulo 5.

55 Preferiblemente, el cribado para estas moléculas implica producir células apropiadas que expresan Futrina 1, 2, 3 y/o 4 sea como una proteína secretada o en la membrana celular. Células preferidas incluyen células de mamíferos, levadura, *Drosophila*, o *E. coli*. Las células de expresan Futrina 1, 2, 3 y/o 4 (o membrana celular que contiene el polipéptido expresado) se ponen luego preferiblemente en contacto con un compuesto de test que contiene potencialmente la molécula para observar fijación, estimulación, o inhibición de la actividad de Futrina 1, 2, 3 y/o 4.

60 El ensayo puede testar simplemente la fijación de un compuesto candidato a Futrina 1, 2, 3 y/o 4, en donde la fijación es detectada por un marcador, o en un ensayo que implica competición con un competidor marcado. Adicionalmente, el ensayo puede testar si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por fijación a Futrina 1, 2, 3 y/o 4. Ensayos adecuados para analizar la actividad de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 incluyen ensayos de informadores de luciferasa inducibles Wnt en células HEK293 transfectadas, donde Futrina 1, 2, 3 y/o 4 actúa sinérgicamente con Wnt para aumentar una señal inducida Wnt, tal como se muestra en la Figura 4.

65 Alternativamente, el ensayo puede llevarse a cabo utilizando preparaciones exentas de células, polipéptido/molécula fijado a un soporte sólido, bibliotecas químicas, o mezclas de productos naturales. El ensayo puede comprender tam-

ES 2 345 256 T3

bién simplemente los pasos de mezclar un compuesto candidato con una solución que contiene Fitrina 1, 2, 3 y/o 4, medir la actividad o fijación Fitrina/molécula, y comparar la actividad o fijación Fitrina/molécula con un estándar.

Preferiblemente, un ensayo ELISA puede medir el nivel o actividad de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 en una muestra (v.g. muestra biológica) utilizando un anticuerpo monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede medir el nivel o actividad de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 por fijación, directa o indirecta, a Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 o por competición con Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 por un sustrato. La totalidad de estos ensayos anteriores pueden utilizarse como marcadores de diagnóstico o pronóstico. Las moléculas descubiertas utilizando estos ensayos pueden utilizarse para tratar enfermedades o para producir un resultado particular en un paciente (v.g. eliminación de un tumor, soporte de procesos regenerativos, etc.) por modulación, preferiblemente activación de la molécula de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4. Además, los ensayos pueden descubrir agentes que pueden inhibir o intensificar la producción de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 a partir de células o tejidos manipulados convenientemente.

Además, la descripción incluye un método de identificación de activadores/agonistas o inhibidores/antagonistas de un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 que comprende los pasos de:

- (a) incubar un compuesto candidato con dicho polipéptido;
- (b) ensayar una actividad biológica, y
- (c) determinar si se ha alterado una actividad biológica de dicho polipéptido.

Ensayos adecuados para analizar la actividad de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 incluyen ensayos de informadores de luciferasa inducibles Wnt en células HEK293 transfectadas, en donde Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 actúa sinérgicamente con Wnt para aumentar una señal inducida Wnt, tal como se muestra en la Figura 4.

En una realización adicional, la presente descripción se refiere a un método de identificación y obtención de un fármaco candidato para terapia de enfermedades asociadas con (a) expresión aberrante de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 y/o (b) actividades o cantidades aberrantes de un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 que comprende los pasos de:

- (a) poner en contacto un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 o una célula que expresa dicho polipéptido, y opcionalmente el o los ligandos correspondientes, en presencia de componentes capaces de proporcionar una señal detectable en respuesta a la fijación a dicho fármaco candidato a cribar; y
- (b) detectar la presencia o ausencia de una señal o el aumento de la señal generada, en donde la presencia o aumento de la señal es indicativa de un fármaco supuesto.

Ensayos adecuados para analizar la actividad de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 incluyen ensayos informadores luciferasa inducibles Wnt en células HEK283 transfectadas, donde Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 actúa sinérgicamente con Wnt para aumentar una señal inducida Wnt, tal como se muestra en la Figura 4.

El fármaco candidato puede ser un solo compuesto o una pluralidad de compuestos. El término “pluralidad de compuestos” en un método de la invención debe entenderse como una pluralidad de sustancias que pueden ser o no idénticas.

Dicho compuesto o pluralidad de compuestos puede(n) sintetizarse químicamente o producirse microbiológicamente y/o pueden estar comprendidos en, por ejemplo, muestras, v.g. extractos de células de, v.g., plantas, animales o microorganismos. Adicionalmente, dicho o dichos compuestos pueden ser conocidos en la técnica, pero no conocidos hasta ahora como capaces de reprimir o activar polipéptidos de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4. La mezcla de reacción puede ser un extracto exento de células o puede comprender un cultivo de célula o tejido. Montajes adecuados para el método de la invención son conocidos por las personas expertas en la técnica y se describen, por ejemplo, generalmente en Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, 3^a edición (1994) y en los ejemplos del apéndice. La pluralidad de compuestos puede añadirse, v.g., a la mezcla de reacción, al medio de cultivo, puede inyectarse en una célula o aplicarse de otro modo a un animal transgénico. La célula o tejido que puede emplearse en el método de la invención es preferiblemente una célula hospedadora, célula de mamífero o animal no humano transgénico.

Si una muestra que contiene un compuesto o una pluralidad de compuestos se identifica en el método de la invención, entonces es posible aislar el compuesto de la muestra original identificada por contener el compuesto capaz de reprimir o activar un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4, o puede subdividirse ulteriormente la muestra original, por ejemplo, si la misma está constituida por una pluralidad de compuestos diferentes, a fin de reducir el número de sustancias diferentes por muestra y repetir el método con las subdivisiones de la muestra original. Dependiendo de la complejidad de las muestras, los pasos arriba descritos pueden realizarse varias veces, preferiblemente hasta que la muestra identificada de acuerdo con el método de la invención comprende solamente un número limitado de o únicamente una sustancia o sustancias. Preferiblemente, dicha muestra comprende sustancias de propiedades químicas y/o físicas similares, y muy preferiblemente dichas sustancias son idénticas.

Se conocen varios métodos por las personas expertas en la técnica para producir y cribar grandes bibliotecas a fin de identificar compuestos que tengan afinidad específica para una diana. Estos métodos incluyen el método de presentación de fago en el cual péptidos aleatorizados se presentan en fago y se criban por cromatografía de afinidad a un receptor inmovilizado; véase, v.g., WO 91/17271, WO 92/01047, US-A-5223409. En otro método, se sintetizan bibliotecas combinatorias de polímeros inmovilizados en un chip utilizando fotolitografía; véase, v.g. US-A-5143854, WO 90/15070 y WO 92/10092. Los polímeros inmovilizados se ponen en contacto con un receptor marcado y se escanean respecto al marcador a fin de identificar polímeros que se fijen al receptor. La síntesis y el cribado de bibliotecas de péptidos sobre soportes continuos de membrana de celulosa que pueden utilizarse para identificar ligandos de fijación de los polipéptidos de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 y, por consiguiente, posibles inhibidores y activadores se describe, 5 por ejemplo, en Kramer, Methods Mol. Biol. 87 (1998), 25-39. Este método puede utilizarse también, por ejemplo, para determinar los sitios de fijación y los motivos de reconocimiento en el polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4. De modo análogo, la especificidad del sustrato de la chaperona DnaK se determinó y los sitios de contacto entre la interleuquina-6 humana y su receptor; véase Rudiger EMBO J. 16 (1997), 1501-1507 y Weiergraber, FEBS Letts. 379 10 (1996), 122-126, respectivamente. Además, los métodos arriba mencionados pueden utilizarse para la construcción de supertopos de fijación derivados del polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4. Un método similar se describió con éxito para 15 antígenos peptídicos del anticuerpo monoclonal anti-p24 (HIV-1); véase Kramer, Cell 91 (1997), 799-809. Una ruta general para análisis de la huella dactilar de las interacciones péptido-anticuerpo utilizando la biblioteca de aminoácidos peptídicos agrupados se describió en Kramer, Mol. Immunol. 32 (1995), 459-465. Adicionalmente, antagonistas de un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 puede derivarse e identificarse a partir de anticuerpos monoclonales que 20 reaccionan específicamente con un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 de acuerdo con los métodos que se describen en Doring, Mol. Immunol. 31 (1994), 1059-1067.

Todos estos métodos pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención a fin de identificar activadores/agonistas 25 e inhibidores/antagonistas de un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4.

Diversas fuentes de la estructura básica de un activador o inhibidor de esta clase pueden emplearse y comprenden, 25 por ejemplo, análogos miméticos de un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4. Los análogos miméticos de un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 o fragmentos biológicamente activos de los mismos pueden generarse mediante, por ejemplo, sustitución de los aminoácidos que se espera sean esenciales para la actividad biológica con, v.g., estereoisómeros, es decir D-aminoácidos; véase, v.g., Tsukida, J. Med. Chem. 40 (1997), 3534-3541. Adicionalmente, en el caso de que se utilicen fragmentos para el diseño de análogos biológicamente activos, pueden incorporarse componentes pro-miméticos en un péptido a fin de restablecer al menos algunas de las propiedades estructurales que pueden haberse perdido por la eliminación de parte del polipéptido original; véase, v.g., Nachman, Regul. Pept. 57 (1995), 359-370. Adicionalmente, puede utilizarse un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 para identificar miméticos peptídicos químicos sintéticos 30 que se fijan a o pueden funcionar como un ligando, sustrato o pareja de fijación de dicho o dichos polipéptidos tan eficazmente como lo hace el polipéptido natural; véase, v.g. Engleman, J. Clin. Invest. Q. 99 (1997), 2284-2292. Por ejemplo, pueden realizarse simulaciones de plegamiento y rediseño por computadora de motivos estructurales de un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 utilizando programas de computadora apropiados (Olszewski, Proteins 25 (1996), 286-299; Hoffman, Comput. Appl. Biosci. 11 (1995), 675-1679. La modelización por computadora del plegamiento 35 de las proteínas puede utilizarse para el análisis estructural y energético de modelos detallados de péptidos y proteínas (Monge, J. Mol. Biol. 247 (1995), 995-1012; Renouf, Adv. Exp. Med. Biol. 376 (1995), 37-45). En particular, los programas apropiados pueden utilizarse para la identificación de sitios interactivos de un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 y su ligando u otras proteínas interaccionantes por búsquedas con ayuda de computadora para secuencias de péptidos complementarias (Fassina, Immunomethods 5 (1994), 114-120. Sistemas adicionales de computadora apropiados para el diseño de proteínas y péptidos se describen en la técnica anterior, por ejemplo en Berry, Biochem. Soc. Trans. 22 (1994), 1033-1036; Wodak, Ann. N.Y. Acad. Sci. 501 (1987), 1-13; Pabo, Biochemistry 25 (1986), 5987-5991. Los resultados obtenidos a partir de los análisis por computadora arriba descritos pueden utilizarse para, v.g., la 40 preparación de miméticos peptídicos de un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 o fragmentos del mismo. Tales análogos pseudopeptídicos de la secuencia natural de aminoácidos de la proteína pueden mimetizar muy eficazmente la proteína parental (Benkirane, J. Biol. Chem. 271 (1996), 33218-33224). Por ejemplo, la incorporación de residuos de ω -aminoácidos quirales fácilmente disponibles en un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 ó 4 o un fragmento del mismo da como resultado la sustitución de enlaces amídicos por unidades polimetileno de una cadena alifática, proporcionando con ello una estrategia conveniente para la construcción de un mimético peptídico (Banerjee, Biopolymers 39 (1996), 769-777). Análogos péptido-miméticos superactivos de pequeñas hormonas peptídicas en otros sistemas se describen en la 45 técnica anterior (Zhang, Biochem. Biophys. Res. Commun. 224 (1996), 327-331). Miméticos peptídicos apropiados de un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 pueden identificarse también por la síntesis de bibliotecas combinatorias de miméticos peptídicos mediante alquilación sucesiva de amidas y testado de los compuestos resultantes, v.g., en cuanto a sus propiedades de fijación e inmunológicas. Métodos para la generación y el uso de bibliotecas peptidomiméticas combinatorias se describen en la técnica anterior, por ejemplo en Ostresh, Methods in Enzymology 267 (1996), 220-234 and Dorner, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 709-715. Adicionalmente, una estructura tridimensional y/o cristalográfica de un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4 puede utilizarse para el diseño de inhibidores miméticos y péptidos de la actividad biológica del polipéptido (Rose, Biochemistry 35 (1996), 12933-12944; Rutenber, Bioorg. Med. Chem. 4 50 (1996), 1545-1558).

65 Es también bien conocido por las personas expertas en la técnica, que es posible diseñar, sintetizar y evaluar miméticos de compuestos orgánicos pequeños que, por ejemplo, puedan actuar como sustrato o ligando para un polipéptido de Fitrina 1, 2, 3 y/o 4. Por ejemplo, se ha descrito que miméticos D-glucosídicos de hapalosina exhibían eficien-

cia similar a la hapalosina en la antagonización de proteínas de resistencia a multifármacos asociada a asistencia en citotoxicidad; véase Dinh, *J. Med. Chem.* 41 (1998), 981-987.

La molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 puede servir también como diana para activadores e inhibidores. Los activadores pueden comprender, por ejemplo, proteínas que se fijan al mRNA de un gen codificante de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4, estabilizando con ello la conformación nativa del mRNA y facilitando la transcripción y/o la traducción, v.g., de manera análoga a como actúa la proteína Tat sobre el RNA de HIV. Adicionalmente, se describen en la bibliografía métodos para identificación de moléculas de ácido nucleico tales como un fragmento de RNA que mimetiza la estructura de una molécula de RNA diana definida o indefinida a la cual se fija un compuesto en el interior de una célula dando como resultado el retardo del crecimiento celular o la muerte celular; véase, v.g., WO 98/18947 y las referencias citadas en dicho lugar. Estas moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse para identificación de compuestos desconocidos de interés farmacéutico, y para la identificación de dianas de RNA desconocidas para uso en el tratamiento de una enfermedad. Estos métodos y composiciones pueden utilizarse en cribado para nuevos compuestos o para identificación de compuestos útiles a fin de alterar los niveles de expresión de polipéptidos codificados por una molécula de ácido nucleico. Alternativamente, por ejemplo, la estructura de conformación del fragmento de RNA que mimetiza el sitio de fijación puede emplearse en el diseño racional de fármacos a fin de modificar fármacos conocidos para hacer que los mismos se fijen más ávidamente a la diana. Una metodología de este tipo es la resonancia magnética nuclear (NMR), que es útil para identificar estructuras de conformación de fármacos y RNA. Otros métodos adicionales son, por ejemplo, los métodos de diseño de fármacos que se describen en WO 95/35367, US-A-5322933, donde la estructura cristalina del fragmento de RNA puede deducirse y se utilizan programas de computadora para diseñar nuevos compuestos de fijación.

Los compuestos que pueden testarse e identificarse de acuerdo con un método de la descripción pueden ser bibliotecas de expresión, v.g. bibliotecas de expresión de cDNA, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, pequeños compuestos orgánicos, hormonas, peptidomiméticos, PNAs o análogos (Milner, *Nature Medicine* 1 (1995), 879-880; Hupp, *Cell* 83 (1995), 237-245; Gibbs, *Cell* 79 (1994), 193-199 y las referencias citadas en dicho lugar). Adicionalmente, genes que codifican un regulador supuesto de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 y/o que ejercen sus efectos aguas arriba o aguas abajo de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 pueden identificarse utilizando, por ejemplo, mutagénesis de inserción en la que se utilizan, por ejemplo, vectores de direcciónamiento de genes conocidos en la técnica. Dichos compuestos pueden ser también derivados funcionales o análogos de inhibidores o activadores conocidos. Tales compuestos útiles pueden ser por ejemplo factores de transacción que se fijan a un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 o secuencias reguladoras del gen que codifica el mismo. La identificación de factores de transacción puede realizarse utilizando métodos estándar en la técnica, (véase, v.g., Sambrook, *supra*). Para determinar si una proteína se fija a la poliproteína propiamente dicha o secuencias reguladoras, pueden llevarse a cabo análisis estándar de desplazamiento en gel nativo. Con objeto de identificar un factor de transacción que se fija a la proteína o secuencia reguladora, la proteína o secuencia reguladora puede utilizarse como reactivo de afinidad en métodos estándar de purificación de proteínas, o como una sonda para cribado de una biblioteca de expresión. La identificación de moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos que interaccionan con un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 arriba descrito puede realizarse también, por ejemplo, como se describe en Scofield (*Science* 274 (1996), 2063-2065) mediante el uso del denominado "sistema de dos híbridos" de levadura. En este sistema, el polipéptido de Futrina 1, 2, 3 ó 4 o una parte más pequeña del mismo se enlaza al dominio de fijación de DNA del factor de transcripción GAL4. Una cepa de levadura que expresa este polipéptido de fusión y que comprende un gen informador lacZ dirigido por un promotor apropiado, que es reconocido por el factor de transcripción GAL4, se transforma con una biblioteca de cDNAs que expresará proteínas de plantas o péptidos de las mismas fusionados a un dominio de activación. Así, si un péptido codificado por uno de los cDNAs es capaz de interaccionar con el péptido de fusión que comprende un péptido de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4, el complejo es capaz de dirigir la expresión del gen informador. De este modo, las moléculas de ácido nucleico que codifican Futrina 1, 2, 3 y 4, respectivamente, y el péptido codificado pueden utilizarse para identificar péptidos y proteínas que interaccionan con un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4.

Una vez que se ha identificado el factor de transacción, la modulación de su fijación a o la regulación de la expresión de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 puede proseguirse, comenzando, por ejemplo, con el cribado de inhibidores contra la fijación del factor de transacción a un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 ó 4. La activación o represión de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 podría realizarse luego en animales por aplicación del factor de transacción (o su inhibidor) o el gen que codifica el mismo, v.g. en un vector de expresión. Adicionalmente, si la forma activa del factor de transacción es un dímero, podrían construirse mutantes dominantes negativos del factor de transacción a fin de inhibir su actividad. Adicionalmente, después de la identificación del factor de transacción, pueden identificarse luego componentes adicionales en la cascada de señalización que conduce a la activación (v.g. transducción de señal) o represión de un gen implicado en el control de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4. La modulación de las actividades de estos componentes puede proseguirse luego, a fin de desarrollar fármacos adicionales y métodos para modulación del metabolismo de la degradación de las proteínas en los animales. Así pues, la presente invención se refiere también al uso de sistema de dos híbridos como se ha definido arriba para la identificación de activadores o inhibidores de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4.

Los compuestos aislados por los métodos arriba indicados sirven también como compuestos cabeza de serie para el desarrollo de compuestos análogos. Los análogos deberían tener una configuración electrónica estabilizada y conformación molecular que permita que grupos funcionales clave se presenten a un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 o su ligando sustancialmente del mismo modo que el compuesto cabeza de serie. En particular, los compuestos análogos tienen propiedades electrónicas espaciales que son comparables a la región de fijación, pero pueden ser moléculas más

pequeñas que el compuesto cabeza de serie, teniendo frecuentemente un peso molecular inferior a aproximadamente 2 kD y preferiblemente inferior a aproximadamente 1 kD. La identificación de compuestos análogos puede realizarse mediante el uso de técnicas tales como análisis de campo autoconsistente (SCF), análisis de interacción de configuración (CI), y análisis de dinámica en modo normal. Están disponibles programas de computadora para implementación

5 de estas técnicas; v.g., Rein, Computer-Assisted Modeling of Receptor-Ligand Interactions (Alan Liss, Nueva York, 1989). Métodos para la preparación de derivados químicos y análogos son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Beilstein, Handbook of Organic Chemistry, Springer edition, Nueva York Inc., 175 Fifth Avenue, Nueva York, N.Y. 10010 U.S.A. y Organic Synthesis, Wiley, Nueva York, USA. Adicionalmente, dichos derivados y análogos pueden testarse respecto a sus efectos de acuerdo con métodos conocidos en la técnica; véase también *supra*. Adicionalmente, pueden utilizarse peptidomiméticos y/o diseño ayudado por computadora de derivados apropiados y análogos, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

10 Una vez que el compuesto descrito ha sido identificado y obtenido, el mismo se proporciona preferiblemente en una forma terapéuticamente aceptable.

15 De acuerdo con ello, la presente descripción se refiere también a una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4, un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 propiamente dicho, vector recombinante (para ejemplos, véase más adelante), anticuerpo, activador/agonista, inhibidor/antagonista y/o pareja de fijación de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 y un excipiente, diluyente o

20 vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Preferiblemente, para propósitos terapéuticos, el polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 se produce recombinantemente por el uso de las secuencias de ácido nucleico que se muestran en las Figuras 1 y 2. Vectores adecuados para expresión recombinante son conocidos por las personas expertas en la técnica. Preferiblemente, los mismos son plásmidos, 30 cósidos, virus, bacteriófagos y otros vectores utilizados usualmente en el campo de la ingeniería genética. Vectores adecuados para uso en la presente invención incluyen, pero sin carácter limitante, el vector de expresión basado en T7 para expresión en células de mamífero y vectores derivados de baculovirus para expresión en células de insecto. Con preferencia, la molécula de ácido nucleico de la invención está enlazada operativamente a los segmentos reguladores en el vector recombinante de la invención que garantizan la transcripción y síntesis de un mRNA en células procariotas y/o eucariotas que puede traducirse. La secuencia de nucleótidos a transcribir puede estar enlazada operativamente a un promotor como un promotor T7, metalotioneína I o polihedrina. Las células hospedadoras utilizadas para expresión recombinante son células procariotas o eucariotas, por ejemplo células de mamífero, células bacterianas, células de insecto o células de levadura. El polipéptido se aísla de las células cultivadas y/o del medio de cultivo. El aislamiento y la purificación del polipéptido producido recombinantemente pueden llevarse a cabo por medios convencionales que 35 incluyen cromatografía preparativa y separaciones por afinidad e inmunológica utilizando, v.g., un anticuerpo anti-Futrina 1, 2, 3 ó 4, o, v.g., pueden purificarse sustancialmente por el método de un solo paso descrito en Smith y Johnson, Gene 67; 31-40 (1988).

40 Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados etc. son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Tales vehículos pueden formularse por métodos convencionales y se pueden administrar al individuo en una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse por diferentes vías, v.g. mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La ruta de administración, por supuesto, depende de la naturaleza de la enfermedad y de la clase de compuesto contenida

45 en la composición farmacéutica. El régimen de dosificación será determinado por el médico encargado del caso y otros factores clínicos. Como es bien conocido en las ciencias médicas, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, e incluyen el volumen del paciente, la superficie corporal, la edad, el sexo, el compuesto particular a administrar, el tiempo y la vía de administración, la clase y estadio de la enfermedad, v.g., tumores, salud general y otros fármacos que se administren simultáneamente.

50 50 El suministro de las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 puede realizarse por aplicación directa o, preferiblemente, por utilización de un vector de expresión recombinante tal como un virus químérico que contenga estos compuestos o un sistema de dispersión coloidal. La aplicación directa al sitio diana puede realizarse, v.g., por suministro balístico, como un sistema de dispersión coloidal o mediante catéter a un sitio en una arteria. Los sistemas de dispersión coloidal que pueden utilizarse para suministro de las moléculas de ácido nucleico anteriores incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, cuentas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua (mixtas), micelas, liposomas y lipoplexos. El sistema coloidal preferido es un liposoma. Pueden utilizarse liposomas específicos de órganos o específicos de células a fin de conseguir el suministro solamente al tejido deseado. El direccionamiento de los liposomas puede ser realizado por la persona experta en la técnica mediante aplicación de métodos de conocimiento común. Este direccionamiento incluye direccionamiento pasivo (utilizando la tendencia natural de los liposomas al distribuirse a las células del RES en órganos que contienen capilares sinusoidales) o direccionamiento activo (por ejemplo por acoplamiento del liposoma a un ligando específico, v.g., un anticuerpo, un receptor, azúcar, glicolípido, proteína, etc., por métodos bien conocidos). En la presente invención se utilizan preferiblemente anticuerpos monoclonales para dirigir los liposomas a tejidos específicos, v.g. un tejido tumoral, por la vía de ligandos específicos de la superficie celular.

55 Vectores recombinantes preferidos útiles para terapia génica son vectores virales, v.g. adenovirus, herpesvirus, vaccinia, o, más preferiblemente, un virus de RNA tal como un retrovirus. Aún más preferiblemente, el vector retroviral

es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Ejemplos de tales vectores retrovirales que pueden utilizarse en la presente invención son: el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Muy preferiblemente, se emplea un vector retroviral de primate no humano, tal como el virus de la leucemia del gibón (GaLV), que proporciona un intervalo de hospedadores más amplio comparado con los vectores murinos. Dado que los retrovirus recombinantes son defectuosos, se requiere asistencia a fin de producir partículas infecciosas. Dicha asistencia puede ser proporcionada, v.g., utilizando líneas de células adyuvantes que contienen plásmidos que codifican la totalidad de los genes estructurales del retrovirus bajo el control de secuencias reguladoras incluidas en la LTR. Líneas de células adyuvantes adecuadas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Dichos vectores pueden 5 contener adicionalmente un gen que codifica un marcador seleccionable de tal modo que las células transducidas puedan identificarse. Además, los vectores retrovirales pueden modificarse de tal modo que los mismos se vuelvan 10 específicos de la diana. Esto puede conseguirse, v.g., por inserción de un polinucleótido que codifique un azúcar, un glicolípido, o una proteína, preferiblemente un anticuerpo. Los expertos en la técnica conocen métodos adicionales 15 para generación de vectores específicos de dianas. Otros vectores adecuados y métodos para terapia *in vitro* o *in vivo* se describen en la bibliografía y son conocidos por las personas expertas en la técnica; véase, v.g., WO 94/29469 o WO 97/00957.

Con objeto de conseguir expresión únicamente en el órgano diana, v.g., un tumor a tratar, las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 pueden enlazarse a un promotor específico de tejido y 20 utilizarse para terapia génica. Tales promotores son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, v.g. Zimmermann *et al.*, (1994) *Neuron* 12, 11-24; Vidal *et al.*; (1990) *EMBO J.* 9, 883-840; Mayford *et al.*, (1995), *Cell* 81, 891-904; Pinkert *et al.*, (1987) *Genes & Dev.* 1, 268-76).

La presente descripción se refiere también al uso de los compuestos de la invención arriba indicados para la preparación 25 de una composición farmacéutica para tratamiento de una enfermedad asociada con (a) expresión aberrante de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 y/o genes implicados en la cascada de señalización Wnt, y/o (b) actividades o cantidades aberrantes de una Futrina 1, 2, 3 y/o 4 y/o un polipéptido implicado en la cascada de señalización Wnt. En una realización preferida, dicha enfermedad es una enfermedad renal, ósea o muscular o tumor, preferiblemente cáncer de mama, un carcinoma de colon o un melanoma.

Finalmente, la presente descripción se refiere al uso de una molécula nucleotídica que codifica un polipéptido que 30 tiene una actividad biológica de Futrina 1, 2, 3 y/o 4, un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4, un activador/agonista de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 o pareja de fijación de dicho o dichos polipéptidos para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la cascada de señalización Wnt que podría ser útil para soportar procesos regenerativos en un paciente, v.g., crecimiento de tejido como músculo, hueso, cabello, etc.

Ejemplo 1

40 *Materiales y Métodos*

(A) *Aislamiento de Futrinas (=R-espondinas) y Constructos*

Se utilizó una biblioteca de cDNA de ojos de *Xenopus* adulto en pCS2+ a fin de preparar agrupaciones de aproximadamente 250 colonias. Se transfeció transitoriamente DNA plasmídico de cada agrupación a células 293T junto con el receptor Wnt *frizzled8*, el informador Wnt TOPFLASH (Korinek *et al.*, *Science* 275 (1997), 1784-7) y pRL-TK (Promega) utilizando el reactivo de transfección FuGENE6 (Roche). El ensayo de luciferasa se realizó 24 horas después de la transfección. Se aisló un clon positivo de la agrupación por selección de consanguinidad. Se obtuvieron cDNAs humanos de *Rspo 2* y *3* del RZPD. Fragmentos de *hRspo1* y *4* se amplificaron por RT-PCR a partir del mRNA 45 de células 293T y se utilizaron como sondas de hibridación. Se aislaron *Rspo1* y *2* de ratón de longitud total a partir de una biblioteca de cDNA de embrión de ratón de 13,5 días. La secuencia de *X. tropicalis* *Rspo3* se obtuvo de la base de datos del Instituto Sanger y un fragmento de cDNA se clonó por RT-PCR a partir de embriones de *X. tropicalis*. Se crearon constructos C-terminales marcados con Myc o FLAG y todos los constructos de delección por PCR. Se clonó *Rspo2ΔC* de *Xenopus* por delección de los últimos 37 aminoácidos. Los cDNAs de *Rspo3* se clonaron en vectores 50 pCS2+ y Bluescript para uso en expresión génica y como sondas, respectivamente.

(B) *Cultivo de células, proteínas recombinantes y ensayos informadores de luciferasa*

Se mantuvieron líneas de células HEK293T, SHEP y HeLa en DMEM, 10% FCS y 10% CO₂. Se produjo medio 55 acondicionado *Rspo2ΔC* de *Xenopus* por transfección transitoria en células 293T. Se produjo medio acondicionado Wnt3a de ratón a partir de células L de ratón transfecadas establemente con Wnt3a (ATCC#CRL-2647) (Shibamoto *et al.*, *Genes Cells* 3 (1998), 659-670). Los ensayos con el informador luciferasa en células 293T se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos como se ha descrito (Wu *et al.*, *Curr. Biol.* 10 (2000), 1611-1614). Los ensayos con el informador luciferasa en células HeLa se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos por triplicado utilizando reactivo de transfección 60 Lipofectamine Plus (Invitrogen). Se transfecaron por pocillo un total de 400 ng de DNA, incluyendo 80 ng de *71ef-fos-Luc* (Novak *et al.*, *PNAS* 95 (1998), 4374-4379), 10 ng de *pRL-TK*, 10 ng de *frizzled8* de ratón, 2 ng de *lef1* de ratón y 300 ng de DNAs del plásmido pSuper. Tres días después de la transfección, se añadió medio acondicionado 65

ES 2 345 256 T3

Wnt3a de ratón o medio que contenía LiCl 30 mM para estimular la señalización Wnt. Veinticuatro horas más tarde, se determinó la actividad de luciferasa utilizando el sistema de luciferasa Dual (Promega).

(C) *Embriones, explantes, hibridación in situ y síntesis de RNA*

5 Se realizaron fertilización *in vitro*, cultivo de embriones, estadificación, microinyección y cultivo de explantes de embriones de *Xenopus* como ha sido descrito (Gawantka *et al.*, EMBO J. 14 (1995), 6268-79). Se llevó a cabo hibridación *in situ* con marcación doble y simple del montaje entero de acuerdo con Bradley *et al.*, Development 122 (1996), 2739-50). Se utilizó un fragmento PCR de cDNA de *Rspo3 tropicalis* para la hibridación *in situ* en embriones de *Xenopus laevis*. Para el seccionamiento con vibratomo, se pusieron los embriones en medio de incrustación (0,4% gelatina, 10 30% albúmina, 20% sacarosa en PBS) y se montaron en presencia de 2% de aldehído glutárico. El seccionamiento se llevó a cabo utilizando un vibratomo VT100E (Leica). Los cerebros de embriones de *Xenopus* de 4 días se cortaron en solución 1 x Barth y se fijaron para hibridación *in situ*. La elección *in situ* del montaje entero de los embriones de ratón se realizó de acuerdo con procedimientos descritos anteriormente (Koop *et al.*, Mech. Dev. 59 (1996), 73-78). 15 La preparación de mRNA para las inyecciones de *Xenopus* se llevó a cabo utilizando el kit de transcripción *in vitro* MegaScript (Ambion), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

(D) *Morfolino-oligonucleótidos antisentido y constructos de SiRNA*

20 La secuencia de nucleótidos 5' de un (pseudo)-alelo adicional para el gen *Rspo2* de *Xenopus* se obtuvo utilizando RACE 5' (kit GeneRacer, Invitrogen). Basándose en estas secuencias, se diseñó un morfolino-oligonucleótido antisentido que direccionaba ambos pseudoalelos alrededor del codón inicial ATG (*Rspo2Mo*): GCCGTCCAAATG CAGTTTCAAC. Se produjeron constructos PSuper que producían siRNA contra *Rspo2,3* humano o un control sin sentido de acuerdo con Brummelkamp *et al.*, Science 296 (2002), 550-3. Las secuencias son: *Rspo2* humano, TCC 25 CATTGCAAGGGTTGT; *Rspo3* humano, AGCTGACTGTGATAACCTGT; control sin sentido, ACTACCGTTGTTA TAGGTG.

(E) *Inmunohistoquímica, transferencia Western y análisis por transferencia de mancha*

30 La inmunohistoquímica para detectar β -catenina en células SHEP se llevó a cabo de acuerdo con (Scheiffele *et al.*, J. Cell. Biol. 140 (1998), 795-806) utilizando anticuerpos anti- β -catenina (Transduction Laboratories, Newington). Para detección de las proteínas *Rspo* marcadas o controles de carga en la transferencia Western, se utilizaron anticuerpos anti-Myc (Clon 9E10), anticuerpos monocionales anti-FLAG (M2, SIGMA), anti-GFP de pollo (Chemicon, Hampshire) y anti- α -tubulina de ratón (Sigma). La detección por quimioluminiscencia (solución SuperSignal®, Pierce) se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante después de incubación de las transferencias con IgG-HRP anti-ratón (Pierce). Para el análisis de la expresión de *Rspo* en muestras de tumores se utilizó el sistema Cancer Profiling Array II (Clontech, Palo Alto) y la hibridación se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

(F) *RT-PCR*

40 Los ensayos RT-PCR se llevaron a cabo como ha sido descrito (Dosch *et al.*, Development 124 (1997), 2325-34; Glinka *et al.*, Nature 389 (1997), 517-519); iniciadores adicionales fueron: *Xenopus Rspo2* (directo, GAATGCCA GAAGGATTG; inverso, GGGATGGTGTCTTTGCTGG); *Xenopus Rspo3* (directo, GAAGCAAATTGGAG TCTGTCG; inverso, GATTGTTCTAAACCTTCAGG); *Rspo1* humano (directo, ACAGACACAAGACACACA 45 CGC; inverso, TGTCTTCTGGTGGCCTCAG); *Rspo2* humano (directo, CCGAGCCCCAGATATGAAC; inverso, TGACCAACTTCACATCCTCC); *Rspo3* humano (directo, AGGGACTGAAACACGGGTC; inverso, TGTCTTCT GGTGGCCTCAG); *Rspo4* humano (directo, AAGCTGGGACACAGCACAG; inverso, GAAGCCTTGGAGCCTT GTC).

50 Ejemplo 2

*Aislamiento de un cDNA codificante de *Futrina1* de *Xenopus**

55 Se utilizó una biblioteca de cDNA de ojos adultos de *Xenopus* en el vector de expresión pCS2+ para preparar agrupaciones de aproximadamente 250 colonias, y el DNA plasmídico de cada agrupación se transfeció transitoriamente en células 293T junto con el receptor Wnt *frizzled8*, el informador Wnt TOP-FLASH (Korinek *et al.*, Science 275 (1997), 1784-1787) y luciferasa de Renilla para normalización, en placas de 96 pocillos utilizando FuGENE6 (Roche, Basilea). Después de 24 horas, se determinó la actividad relativa de luciferasa. Se identificó una agrupación 60 que producía una señal por encima del ruido de fondo (Figuras 1 y 2A) y se aisló un gen que albergaba esta actividad a partir de la agrupación por selección de consanguinidad. El análisis de la secuenciación demostró que el mismo representa *Futrina 1* de *Xenopus*. Las búsquedas en bases de datos revelaron 4 genes estrechamente afines en humanos, denominados hFutrina 1, 2, 3 y 4 (Figuras 3 y 4 ó 6a).

65 Se predice que la *Futrina 1* de *Xenopus* (*Rspo2*) codifica una proteína secretada con 243 aminoácidos (proteína madura) y un punto isoelectrónico de 9,8. Todas las R-espondinas contienen un péptido señal N-terminal (SP), dos dominios semejantes a futrina (FU), un dominio de tromboespondina tipo 1 (TSP1) y una región C-terminal de baja complejidad enriquecida con aminoácidos cargados positivamente (C) (Figura 2F). El dominio rico en cisteína semejante a furina se

encuentra, v.g., en endoproteasas semejantes a furina, el receptor EGF y el receptor de insulina. En la transducción de señales por ciertas tirosina-quinasas receptoras son necesarias repeticiones de furina para la agregación del receptor. Repeticiones de TSP1 se encuentran en tromboespondina y otras proteínas de la matriz extracelular como Mindina, F-espondina, SCO-espondina así como en cierto número de proteínas implicadas en la cascada del complemento. Proteínas que contienen repeticiones TSP1 están implicadas en la interacción célula-célula, inhibición de la angiogénesis y apoptosis (Adams y Tucker, Dev. Dyn. 218 (2000), 280-99).

Si bien el Rspo2 de *Xenopus* contiene un péptido señal N-terminal predicho, la proteína secretada es prácticamente indetectable en el medio de células 293T transfectadas transitoriamente. Dado que el término C está enriquecido con aminoácidos básicos, lo cual promueve la retención en la superficie celular, se testó una proteína truncada C-terminalmente. Rspo2ΔC se secreta eficazmente en el medio de las células 293T (Figura 2B) y es funcionalmente activo (Figura 2F). Dado que todas las R-espondinas comparten el término básico C y dado que no existen señales de retención evidentes en ER o Golgi, esto sugiere que las proteínas están asociadas normalmente con la superficie celular.

15

Ejemplo 3

Las Futrinas promueven la señalización Wnt

La Futrina 1 de *Xenopus* y las Futrinas humanas 1, 2, y 3 son capaces de estimular la expresión de informadores sensibles a Wnt en células HEK 293T cuando se proporcionan por transfección transitoria (Figuras 2C y 5A). Adicionalmente, las mismas son capaces de aumentar la expresión de informadores inducida Wnt (Wnt1/3A de ratón) sinérgicamente (Figuras 2D y 5B). Experimentos de cotransfección en células HEK 293T se llevaron a cabo con los genes indicados y en el informador Wnt TOP-FLASH (Korinek *et al.* Science 275 (1997) 1784-1787) y Renilla-luciferasa para normalización, en placas de 96 pocillos utilizando FuGENE 6 (Roche). Después de 24 horas, se determinó la actividad relativa de luciferasa.

Todos los miembros testados de la familia Rspo (v.g. *Rspo1-3* murino, *Rspo2, 3* humano) exhiben efectos equivalentes (Figura 6A y datos no presentados). La señalización de Rspo2 es sensible a los inhibidores del camino Wnt/β-catenina dominantes negativos TCF y *dickkopf1* (Figura 6B). Se observa un efecto de señalización sinérgico cuando Rspo2 se somete a cotransfección con componentes extracelulares, pero no con componentes intracelulares del camino Wnt/β-catenina (Figura 6C). La máxima cooperación se observa de manera reproducible entre Rspo2 y Wnts, sea utilizando medios acondicionados (Figura 2D) o después de co-transfección (Figura 6C).

35

Un sello de activación de la señalización Wnt/β-catenina es la acumulación citosólica de β-catenina debido a su estabilización. El tratamiento de células 293T con medio acondicionado Wnt3a induce β-catenina citosólica después de 1 hora y si bien el Rspo2ΔC recombinante no es capaz por sí solo de estabilizar la β-catenina durante este intervalo, el mismo aumenta fuertemente la actividad Wnt3a para hacerlo (Figura 2E, arriba). Después de 4 horas de tratamiento, ambos medios acondicionados Wnt3a y Rspo2ΔC son capaces de inducir acumulación de β-catenina a niveles similares (figura 2E, arriba). Es sabido que β-catenina entra en los núcleos en respuesta a la estimulación Wnt y activa la expresión génica junto con los factores de transcripción Lef/Tcf. El tratamiento de las células SHEP por medios acondicionados Wnt3a o Rspo2ΔC induce débilmente la localización nuclear de β-catenina, mientras que el co-tratamiento con Wnt3a y Rspo2ΔC aumenta fuertemente la acumulación de nucleasas (Figura 2E, abajo). Puede llegar a la conclusión de que las R-espondinas representan una nueva familia de proteínas secretadas capaces de promover la señalización Wnt/β-catenina.

Para estudiar funcionalmente sus dominios de señalización, se crearon delecciones seriadas de Rspo2 de *Xenopus* (Figura 2F). Como se ha expuesto, el término básico C puede eliminarse sin pérdida de actividad, y esto sucede también para el dominio TSP1 (Figura 2F). Sin embargo, los dominios semejantes a furina son necesarios para la señalización Wnt/β-catenina, dado que la delección de cualquiera de los dominios furina 1 ó 2 anula la actividad en los ensayos informadores (Figura 2F).

Ejemplo 4

Las futrinas son necesarias para la señalización Wnt completa

Para testar el requerimiento de Futrinas en la señalización Wnt, se utilizó la silenciación de genes mediada por siRNA (Brummelkamp *et al.*, Science, 2002, 296 (5567): 550-3). Se transfectaron células HeLa utilizando Lipofectamine Plus con 80 ng del informador Wnt 7LEF-Rev-fosLuc, 10 ng de pRL-TK (Promega) y 300 ng de constructos pSuper (Brummelkamp *et al.*) que producen, o bien siRNA contra Futrina 1 y 2 humana, o un control sin sentido. El constructo informador 7LEF-Rev-fosLuc que contenía 7 sitios de fijación LEF frente al promotor fos mínimo seguido por el ORF de luciferasa de luciérnaga fue proporcionado amablemente por R. Grosschedl (Howard Hughes Medical Institute). Los constructos pSuper contienen secuencias de 19 nucleótidos de Futrina 1 humana (secuencia: TCCCATTGCAAGGGTTGT), Futrina2 humana (secuencia: AGCTGACTGTGATACCTGT) o secuencia de control sin sentido (ACTACCGTTATAGGTG).

ES 2 345 256 T3

Un día después de la transfección se cambió el medio de 10% a 0,5% FCS. Tres días después de la transfección, se añadió medio acondicionado de ratón Wnt3a o medio de control de células 293 al cultivo para estimular la señalización Wnt. Veinticuatro horas más tarde, se determinó la actividad de luciferasa. Como se muestra en la Figura 7, las células HeLa exhiben niveles reducidos de Futrina 1 y 2, y la señalización Wnt disminuyó al 50%, lo que indicaba que las 5 Futrinas son necesarias para la señalización Wnt completa. Este efecto puede ser rescatado eficientemente por 5 ng de Futrina 1 recombinante de ratón, lo que confirma su especificidad. Los datos están normalizados para actividad de luciferasa de renilla.

10 Ejemplo 5

Expresión de genes de R-espondina en embriones de Xenopus y ratón

En los embriones de *Xenopus*, no se detecta RNA materno alguno de *Rspo2* por RT-PCR. Su expresión cigótica 15 comienza en la etapa precoz de la gástrula y se mantiene constante a lo largo de la neurulación y organogénesis (Figura 8A). Por hibridación *in situ* del montaje entero, se observa una expresión débil de *Rspo2* en todo el ectodermo de las gástrulas tempranas (no representado). Durante la gastrulación se detecta una expresión fuerte en la zona marginal tanto 20 en las capas profundas como en las superficiales, pero se excluye del organizador Spemann (Figura 8B). En la etapa final de la gástrula, la expresión de *Rspo2* persiste en el mesodermo de la placa lateral y se hace detectable en la placa neural anterior (Figura 8C). En la etapa 15, se observa la expresión en dos franjas longitudinales a lo largo de la 25 placa neural (futura placa de techo, en la placa neural anterior y en el mesodermo lateral y posterior (Figura 8D). La expresión de *Rspo2* en la etapa del primordio de la cola (Figura 8F) está restringida a varias regiones del cerebro, que incluyen el diencéfalo y la zona límite cerebro medio-cerebro posterior, el pronefros y el tubo neural dorsal. Se detecta también expresión en las porciones dorsal y más ventral de los somitos, la aleta dorsal y el proctodeum. La expresión de *Rspo2* en el cerebro de los renacuajos tardíos está restringida principalmente al diencéfalo, con inclusión de la zona intratalámica limitante (zli) (Figura 8H).

La expresión de *Rspo3* en *Xenopus* está relacionada con la de *Rspo2*. La misma se detecta primeramente en la 30 etapa gastrular (no representada) y en las néurulas se expresa en el borde anterior de la placa neural y el mesodermo posterior (Figura 8E). En la etapa del primordio de la cola, se coexpresa con *Rspo2* en el sistema nervioso central pero exhibe una expresión adicional en los arcos branquiales y el primordio de la cola (Figura 8G).

En el ratón, los transcritos de *Rspo3* se detectan por hibridación *in situ* el día 7,5 en la línea primitiva (Figura 35 8J) mientras que la expresión de *Rspo1* y 2 no es detectable. El día 9,5, *Rspo1-3* exhiben expresión diferencial en diversos derivados neurales y mesodérmicos (Figura 8K-M), principalmente a lo largo del tubo neural dorsal (*Rspo1* y 3), el diencéfalo (*Rspo1*, 2, 3), los somitos (*Rspo3*) y el mesodermo del primordio de la cola (*Rspo3*). En los primordios de los miembros, los 3 genes exhiben expresión diferencial prominente (Figura 8I), en particular en la región morfogenéticamente activa tal como el reborde apical ectodérmico (AER) (*Rspo2*).

40 Ejemplo 6

Las R-espondinas se co-expresan con y son reguladas Wnts

45 Las *R-espondinas* no sólo exhiben interacción funcional con la señalización Wnt, si no también co-expresión con los genes *Wnt* en muchas regiones durante el desarrollo embrionario de *Xenopus* y de ratón. En el mesodermo gastrular, tanto de *Xenopus* como de ratón, *Rspo2* y 3 se co-expresan con *XWnt8* y *mWnt3*, respectivamente. Análogamente, en etapas posteriores, los miembros de la familia *R-espondina* se co-expresan ampliamente con cierto número de genes de *Wnt*, v.g. en el límite cerebro medio-cerebro posterior, el tubo neural dorsal, el primordio de los miembros y el 50 primordio de la cola. Una comparación directa entre los patrones de expresión de *Rspo2* de *Xenopus* y *Wnt8* y *Wnt3a* exhibe un gran solapamiento (Figura 9A).

De hecho, los *Wnts* son capaces de inducir la expresión de *Rspo* dado que embriones de *Xenopus* inyectados con 55 DNA de pCS-*Wnt8* o pCS- β -catenina regulan en sentido creciente tanto *Rspo2* como *Rspo3* por RT-PCR (Figura 9B). Análogamente, los embriones inyectados con DNA de pCS-*Wnt8* o pCS-*Wnt3a* exhiben expresión ectópica de *Rspo2* por hibridación *in situ* (Figura 8C-E). Los resultados indican que la co-expresión observada es debida a la regulación de las *R-espondinas* por los *Wnts*. Esto es consistente con la observación de que la expresión de *Rspo1* es reducida en el cordón medular dorsal de los embriones de ratón silenciados *Wnt1* o *Wnt3a*.

60 Ejemplo 7

Futrina 1 (R-espondina 2) activa los marcadores neurales y regula (promueve) la formación de músculo

65 El análisis de la pérdida de función en embriones de *Xenopus* demuestra que se requiere Futrina 1 para la formación de músculo. Inyecciones de oligomorfolino antisentido contra Futrina 1 (Fut1-Mo) causan regulación decreciente de los marcadores tempranos de músculo myoD y myf5 e inducen defectos musculares (Figura 10A). La especificidad de este efecto fue documentada en primer lugar por la capacidad de Fut1-Mo para inhibir la traducción del constructo

ES 2 345 256 T3

cognado de DNA cuando se sobreexpresaba en embriones (Figura 10B) y, en segundo lugar, por la capacidad del mRNA de XFut1 para rescatar el efecto de Fut1-Mo (Figura 10C).

Cuando el camino Wnt/β-catenina se sobreactiva en embriones de *Xenopus*, se observan una diversidad de respuestas: i) la inyección de mRNA de activadores del camino induce típicamente los ejes embrionarios secundarios en los embriones enteros y los marcadores neurales anteriores en las capas animales y los embriones enteros; ii) la inyección de DNA de activadores del camino que impulsan la expresión después de MBT, posterioriza el sistema nervioso central (CNS). Para testar si *Rspo2* es capaz de mimetizar cualquiera de estos efectos, se microinyectó mRNA sintético en embriones de *Xenopus*. No obstante, la inyección de mRNA de *Rspo2* no induce los ejes secundarios en los embriones enteros y la inyección de DNA de *pCS-Rspo2* no posterioriza el CNS, dado que las cabezas son de tamaño normal, la expresión de *Otx2* se expande y *en2* no se ve afectado (Figura 11D, H).

En las capas animales, *Rspo2* induce los marcadores pan-neurales *NCAM* y *N-tubulina* y el marcador neural anterior, *Otx2*, como lo hacen *XWnt8* y *β-catenina* (Figura 11A). Análogamente, en los embriones enteros inyectados con mRNA de *Rspo2*, se observan glándulas de cemento ectópicas y expansión lateral de la placa neural en el lado inyectado, como se muestra por la expresión de los marcadores neurales *Sox3*, *Otx2*, *not2*, *en2* y *Rx1* (Figuras 11 B-H). La expresión ectópica de *Otx2* se observa ya en los embriones de la etapa gastrular (Figura 11 I+J). Estos resultados son consistentes con la capacidad de la señalización Wnt/β-catenina para bloquear la expresión de BMP4 y activar con ello el desarrollo neural.

Para analizar ulteriormente el efecto de la sobreexpresión de mRNA de *Rspo2* un (sic) señalización por BMP4, Activina, Nodal y FGF, se llevaron a cabo ensayos de capas animales y se testaron respecto a la inducción de genes diana por señales de 3 factores de crecimiento (Figura 12). *Rspo2* bloquea como era de esperar la expresión de *Xvent2* mediada por BMP4, pero inhibe también sorprendentemente la inducción de *Xbra* mediada por Activina y Nodal (Figura 12A-C). Esto es contrario a las inyecciones de mRNA de *XWnt8* y *β-catenina*, que no afectan a la inducción de *Xbra* por Activina (Figura 12B). En contraste con la señalización por 3 patrones de crecimiento del tipo TGF-β, la expresión de *Xbra* inducida por TGF8 no se ve afectada por el *Rspo2* sobreexpresado (Figura 12D). Puede llegar a la conclusión de que la sobreexpresión de *Rspo2* además de activar el camino Wnt/β-catenina es capaz también de interferir con la señalización por 3 factores de crecimiento de la familia TGF-β.

Otro efecto bien conocido de la señalización cigótica Wnt/β-catenina es su capacidad para promover la miogénesis. Por ejemplo, *XWnt8* puede inducir la formación de músculo en las células mesodérmicas ventrales. Cuando las zonas ventrales marginales (VMZs) de embriones inyectados con *Rspo2* se disecan y se cultivan hasta la etapa 40, se alargan, forman estructuras semejantes a colas, y son contráctiles. Este fenotipo es indistinguible de los explantes de zona marginal lateral (LMZs) de control, que diferencian típicamente el músculo (Fig. 4 K-L). La hibridación *in situ* confirmó la inducción de actina muscular en VMZs inyectadas tanto con *Wnt8* como con *Rspo2*, pero no en las VMZs de control (inyectadas con preprolactina) (Figura 11M). Dado que las *R-espondinas* son capaces de aumentar la señalización Wnt en las células 293T, se testó su cooperación en la miogénesis de *Xenopus*. *myf5* es un marcador miogénico expresado característicamente en el mesodermo lateral. No obstante, el mismo está excluido del mesodermo dorsal, y los explantes de zona dorsal marginal (DMZ) expresan solamente una pequeña cantidad de *myf5* como se determina por RT-PCR (Figura 11N). En los DMZs de embriones inyectados con constructos de DNA que dirigen la expresión posterior de MBT, *myf5* es débilmente inducido por *Rspo2*, moderadamente *Wnt8* y fuertemente por su combinación (Figura 11N, arriba). El efecto promotor de miogénesis de *Rspo2* es reprimido por los dominantes negativos *dishevelled* (*Xdd1*), *dkk1* y *GSK-3β*, que bloquean todos ellos la señalización Wnt (Figura 11N, abajo). En suma, los resultados sugieren que *Rspo2* puede promover la miogénesis por la vía del camino Wnt/β-catenina.

Ejemplo 8

Se requiere *R-espondina2* para la miogénesis mediada Wnt/β-catenina

Para investigar el papel fisiológico de *Rspo2* durante la embriogénesis de *Xenopus*, se inyectaron morfolino-oligo-nucleótidos antisentido (*Rspo2Mo*). La capacidad de *Rspo2Mo* para bloquear la producción de la proteína *Rspo2* se demuestra por transferencia Western (Figura 13A). La inyección de este morfolino en un blastómero dorso-animal en la etapa de 8 células da como resultado defectos en los ojos, aunque la expresión de marcadores precoces de ojo (*Rx1*, *Pax6*), neurales anteriores (*Otx2*) y pan-neurales (*Sox3*) no se ve afectada obviamente (no representado).

La inyección ecuatorial de *Rspo2Mo* en un blastómero en la etapa de 8 células conduce a defectos musculares en el lado inyectado (Figura 13B). La hibridación *in situ* para actina muscular y las secciones transversales de tronco demuestran que la inyección de *Rspo2Mo* causa somitos desorganizados (paneles a-b) y miotomas reducidos (paneles c-d). Los experimentos de seguimiento del linaje demostraron que las células inyectadas con *Rspo2Mo* contribuyen al mesodermo de la placa lateral en lugar de somitos o sufren muerte celular (datos no presentados). En la etapa gastrular, la expresión de los marcadores miogénicos *myf5* y *myoD* se ve fuertemente regulada en sentido decreciente en el lado inyectado con *Rspo2Mo* (paneles e-h), mientras que el marcador pan-mesodérmico *Xhra* y el marcador organizador *Xnot2* no se ven afectados (paneles i-j).

Para testar la especificidad de *Rspo2Mo*, se realizaron experimentos de rescate por co-inyección de *Rspo2Mo* junto con un RNA de *Rspo2*, en el cual 6 nucleótidos no codificantes estaban mutados de tal modo que el mismo no podría

ser direccionado por este morfolino. La expresión de *myf5* (Figura 13C) y *myoD* (datos no presentados) es rescatada eficazmente por este RNA mutante de *Rspo2*, lo que indica que el efecto de *Rspo2Mo* en la miogénesis es específico.

Se utilizó *Rspo2Mo* como herramienta para examinar la posición epistática de *Rspo* en el camino Wnt/β-catenina.

5 Como indicador de la señalización para Wnt/β-catenina, se utilizó la expresión de *myf5* y *actina muscular* en explantes de la zona marginal (Figura 13D). En los explantes DMZ y VMZ, el DNA *Wnt8* induce *myf5* y *actina muscular*, y esta inducción es bloqueada significativamente por *Rspo2Mo* (Figura 13D, paneles a-b, pistas 3-4). Sin embargo, la inducción de *myf5* y *actina muscular* por los activadores intracelulares del camino Wnt como *dishevelled*, dnGSK-3β y β-catenina no se ve afectada por *Rspo2Mo* (a-b, pistas 5-10). En los explantes LMZ, la inyección de *Rspo2Mo* regula 10 decrecientemente la expresión endógena de *myf5* y *actina muscular* (Figura 13B, paneles c-d, pistas 1-2). En las co-inyecciones de DNA, este efecto es rescatado eficazmente por β-catenina, pero sólo débilmente por *XWnt8* (pistas 3-6). El efecto residual de *XWnt8* es debido probablemente a su acción no autónoma de las células “an” (sic) las células que no recibieron *Rspo2Mo*. Considerados en su conjunto, estos resultados indican que *Rspo2* afecta al camino Wnt/β-catenina al nivel o aguas arriba de *dishevelled*.

15

Ejemplo 9

Las R-espondinas son necesarias para la señalización Wnt/β-catenina en células HeLa

20

A continuación, se testó el requerimiento de *Rspo2* para la señalización Wnt en células de mamífero utilizando siRNA. Dado que existen 4 *R-espondinas* con función aparentemente redundante, se seleccionaron células HeLa, que expresan únicamente *Rspo3* y muy débilmente *Rspo2* (Figura 14A). Diversas otras líneas de células, tales como células 293T, expresan los cuatro genes, complicando un enfoque de siRNA.

25

La silenciación de genes mediada por siRNA se llevó a cabo por transfección de constructos pSUPER (Brummelkamp *et al.*, Science 296 (2002), 3286-3305) para producir siRNAs dirigidos contra *Rspo2* y -3 (siRNA *Rspo2,3*). Como control, se utilizó un siRNA sin sentido. Para testar la eficiencia del siRNA, se co-transfectó con siRNAs *Rspo3* humano marcado con FLAG, y su producción era reprimida por *Rspo3* de siRNA, pero no por el *Rspo2* de siRNA (Figura 14B).

30

En los ensayos del informador Wnt, tanto *Rspo2* como *Rspo3* de siRNA disminuían la actividad de luciferasa inducida por *Wnt3a* comparados con el siRNA de control (Figura 14C). Cuando se co-transfectan *Rspo2* y *Rspo3* de siRNA, la actividad del informador disminuye al 40%. Este efecto es específico, dado que la señalización Wnt 35 reducida puede ser rescatada por el *Rspo2* co-transfectedo de ratón, que no es direccionado por siRNAs contra las *R-espondinas* humanas (Figura 14C). Adicionalmente, al contrario que la actividad informadora inducida por *Wnt3a*, *Rspo2 + 3* de siRNA no afectan a la señalización Wnt/β-catenina inducida por *Li⁺* (Figura 14D). Dado que *Li⁺* actúa por inhibición de la actividad de GSK3β, esto es de nuevo consistente con la acción de *Rspo2* al nivel o aguas arriba de *dishevelled*, llegándose a la conclusión de que en las células HeLa son necesarias las *R-espondinas* para la señalización 40 total Wnt/β-catenina.

Ejemplo 10

La expresión de futrina está desregulada en los tumores humanos

La regulación incorrecta de la señalización Wnt/β-catenina está implicada en la tumorigénesis, v.g., cáncer de colon, cáncer de mama y melanoma (Barker *et al.*, 2000; Bienz y Clevers, 2000; Polakis, 2000). Dado que las *R-espondinas* (*futrinas*) promueven la señalización Wnt/β-catenina, las mismas pueden jugar también un papel en la tumorigénesis. Así, la expresión de Futrina 1-4 en diversos tejidos humanos normales y cancerosos se estudió utilizando hibridación radiactiva en el sistema Clontech Cancer Profiling Array II. Se utilizó para normalización la hibridación con la sonda ubiquitina. Los resultados indican que la expresión de las Futrinas 1-3 está desregulada radicalmente en los tejidos cancerosos humanos (Figura 15). En la mayoría de los tumores, la expresión de Futrinas 1-3 está desregulada radicalmente (tumores de colon, estómago, pulmón, recto para Futrina 1, tumores de mama, ovario, vejiga, útero, 50 cérvix y recto para Futrina 2, tumores de útero y cérvix para Futrina 3). En un pequeño número de casos, la expresión de Futrina 1-3 está regulada en sentido creciente (un caso de tumor de estómago para Futrina 1-2, y tumor de ovario para Futrina 3). La Futrina 4 exhibe un nivel de expresión muy bajo en la mayoría de los tejidos estudiados, excepto en el ovario. Resultados adicionales se muestran en la Figura 16, indicando también que *HRspo1* está expresado débilmente en los órganos adultos. El mismo exhibe regulación creciente en los tumores de ovario de dos pacientes y en 55 una sola muestra de tumor de estómago. *HRspo2* se expresa en órganos de origen endodérmico, con inclusión de colon, recto, intestino delgado y pulmón. Su expresión disminuye en las muestras de tumor correspondientes. *HRspo3* se expresa ampliamente y disminuye en muchas muestras de tumor. En general, la expresión de *hRspo3* está desregulada en numerosos tumores, mientras que la expresión de *hRspo4* es muy débil tanto en los órganos adultos como en los tumores humanos (datos no presentados).

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de una molécula nucleotídica que codifica un polipéptido de Fitrina 1 para la preparación de una composición farmacéutica para activación de la cascada de señalización Wnt.

10 2. Uso de un ligando que se fija específicamente a una molécula de polipéptido o ácido nucleico de Fitrina 1 que codifica un polipéptido de Fitrina 1 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibición de la cascada de señalización Wnt, en donde el ligando es un anticuerpo.

15 3. Uso de un ligando que se fija específicamente a una molécula de polipéptido o ácido nucleico de Fitrina 1 que codifica un polipéptido de Fitrina 1 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la cascada de señalización Wnt, en donde el ligando es una molécula de nucleótido que se hibrida a un ácido nucleico de Fitrina 1.

20 4. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 para soportar procesos regenerativos.

5 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 para promover el crecimiento de músculo.

15 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3, para modular la formación de hueso.

25

30

35

40

45

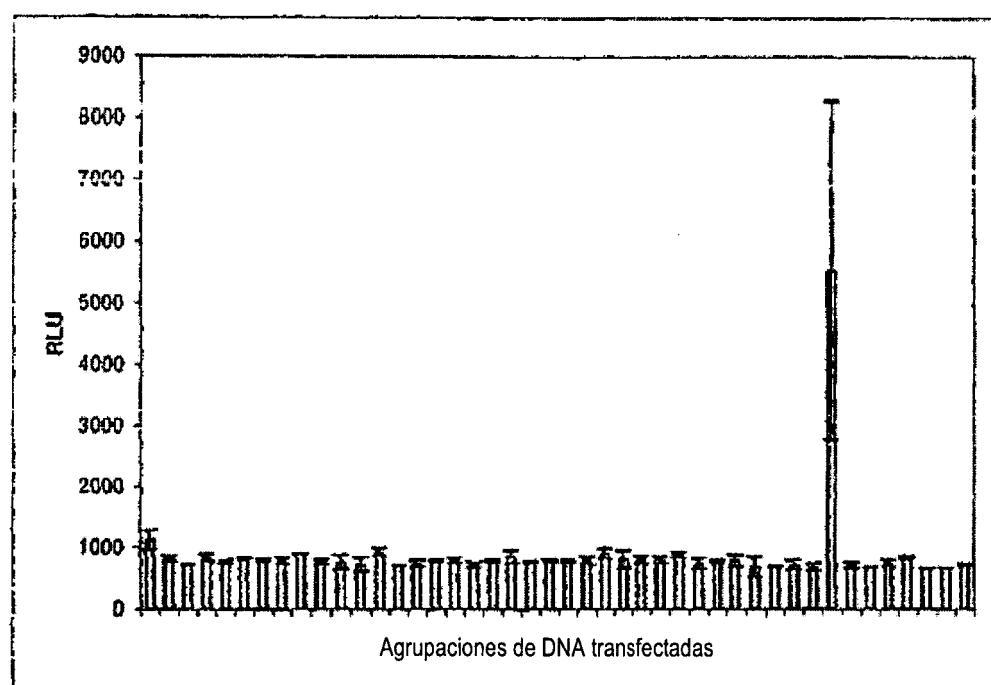
50

55

60

65

ES 2 345 256 T3



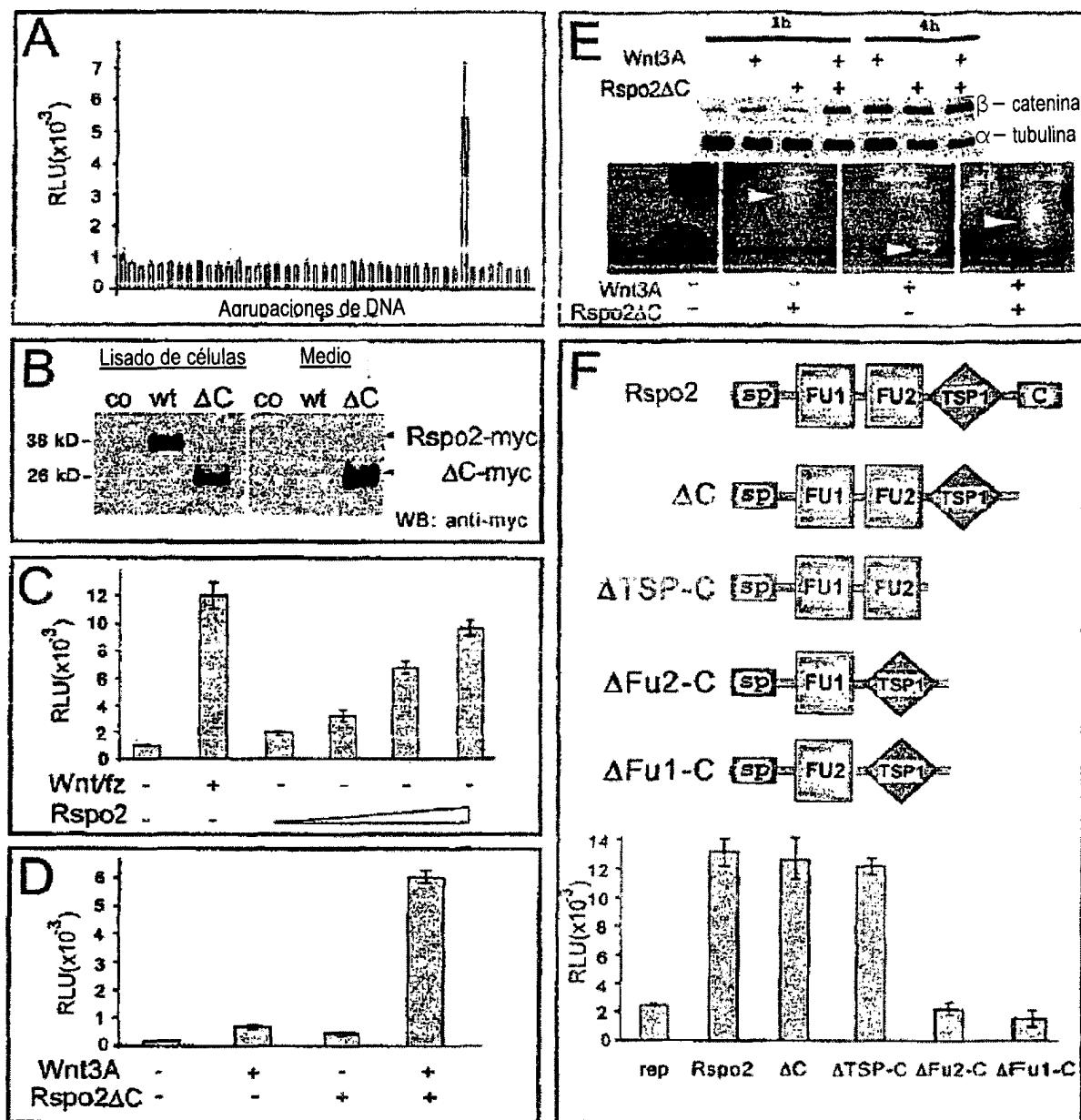


Figura 2

ES 2 345 256 T3

Figura 3

ES 2 345 256 T3

Figura 4

ES 2 345 256 T3

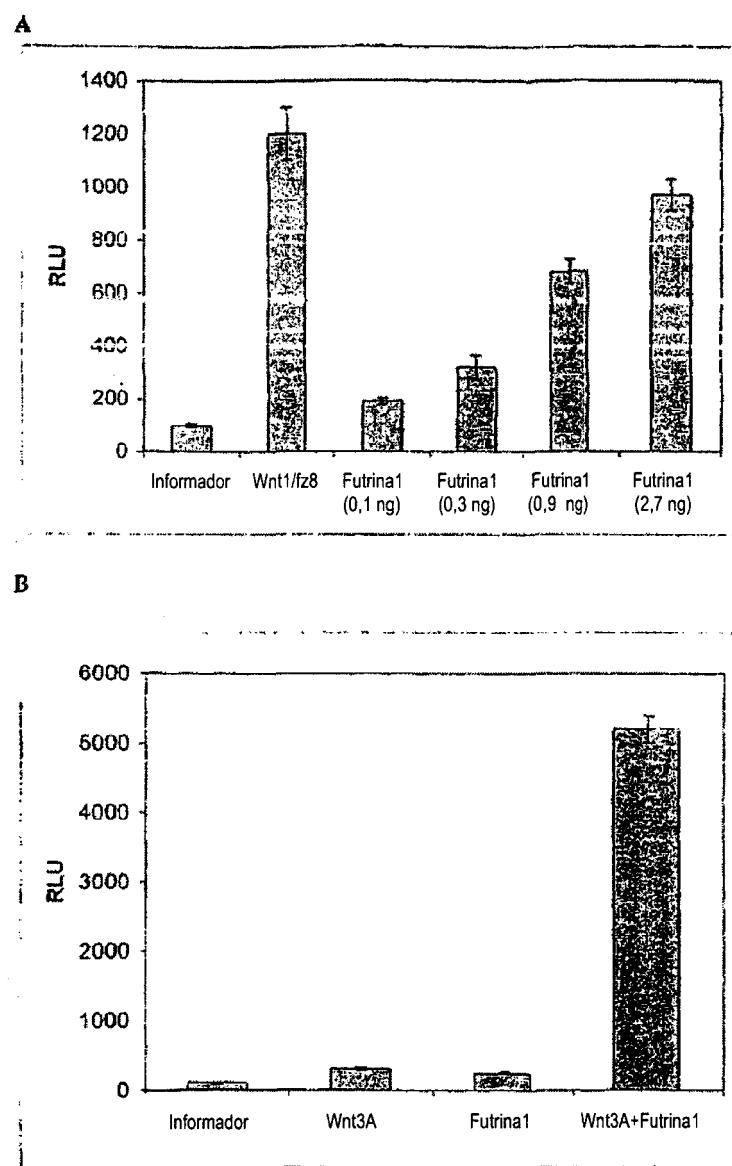


Figura 5

ES 2 345 256 T3

dominio 1 semejante a furina

A

hR-espondina1 1 **MATGLCVVVAIVLSWTHLTISBR . GINCKKHORPISASGSCHCAKCCCLCSEVNGCLKQSPK**
 hR-espondina2 1 **EOVNTFSFADLILNCGDVSRCQ . GNRDORRSKRASIVVSXPKICNG . CLSCKDNGCSPCQOK**
 hR-espondina3 1 **MELRTISWLFIHLNPXPTGSGNASRGRGRGRPMYPNVSGCQCGECATCSDYNGCLSKCPR**
 hR-espondina4 3 **MEAPFLCLLHYAMAIVDMLALNR EKKQVGTGCGNMTS . GIIICSENGCSTGQOK**

péptido señal

hR-espondina1 1 **LYPFLKREGMPCYGECLHSCPSDWNPWHPDQINRQARCNIECNGCPSRDWPKTKCIVGEX**
 hR-espondina2 1 **LYPFLKREGMPCYGECLHSCPSDWNPWHPDQINRQARCNIECNGCPSRDWPKTKCIVGEX**
 hR-espondina3 1 **LYPFLKREGMPCYGECLHSCPSDWNPWHPDQINRQARCNIECNGCPSRDWPKTKCIVGEX**
 hR-espondina4 1 **LYPFLKREGMPCYGECLHSCPSDWNPWHPDQINRQARCNIECNGCPSRDWPKTKCIVGEX**

dominio 1 semejante a furina

hR-espondina1 15 **LHIGRCYPADEGGSQDAGCTMEECQSPAQ EYQGQWVWQHCPKQOLCCFRAGSPPTTRV**
 hR-espondina2 19 **LHIGRCYPADEGGSQDAGCTMEECQSPAQ EYQGQWVWQHCPKQOLCCFRAGSPPTTRV**
 hR-espondina3 20 **LHIGRCYPADEGGSQDAGCTMEECQSPAQ EYQGQWVWQHCPKQOLCCFRAGSPPTTRV**
 hR-espondina4 13 **LHIGRCYPADEGGSQDAGCTMEECQSPAQ EYQGQWVWQHCPKQOLCCFRAGSPPTTRV**

dominio 2 semejante a furina

hR-espondina1 15 **LHIGRCYPADEGGSQDAGCTMEECQSPAQ EYQGQWVWQHCPKQOLCCFRAGSPPTTRV**
 hR-espondina2 19 **LHIGRCYPADEGGSQDAGCTMEECQSPAQ EYQGQWVWQHCPKQOLCCFRAGSPPTTRV**
 hR-espondina3 20 **LHIGRCYPADEGGSQDAGCTMEECQSPAQ EYQGQWVWQHCPKQOLCCFRAGSPPTTRV**
 hR-espondina4 13 **LHIGRCYPADEGGSQDAGCTMEECQSPAQ EYQGQWVWQHCPKQOLCCFRAGSPPTTRV**

dominio 1 de tipo tromboespondina

hR-espondina1 0 **QPRFVGGDEHACSDPDKPQKQHCPKQDQKIK EKQGQWVWQHCPKQOLCCFRAGSPPTTRV**
 hR-espondina2 0 **VKKDVYKPTKPFHCTLAEKSRKQHCPKQDQKIK EKQGQWVWQHCPKQOLCCFRAGSPPTTRV**
 hR-espondina3 3 **IQHPSAKGNLCPDNGEPEKCTTQHCPKQDQKIK EKQGQWVWQHCPKQOLCCFRAGSPPTTRV**
 hR-espondina4 4 **GRHGEPEEADTCQVLSSEPKQDQKIK EKQGQWVWQHCPKQOLCCFRAGSPPTTRV**

dominio 1 de tipo tromboespondina

hR-espondina1 1 **SKPAGAGGRRRKGGWQHCPKQDQKIK EKQGQWVWQHCPKQOLCCFRAGSPPTTRV**
 hR-espondina2 19 **QEGHHSVFLATDRLK EKQGQWVWQHCPKQOLCCFRAGSPPTTRV**
 hR-espondina3 17 **SLPSSEKTPPEQHCPKQDQKIK EKQGQWVWQHCPKQOLCCFRAGSPPTTRV**
 hR-espondina4 14 **D EKQGQWVWQHCPKQOLCCFRAGSPPTTRV**

B

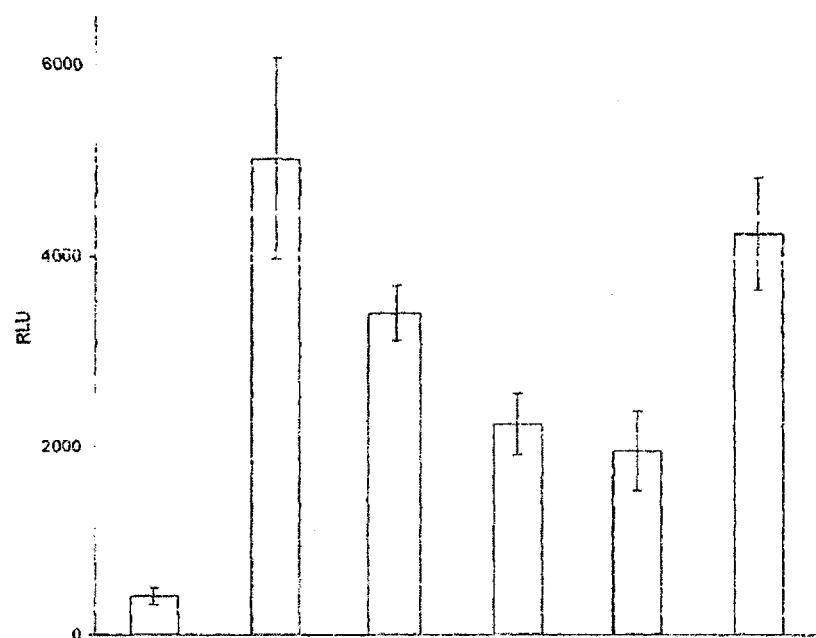
hRspo2	39.9			
hRspo3	43.7	45.9		
hRspo4	40.3	43.9	41.2	
	hRspo1	hRspo2	hRspo3	hRspo4

C

mRspo2	40.5	95.5	44.2	44.8
X-Rspo2	40.8	83.5	43.8	42.2
	hRspo1	hRspo2	hRspo3	hRspo4

Figura 6

ES 2 345 256 T3



pSuper Non.	+	+				
pSuper hFut1			+		+	+
pSuper hFut2				+	+	+
Wnt3A med.	-	+	+	+	+	+
mFut1						+

Figura 7

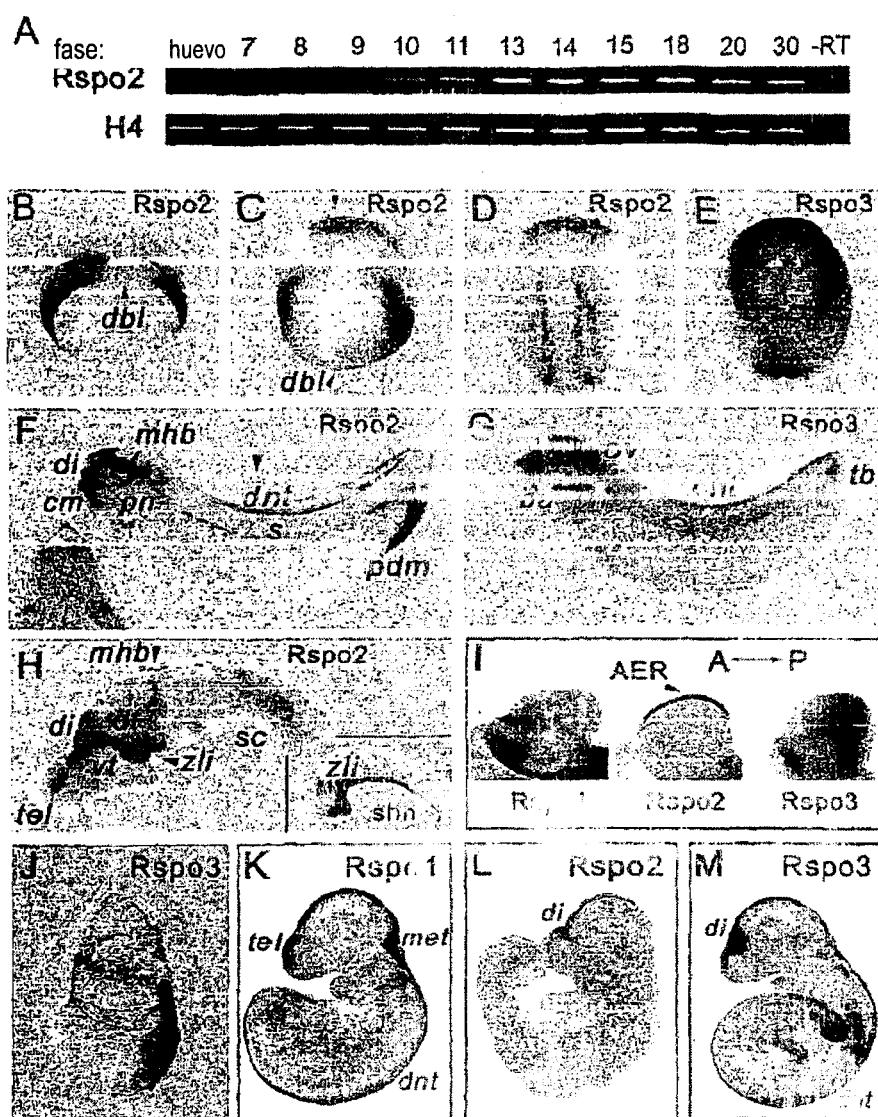


Figure 8

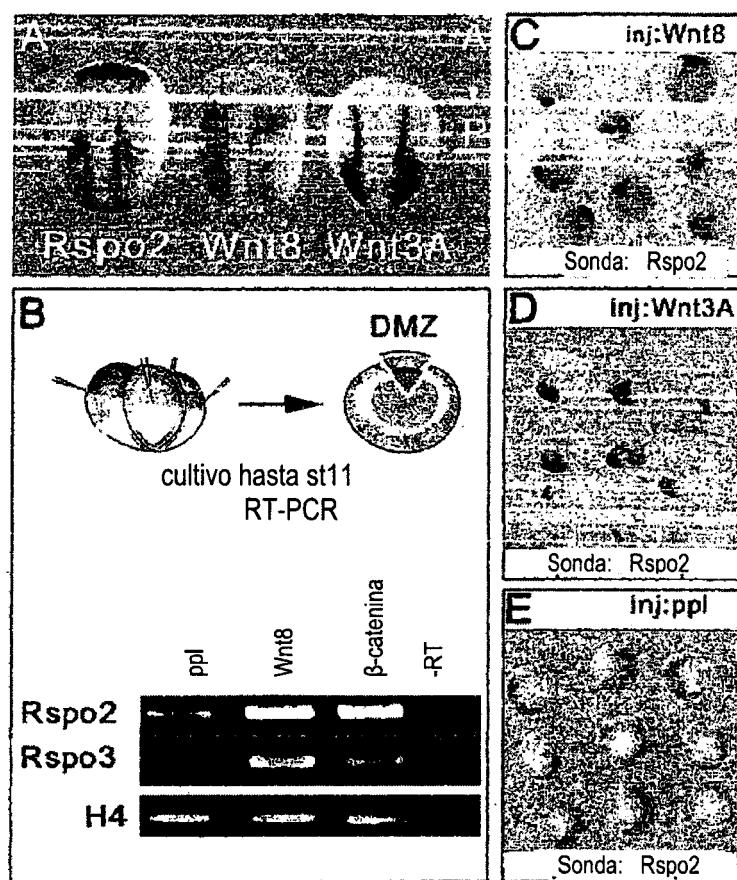


Figura 9

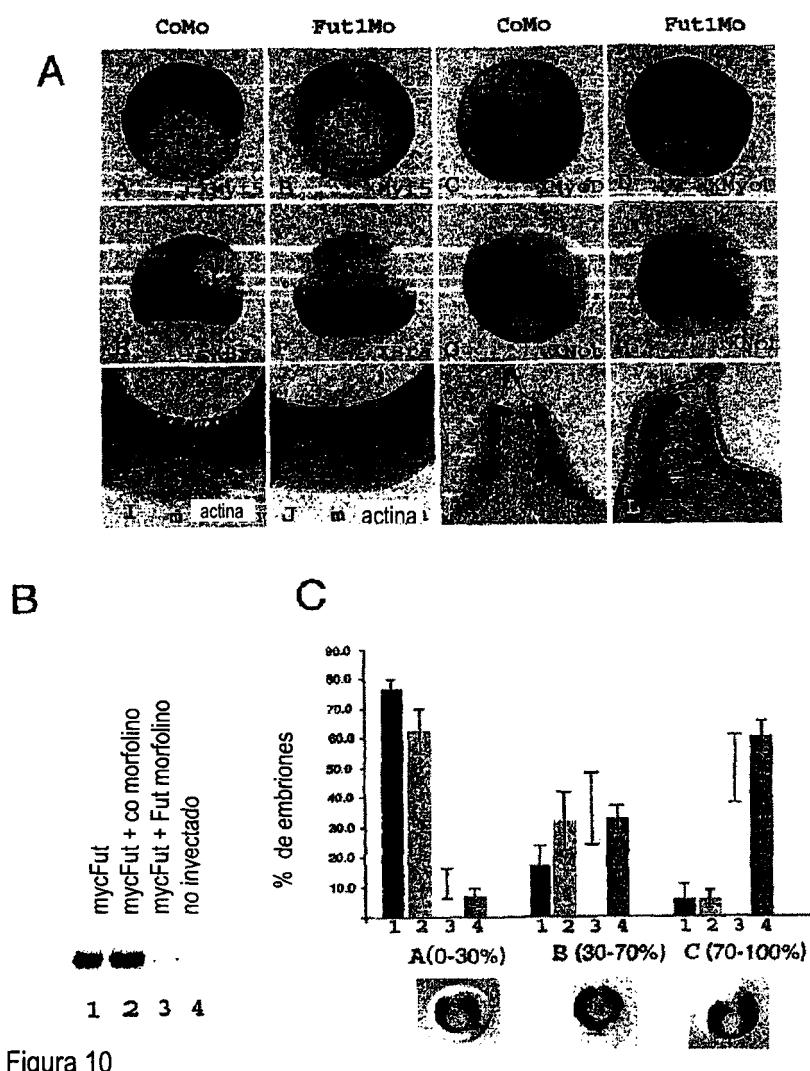


Figura 10

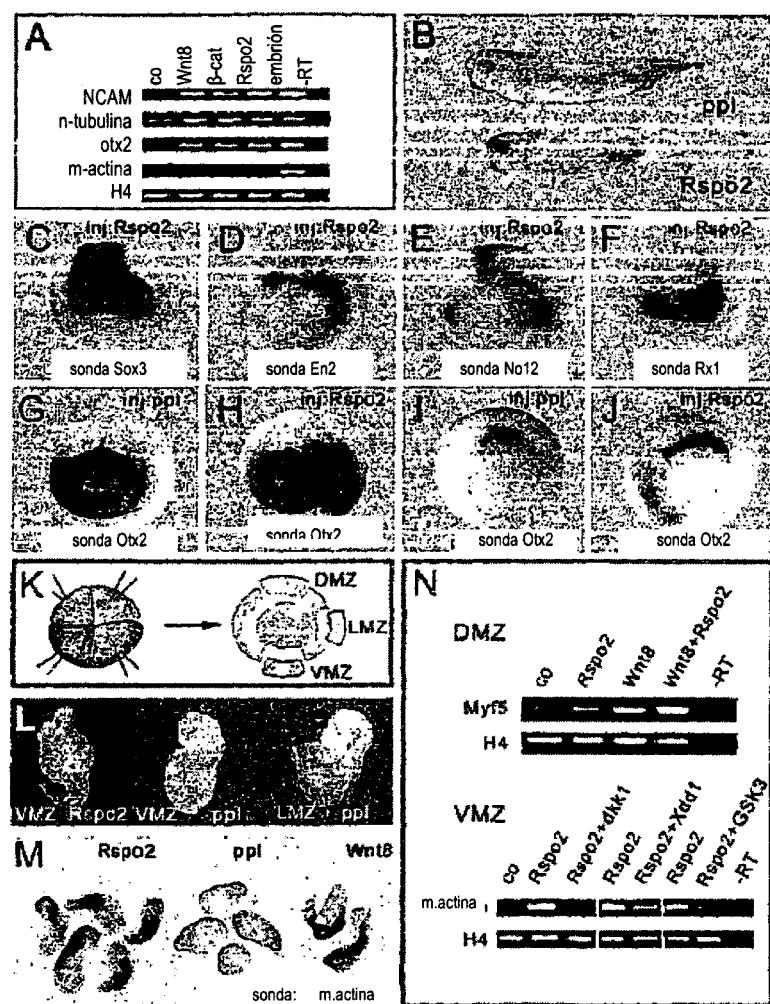
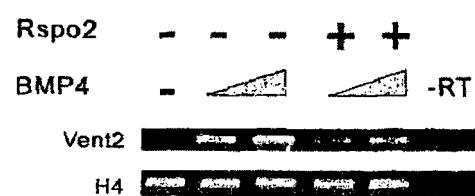
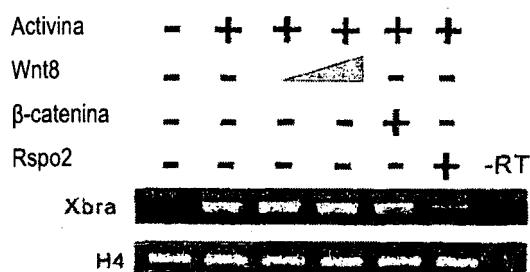


Figura 11

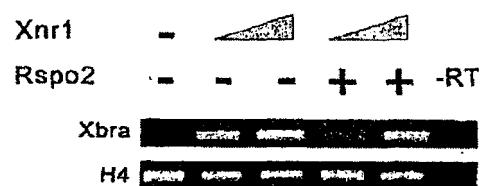
A



B



C



D

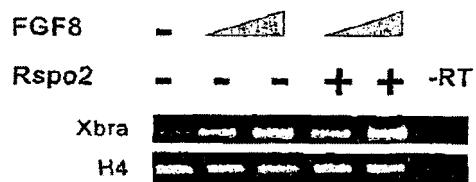


Figura 12

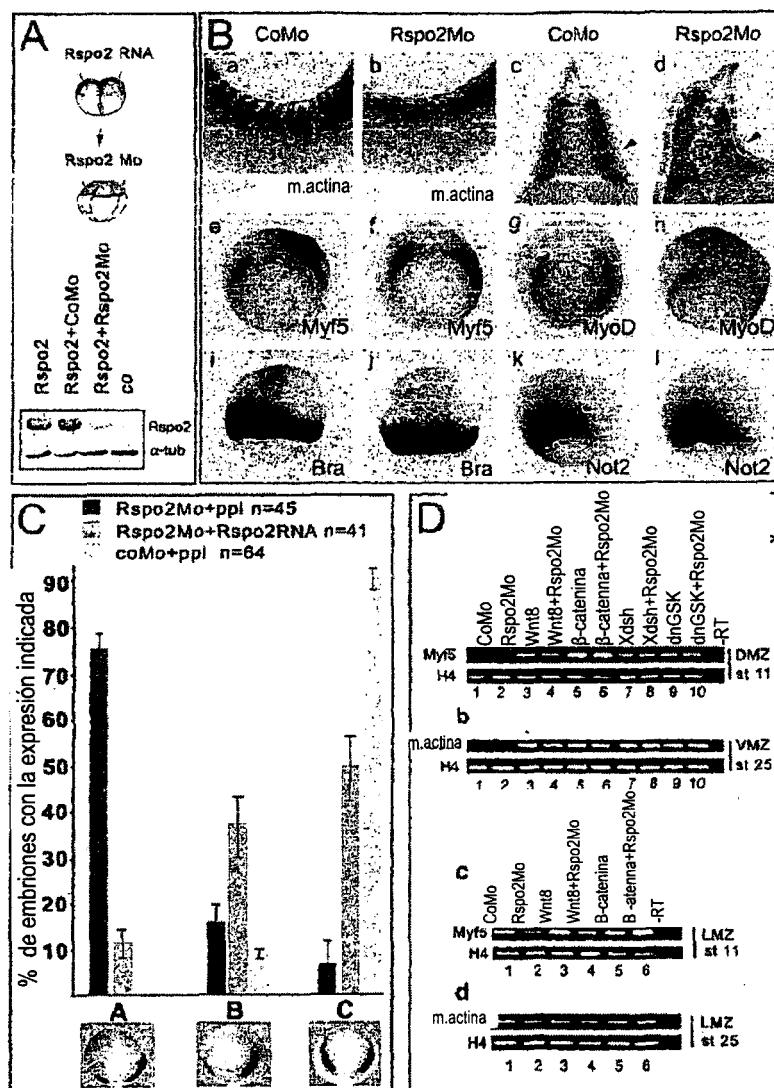


Figura 13

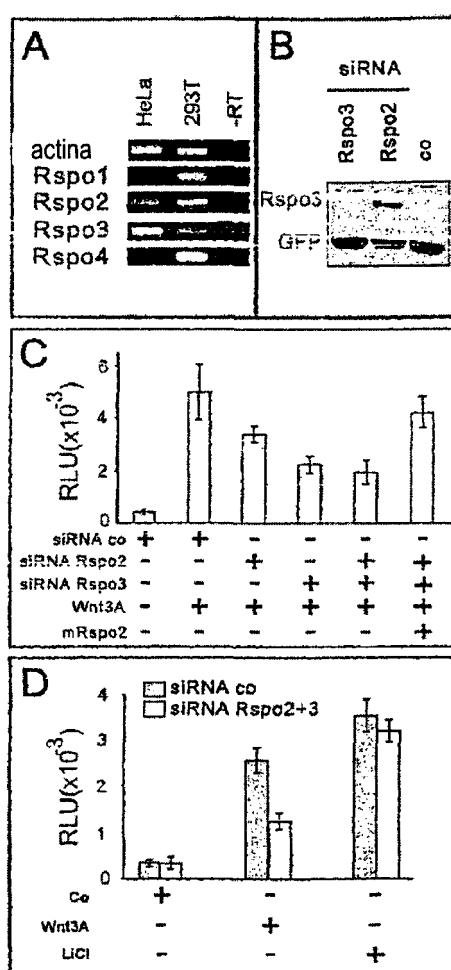


Figura 14

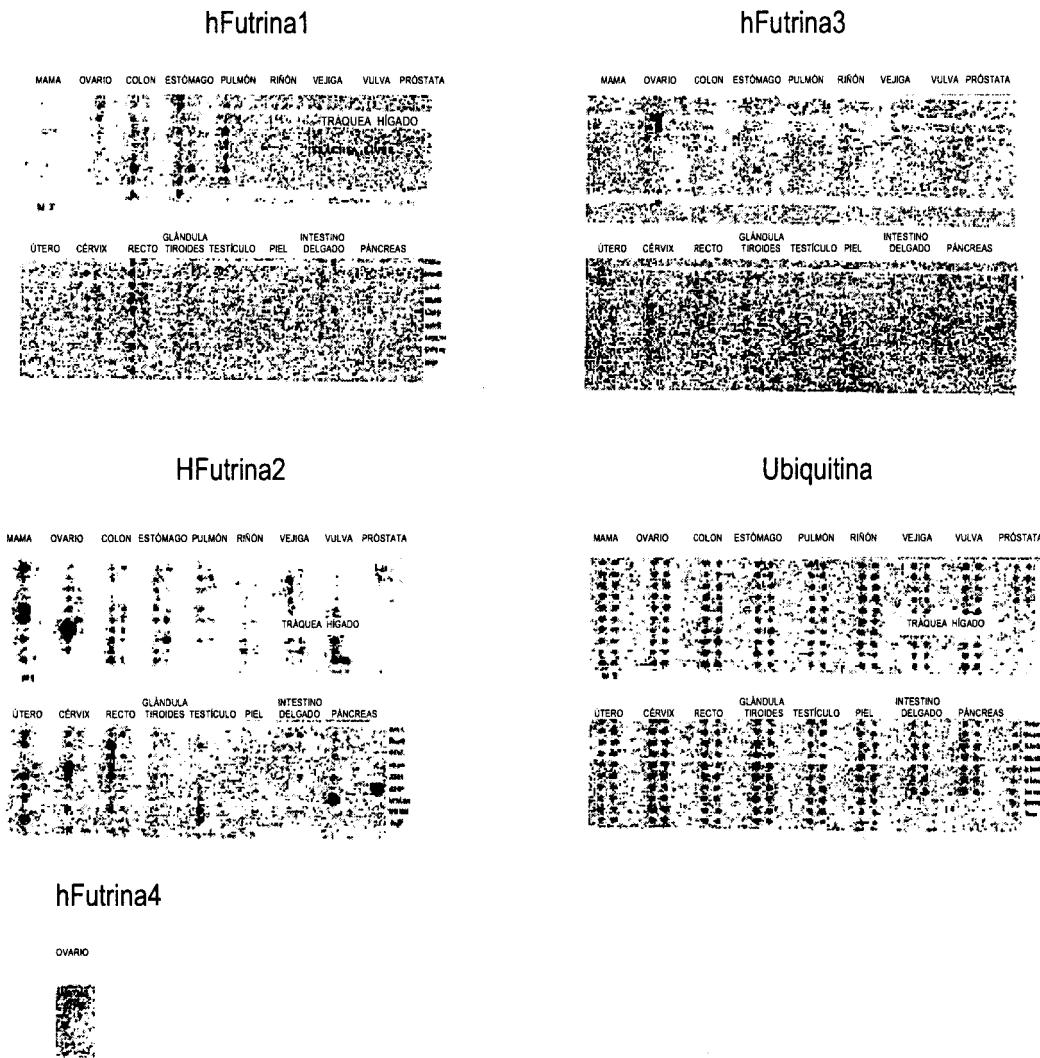


Figura 15

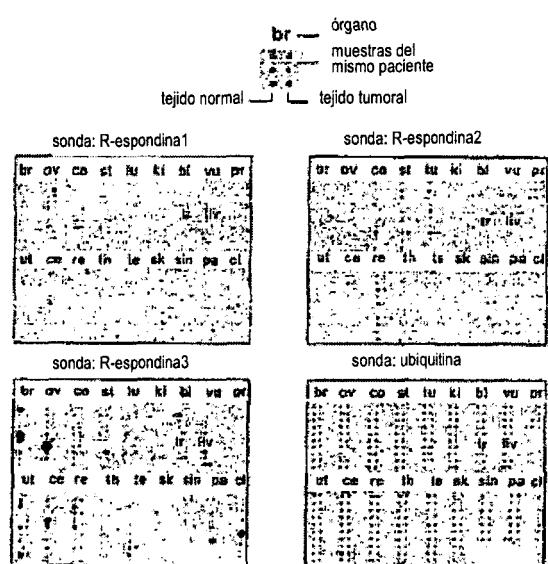


Figura 16

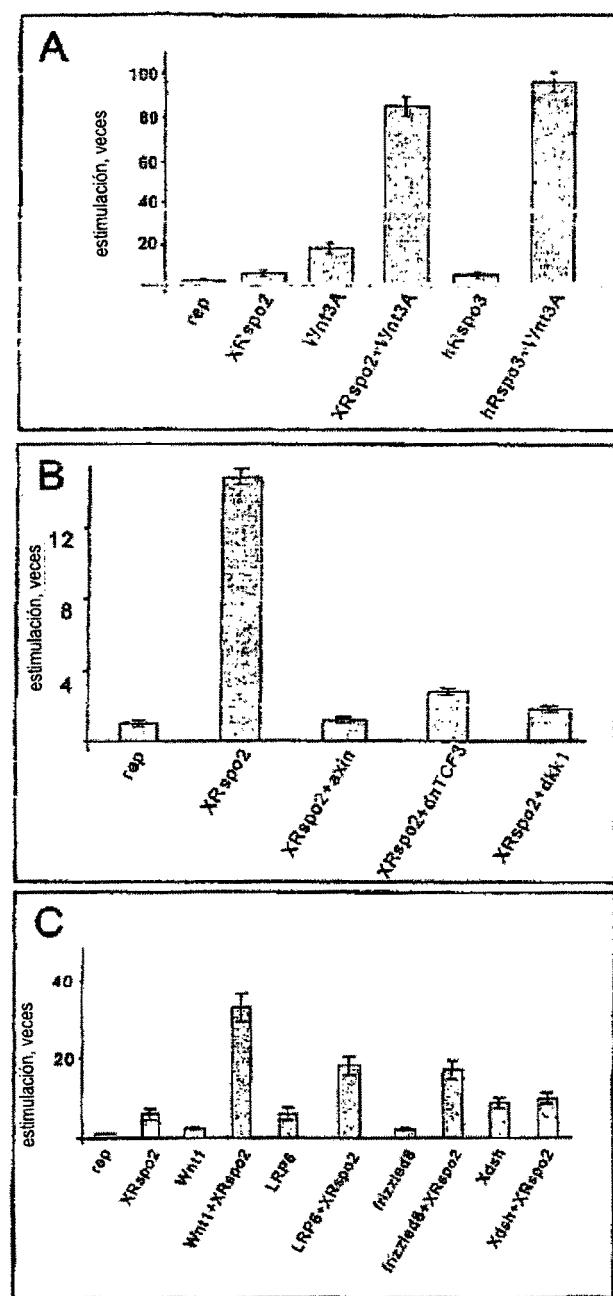


Figura 17