



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 304 210**

② Número de solicitud: 200650052

⑤ Int. Cl.:
A61K 38/16 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **15.10.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2008**

Fecha de la concesión: **14.08.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **28.09.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
28.09.2009

⑰ Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
460 Point San Bruno Boulevard
South San Francisco, California 94080, US

⑱ Inventor/es: **Dealmeida, Venita I. y**
Stewart, Timothy A.

⑳ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

⑳ Título: **Utilización de Dkk-5, procedimiento y equipo de diagnóstico de trastornos resistentes a la insulina e hibridoma y anticuerpo contra Dkk-5.**

㉑ Resumen:

Utilización de Dkk-5, procedimiento y equipo de diagnóstico de trastornos resistentes a la insulina e hibridoma y anticuerpo contra Dkk-5.

Utilización de una composición para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la resistencia a la insulina que comprende Dkk-5 y un agente.

También se refiere a un procedimiento y equipo para detectar la aparición de dicha resistencia a la insulina en un mamífero, cuyo procedimiento comprende medir la cantidad de Dkk-5 en una muestra del mamífero; y comparar dicha cantidad con la de Dkk-5 presente en una muestra control, y cuyo equipo comprende un anticuerpo que se une a la Dkk-5; una muestra control que contiene la Dkk-5; e instrucciones para utilizar el anticuerpo y la muestra control para detectar el trastorno.

También se refiere a un hibridoma que produce un anticuerpo contra la Dkk-5 y a estos anticuerpos para utilizarse en el procedimiento y equipo de diagnóstico descritos.

ES 2 304 210 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Utilización de Dkk-5, procedimiento y equipo de diagnóstico de trastornos resistentes a la insulina e hibridoma y anticuerpo contra Dkk-5.

5

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

10 La presente invención proporciona medios para el diagnóstico y tratamiento de trastornos que implican la resistencia a la insulina, tales como la diabetes mellitus no dependiente de la insulina, o del Tipo 2, y otros estados resistentes a la insulina, tales como los asociados con la obesidad y envejecimiento. Más particularmente, la presente invención se refiere al uso de la Dkk-5 en el tratamiento de un trastorno de resistencia a la insulina. También, la invención se refiere particularmente a procedimientos que usan niveles de Dkk-5 para diagnosticar la presencia de un trastorno de
15 resistencia a la insulina en un individuo del que se sospecha presenta resistencia a la insulina o trastornos relacionados, especialmente la diabetes mellitus no dependiente de insulina.

Descripción de la técnica relacionada

20 La resistencia a la insulina, definida como una respuesta biológica menor de la esperada para una dosis determinada de insulina, es una situación ubicua que se correlaciona con la obesidad. Además, muchas de las consecuencias patológicas de la obesidad se cree que implican la resistencia a la insulina. Éstas incluyen la hipertensión, la hiperlipidemia y, de forma más notable, la diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM). La mayoría de los pacientes con la NIDDM son obesos, y un componente muy central y temprano en el desarrollo de NIDDM es la resistencia a la insulina (Moller *et al.*, *New Eng. J. Med.* 325:938 (1991)). Se ha demostrado que se desarrolla una anomalía posterior al receptor durante el curso de la resistencia a la insulina, además de la desregulación del receptor de la insulina durante las fases iniciales de la enfermedad (Olefsky *et al.*, en *Diabetes Mellitus*, Eds. Rifkin y Porte, Jr. (Elsevier Science Publishing, Co., Inc., Nueva York, 4ª edición, 1990), pp. 121-153).

30 Varios estudios sobre los sistemas de transporte de la glucosa para tal defecto posterior al receptor han demostrado que tanto la cantidad como al función del transportador de la glucosa sensible a la glucosa (GLUT4) son deficientes en estados resistentes a la insulina en roedores y humanos (Garvey *et al.*, *Science* 245:60 (1989); Sivitz *et al.*, *Nature* 340:72 (1989); Berger *et al.*, *Nature* 340:70 (1989); Kahn *et al.*, *J. Clin. Invest.* 84:404 (1989); Charron *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265:7994 (1990); Dohm *et al.*, *Am. J. Physiol.* 260:E459 (1991); Sinha *et al.*, *Diabetes* 40:472 (1991); Friedman
35 *et al.*, *J. Clin. Invest.* 89:701 (1992)). Una ausencia de una reserva normal de transportadores de glucosa sensibles a la insulina podría teóricamente convertir un individuo en resistente a la insulina (Olefsky *et al.*, en *Diabetes Mellitus*, ver más arriba. Sin embargo, ciertos estudios no han conseguido mostrar desregulación del GLUT4 en humanos NIDDM, especialmente en el músculo, el sitio principal para la utilización de la glucosa (Bell, *Diabetes* 40:413 (1990); Pederson
40 *et al.*, *Diabetes* 39:865 (1990); Handberg *et al.*, *Diabetologia* 33:65 (1990); Garvey *et al.*, *Diabetes* 41:465 (1992)).

La evidencia, a partir de estudios *in vivo* en modelos animales y estudios clínicos, indica que la resistencia a la insulina en la diabetes del Tipo II puede ser el resultado de alteraciones en la expresión y actividad de los intermediarios en la vía de transducción de la señal de la insulina, alteraciones en la velocidad de transporte de glucosa estimulado por la insulina, o alteraciones en la translocación del GLUT4 hacia la membrana plasmática (Zierath *et al.*, *Diabetologia* 43:821-835 (2000)). La evidencia a partir de estudios con animales sugiere que los defectos en la señalización de la insulina en el músculo altera la homeostasis de la glucosa en todo el cuerpo (Saad *et al.*, *J. Clin. Invest.* 90:1839-1849 (1992); Folli *et al.*, *J. Clin. Invest.* 92:1787-1794 (1993); Heydrick *et al.*, *J. Clin. Invest.* 91:1358-1366 (1993); Saad *et al.*, *J. Clin. Invest.* 92:2065-2072 (1993); Heydrick *et al.*, *Am. J. Physiol.* 268:E604-612 (1995)); y que los defectos en los intermediarios en la cascada de señalización de la glucosa, incluyendo el IR, IRS-1, y la quinasa-3 de PI, pueden conducir a un transporte de glucosa reducido y a una reducida translocación del GLUT4 estimulada por la insulina, en el músculo esquelético procedente de sujetos diabéticos resistentes a la insulina y del Tipo II. En algunos ejemplos, se ha observado la expresión alterada del IRS-1 (Saad *et al.*, 1993, ver más arriba; Saad *et al.*, 1993, ver más arriba; Goodyear *et al.*, *J. Clin. Invest.* 95:2195-2204 (1995)), de la quinasa-3 del PI (Anai *et al.*, *Diabetes* 47:13-23 (1998)), o de la GSK-3 (Nikoulina *et al.*, *Diabetes* 49:2195-2204 (1995)), o niveles disminuidos del PKC θ (Chalfan *et al.*, *Endocrinology* 141:2773-2778 (2000)), o del PTP1B (Dadke *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274:583-589 (2000)). La fosforilación disminuida del IR (Arner *et al.*, *Diabetologia* 30:437-440 (1987); Maegawa *et al.*, *Diabetes* 44:815-819 (1991); Saad *et al.*, 1992, ver más arriba; Saad *et al.*, 1993, ver más arriba; Goodyear *et al.*, ver más arriba), del IRS-1 (Saad *et al.*, 1992, ver más arriba; Saad *et al.*, 1993, ver más arriba; Goodyear *et al.*, ver más arriba), y del Akt (Krook *et al.*, *Diabetes* 47:1281-1286 (1998)) también se han observado en el músculo esquelético de algunos sujetos diabéticos del Tipo II. Adicionalmente, también se ha observado que la actividad disminuida de la quinasa-3 de PI (Saad *et al.*, 1992, ver más arriba; Heydrick *et al.*, 1995, ver más arriba; Saad *et al.*, 1993, ver más arriba; Goodyear *et al.*, ver más arriba; Heydrick *et al.*, 1993, ver más arriba; Folli *et al.*, *Acta Diabetol.* 33:185-192 (1996); Bjornholm *et al.*, *Diabetes* 46:524-527 (1997); Andreelli *et al.*, *Diabetologia* 42:358-364 (1999); Kim *et al.*, *J. Clin. Invest.* 104:733-741 (1999); Andreelli, F. *et al.*, *Diabetologia* 43:356-363 (2000); Krook *et al.*, *Diabetes* 49:284-292 (2000)), y la actividad incrementada de la GSK-3 (Eldar-Finkelman *et al.*, *Diabetes* 48:1662-1666 (1999)), PKC (Avignon *et al.*, *Diabetes* 45:1396-1404 (1996)); y PTP1B (Dadke *et al.*, ver más arriba) están asociadas con la diabetes del Tipo II. Adicionalmente, la distribución de las isoformas de la PKC está alterada en el músculo esquelético de animales diabéticos (Schmitz-Peiffer *et al.*, *Diabetes* 46:169-178 (1997)), y el contenido de PKC α , PKC β , PKC ϵ y

ES 2 304 210 B1

PKC δ está incrementado en las fracciones de membrana y disminuido en las fracciones citosólicas del músculo soleo en la rata diabética Goto-Kakizaki (GK) no obesa (Avignon *et al.*, ver más arriba).

5 Se ha observado la localización subcelular anormal en el músculo esquelético procedente de sujetos resistentes a la insulina con o sin diabetes del Tipo II (Vogt *et al.*, *Diabetologia* 35:456-463 (1992); Garvey *et al.*, *J. Clin. Invest.* 101:2377-2386 (1998)), sugiriendo que los defectos en el tráfico y translocación del GLUT4 podrían causar la resistencia a la insulina en el músculo esquelético. Los estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado una velocidad reducida de transporte de glucosa estimulado por la insulina en el músculo esquelético de algunos sujetos diabéticos del Tipo II (Andreasson *et al.*, *Acta Physiol. Scand.* 142:255-260 (1991); Zierath *et al.*, *Diabetologia* 37:270-277 (1994); Bonadonna *et al.*, *Diabetes* 45:915-925 (1996)).

15 Aunque el diagnóstico de la diabetes mellitus sintomática no es difícil, la detección de la enfermedad asintomática puede causar un cierto número de problemas. La diagnosis podría confirmarse usualmente mediante la demostración de la hiperglicemia en ayunas. En los casos fronterizos, usualmente se aplica el bien conocido ensayo de tolerancia a la glucosa. No obstante, cierta evidencia sugiere que el ensayo de la tolerancia a la glucosa oral sobre-diagnostica la diabetes hasta un grado considerable, probablemente porque el estrés procedente de una diversidad de fuentes (mediado a través de la liberación de la hormona epinefrina) puede causar una respuesta anormal. Con objeto de aclarar estas dificultades, el National Diabetes Data Group de los National Institutes of Health han recomendado criterios para el diagnóstico de la diabetes a continuación de un desafío con glucosa oral (*National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance, Diabetes* 28:1039 (1979)).

20 La frecuencia de la diabetes mellitus en la población general es difícil de determinar con certeza, pero se cree que el trastorno afecta a más de diez millones de norteamericanos. La diabetes mellitus generalmente no puede curarse, sino tan sólo controlarse. En los años más recientes se ha hecho evidente que hay una serie de síndromes diferentes incluidos bajo el término común de “diabetes mellitus”. Estos síndromes difieren tanto en sus manifestaciones clínicas como en su patrón de herencia. El término diabetes mellitus de considera que se aplica a una serie de estados hiperglicémicos que exhiben las características mencionadas más arriba y más abajo.

30 La diabetes mellitus se ha clasificado en dos categorías básicas, primaria y secundaria, e incluye la tolerancia deteriorada a la glucosa, la cual podría definirse como un estado asociado con niveles de glucosa en sangre anormalmente altos después de una carga de glucosa oral, en el cual el grado de elevación es insuficiente para permitir que se haga un diagnóstico de diabetes. Las personas en esta categoría tienen un riesgo mayor de desarrollar la hiperglicemia del ayuno o la diabetes sintomática con relación a personas con una tolerancia normal a la glucosa, aunque tal progresión no puede predecirse en pacientes individuales. De hecho, varios estudios amplios sugieren que la mayoría de los pacientes con tolerancia deteriorada a la glucosa (aproximadamente el 75 por ciento) nunca desarrollan diabetes (Jarret *et al.*, *Diabetologia* 16:25-30 (1979)).

40 Los factores de riesgo independientes obesidad e hipertensión para las enfermedades ateroscleróticas también están asociados con resistencia a la insulina. Usando una combinación de pinzamientos de insulina/glucosa, infusión de glucosa trazadora, y calorimetría indirecta, se ha demostrado que la resistencia a la insulina de la hipertensión esencial está localizada en los tejidos periféricos (principalmente el músculo), y que se correlaciona directamente con la gravedad de la hipertensión (DeFronzo y Ferrannini, *Diabetes Care* 14:173 (1991)). En la hipertensión de los obesos, la resistencia a la insulina genera hiperinsulinemia, la cual se recluta como un mecanismo para limitar un incremento ulterior de peso a través de la termogénesis, pero la insulina también incrementa la reabsorción renal del sodio y estimula el sistema nervioso simpático en los riñones, corazón y vasculatura, creando hipertensión.

50 Actualmente se aprecia que la resistencia a la insulina es usualmente el resultado de un defecto en el sistema de señalización del receptor de la insulina, en un sitio posterior a la unión de la insulina al receptor. La evidencia científica acumulada, que demuestra la resistencia a la insulina en los tejidos principales que responden a la insulina (músculo, hígado, adiposo), sugiere con fuerza que un defecto en la transducción de la señal de insulina reside en un paso temprano de esta cascada, específicamente en la actividad quinasas del receptor de la insulina, la cual parece estar disminuida (Haring, *Diabetologia* 34:848 (1991)).

55 Es digno de mención que, a pesar de otras vías de tratamiento, la terapia con insulina permanece como el tratamiento de elección para muchos pacientes con la diabetes del Tipo 2, especialmente aquellos que han sufrido un fallo en la dieta primaria y no son obesos, o aquellos que han padecido ambos: un fallo en la dieta primaria y un fallo hipoglicémico oral secundario. Pero está igualmente claro que la terapia con insulina debe combinarse con un esfuerzo continuo en el control de la dieta y una modificación del estilo de vida, y en modo alguno puede considerarse como un sustituto de éstos. Con objeto de conseguir los resultados óptimos, la terapia con insulina debería seguirse mediante la auto-monitorización de la glucosa en sangre y con estimaciones apropiadas de las proteínas en sangre glicosiladas. La insulina podría administrarse en varios regímenes, sola, dos o múltiples inyecciones de insulinas que actúan a corto, intermedio o largo plazo, o mezclas de más de un tipo. El mejor régimen para cualquier paciente debe determinarse mediante un proceso de adaptación de la terapia con insulina a la respuesta monitorizada del paciente individual.

65 La tendencia al uso de la terapia con insulina en la diabetes del Tipo 2 ha incrementado con la comprensión moderna de la importancia de un control glicémico estricto para evitar las complicaciones a largo plazo de la diabetes. Sin embargo, en los diabéticos del Tipo 2 no obesos con fallo hipoglucémico oral secundario, aunque la terapia con

insulina podría ser exitosa para producir un control adecuado, no se garantiza en modo alguno una buena respuesta (Rendell *et al.*, *Ann. Int. Med.* 90:195-197 (1979)). En un estudio, sólo el 31 por ciento de 58 pacientes no obesos, que estaban pobremente controlados con dosis máximas de agentes hipoglicémicos orales, conseguía mejoras verificables objetivamente en el control respecto un régimen de insulina sencillo (Peacock *et al.*, *Br. Med. J.* 288:1958-1959 (1984)). En los diabéticos obesos con un fallo secundario, la situación es aún menos clara porque en esta situación la insulina frecuentemente incrementa el peso corporal, a menudo con un deterioro concomitante del control.

Por tanto, será evidente que el estado actual del conocimiento y de la práctica, en relación con la terapia de la diabetes del Tipo 2, no es satisfactorio en modo alguno. La mayoría de los pacientes experimentan un fallo dietario primario con el tiempo, y mayoría de los diabéticos del Tipo 2 obesos con consiguen alcanzar el peso corporal ideal. Aunque los agentes hipoglicémicos orales son frecuentemente exitosos para reducir el grado de glicemia en el caso de un fallo dietario primario, muchas autoridades dudan de que el grado de control glicémico conseguido sea suficiente para evitar la aparición de las complicaciones a largo plazo, enfermedad ateromatosa, neuropatía, nefropatía, retinopatía, y enfermedad vascular periférica, asociadas con la diabetes del Tipo 2 de larga duración. La razón de esto puede apreciarse a la luz de la comprensión actual de que, incluso la mínima intolerancia a la glucosa, aproximadamente equivalente a glucosa en plasma en ayunas de 5,5 a 6,0 mmoles/l, está asociada con un riesgo incrementado de mortalidad cardiovascular (Fuller *et al.*, *Lancet* 1:1373-1378 (1980)). Tampoco está claro que la terapia con insulina produzca mejora alguna en el resultado a largo plazo respecto el tratamiento con agentes hipoglicémicos orales. Por tanto, puede apreciarse que un procedimiento de tratamiento mejor sería de gran utilidad.

La familia de proteínas Dickkopf (Dkk) es una familia de inhibidores secretados del Wnt (Krupnik *et al.*, *Gene* 238:301-313 (1999); Monaghan *et al.*, *Mech. Dev.* 87:45-56 (1999)). La Dkk-1 (WO 00/12.708, publicada el 9 de marzo de 2000, en donde la Dkk-1 se denomina como PRO1316 y el ADN codificante como DAN60608) se identificó como un inductor de la formación de la cabeza en *Xenopus* mediante inhibición de la señal Wnt (Glinka *et al.*, *Nature* 391:357-362 (1998)), y subsiguientemente se mostró que estaba implicado en el desarrollo de las extremidades (Grotewold *et al.*, *Mech. Dev.* 89:151-153 (1999)) y en la inhibición de la transformación morfológica inducida por el Wnt (Fedi *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:19465-19472 (1999)). Se ha hallado que la Dkk-1 y la Dkk-2 exhiben un antagonismo mutuo, ya que la Dkk-2 activa en vez de inhibir la vía de señalización Wnt/ β -catenina en los embriones de *Xenopus* (Wu *et al.*, *Current Biology* 10:1611-1614 (2000)). Se ha descrito también que mientras que la Dkk-1 inhibe la señal del Wnt, un producto del corte de la Dkk-1 la activa (Brott y Sokol, *Mol. Cell Biol.* 22:6100-6110 (2000)).

Estudios recientes indican que las Dkk actúan uniéndose a la LRP6, proteína relacionada con las lipoproteínas de baja densidad, la cual actúa como un co-receptor de la señal del Wnt (Pinson *et al.*, *Nature* 407:535-538 (2000); Tamai *et al.*, *Nature* 407:530-535 (2000); Wehrli *et al.*, *Nature* 407:527-530 (2000)). La Dkk-1 antagoniza la señal del Wnt uniéndose a la LRP6 en dominios distintos de los implicados en su interacción con el Wnt y Frizzled, inhibiendo de ese modo la señalización del Wnt/ β -catenina mediada por la LRP6 (Bafico *et al.*, *Nat. Cell Biol.* 3:683-686 (2001), Mao *et al.*, *Nature* 411:321-325 (2001); Semenov *et al.*, *Current Biology* 11:951-961 (2001)).

La vía de señalización del Wnt juega un papel clave en el desarrollo embrionario, en la diferenciación de varios tipos celulares, y en la oncogénesis (Peifer y Polakis, *Science* 287:1606-1609 (2000)). La vía de señalización del Wnt es activada por la interacción entre los Wnt secretados y sus receptores, las proteínas Frizzled (Hlsken y Behrens, *J. Cell Sci.* 113:35453-3546 (2000)). Conduce a la activación de la proteína Disheveled (Dvl1), la cual activa la Akt, la cual es reclutada subsiguientemente por la Axina- β -catenina-GSK3 β -APC (Fukumoto *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276:17479-17483 (2001)). Esto es seguido por la fosforilación e inactivación de la GSK30, lo que resulta en la inhibición de la fosforilación y degradación de la β -catenina. La β -catenina acumulada se transloca al núcleo, en donde interactúa con los factores de transcripción de la familia del factor potenciador linfoide-factor de la célula T (LEF/TCF), e induce la transcripción de los genes diana.

Dos de los efectores cadena abajo de la señalización del Wnt, el Akt y el GSK3 β , son intermediarios clave en la vía de señalización de la insulina/metabolismo de la glucosa. La señalización del Wnt está implicada en la regulación de la diferenciación del músculo (Borello *et al.*, *Development* 126:4247-4255 (1999); Cook *et al.*, *EMBO J.* 15:4526-4536 (1996); Cossu y Borello, *EMBO J.* 18:6867-6872 (1999); Ridgeway *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275:32398-32405 (2000); Tian *et al.*, *Development* 126:3371-3380 (1999); Toyofuku *et al.*, *J. Cell Biol.* 150:225-241 (2000)), y la adipogénesis (Ross *et al.*, *Science* 289:950-953 (2000)). La inhibición de la señalización del Wnt puede estimular la trans-diferenciación de miocitos a adipocitos (Ross *et al.*, *supra*). Además, la LRP5 está genéticamente asociada con la diabetes del Tipo 1. El gen se halla dentro del locus IDDM4 de la diabetes mellitus independiente de la insulina (IDDM) del cromosoma 11g13 (Hey *et al.*, *Gene* 216:103-111 (1998)), y se expresa en los islotes de Langerhans, en macrófagos, y en células del sistema de la Vitamina A, que son tipos de células que están implicadas en la progresión de la diabetes del Tipo 1 (Figueroa *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.* 48:1357-1368 (2000)). El mRNA de la LRP5 estaba incrementado en el hígado, y acumulado en células esponjosas cargadas de colesterol de las lesiones ateroscleróticas en conejos hiperlipidémicos hereditarios Watanabe deficientes en LDLR (Kin *et al.*, *J. Biochem. (Tokyo)* 124:1072-1076 (1998)).

En WO 01/40.465 (PCT/US00/30.873) se describe una molécula Dkk-5, en donde la Dkk-5 se denomina como PRO10268 y el ADN codificante como DNA145583-2820, con el n° de depósito PTA-1179 en el ATCC, depositado el 1/11/00. En EP-1.067.182-A2, publicada el 10 de enero de 2001, se identificada otra molécula Dkk-5 (denominada PSECO258). La última solicitud se refiere a varias secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas secretoras o de membrana humanas y anticuerpos contra las mismas. El foco de su utilidad se contiene en dos ejemplos. El

primero es tratar células NT con artritis reumatoide (RA) e inhibidores de la RA, y mirar la regulación/desregulación de un subconjunto de genes descubiertos a medida que proceden a través de la diferenciación neuronal. El segundo ejemplo implica tratar células primarias, procedentes del tejido sinovial, con TNF-alpha para la RA, y mirar la regulación/desregulación de un subconjunto de sus genes. La molécula Dkk-5 de la EP-1.067.182-A2 no es en ningún caso es un acierto positivo.

Hay una necesidad de agentes terapéuticos efectivos que puedan usarse en el diagnóstico y terapia de individuos que padecen de un trastorno de resistencia a la insulina, incluyendo la NIDDM.

10 Resumen de la invención

La proteína Dkk-5 se identificó como un modulador del metabolismo de la glucosa en células del músculo esquelético y adipocitos cultivados. El tratamiento de las células musculares con Dkk-5 resultó en un incremento en la toma de glucosa basal y estimulada por insulina. Este efecto se observó a continuación de un tratamiento de largo plazo, sugiriendo que la Dkk-5 afecta ambos, la diferenciación muscular así como los niveles de expresión de proteínas en la vía de señalización de la insulina. Los datos muestran que la Dkk-5 estimula *in vitro* tanto el metabolismo basal de la glucosa como el estimulado por la insulina. Por tanto, la Dkk-5 es útil en el tratamiento de un trastorno de resistencia a la insulina, incluyendo uno asociado con, por ejemplo, la obesidad, la intolerancia a la glucosa, la diabetes mellitus, la hipertensión, y las enfermedades isquémicas de los vasos sanguíneos grandes y pequeños.

La invención en ésta consiste en los procedimientos, equipos, y composiciones según se reivindican. Específicamente, la invención proporciona en una realización un procedimiento para tratar un trastorno de resistencia a la insulina en mamíferos, que comprende administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad efectiva de Dkk-5. Preferiblemente, el mamífero es un humano y padece la NIDDM o es obeso. También se prefiere la administración sistémica. En una realización más preferida, se administra otro agente para el tratamiento de la resistencia a la insulina, además de la Dkk-5, para tratar el trastorno de resistencia a la insulina.

En una realización aún más preferida, el polipéptido de la Dkk-5 usado para el tratamiento tiene al menos aproximadamente el 85%, más preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 99%, y más preferiblemente un 100% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la SEC. N° ID.: 5 en la Figura 2, con o sin su péptido señal asociado. En otra realización preferida, la Dkk-5 es un fragmento de proteína del corte interno de la SEC. N° ID.: 5, que tiene una secuencia N-terminal MALFDWTDYEDLK (SEC. N° ID.: 8) y un peso molecular de aproximadamente 16 kDa; o es una mezcla de una Dkk-5 que tiene la SEC. N° ID.: 5 y un fragmento de proteína del corte interno de la SEC. N° ID.: 5 que tiene la secuencia N-terminal MALFDWTDYEDLK (SEC. N° ID.: 8) y un peso molecular de aproximadamente 16 kDa; o es una mezcla de una Dkk-5 que tiene al SEC. N° ID.: 5 y carece de su péptido señal asociado, y un fragmento de proteína del corte interno de la SEC. N° ID.: 5 que tiene la secuencia N-terminal MALFDWTDYEDLK (SEC. N° ID.: 8) y un peso molecular de aproximadamente 16 kDa. Más preferiblemente, la Dkk-5 es una Dkk-5 que comprende la SEC. N° ID.: 5, o una Dkk-5 que comprende la secuencia entre el residuo 20 hasta el residuo 30, y el residuo 347 (el final) de la SEC. N° ID.: 5, preferiblemente una Dkk-5 que comprende la secuencia entre los residuos 25 y 347 de la SEC. N° ID.: 5, o un fragmento de proteína del corte interno de la SEC. N° ID.: 5 que tiene la secuencia N-terminal MALFDWTDYEDLK (SEC. N° ID.: 8) y un peso molecular de aproximadamente 16 kDa, o una combinación de dicho producto de corte y una o ambas de las Dkk-5 que comprenden la SEC. N° ID.: 5 o comprenden la secuencia entre los residuos 20, hasta el residuo 30, y el residuo 347 de la SEC. N° ID.: 5.

En otra realización de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia o inicio de un trastorno de resistencia a la insulina en un mamífero. Este procedimiento comprende los pasos de:

- (a) medir la cantidad de Dkk-5 en una muestra procedente de dicho mamífero; y
- (b) comparar la cantidad determinada en el paso (a) con una cantidad de Dkk-5 presente en una muestra estándar, siendo un nivel disminuido en la cantidad de Dkk-5 en el paso (a) indicativo del trastorno. Preferiblemente, el mamífero es un humano. También, preferiblemente, la medición se lleva a cabo usando un anticuerpo anti-Dkk-5, tal como un anticuerpo monoclonal, en un inmunoensayo. También, preferiblemente, tal anticuerpo comprende una marca, más preferiblemente una marca fluorescente, una marca radiactiva, una marca enzimática, tal como una marca bioluminiscente o una marca quimioluminiscente. También, preferiblemente, el inmunoensayo es un radioinmunoensayo, un inmunoensayo enzimático, un ensayo inmunosorbente unido a enzima, un inmunoensayo en sándwich, un ensayo de precipitación, un ensayo inmunoradiactivo, un inmunoensayo de fluorescencia, un inmunoensayo de Proteína A, o un ensayo de inmunolectroforesis. También se prefiere la situación en la que el trastorno de resistencia a la insulina es la NIDDM.

En otra realización, la invención proporciona un equipo de diagnóstico para detectar la presencia o inicio de un trastorno de resistencia a la insulina en un mamífero, comprendiendo dicho equipo:

- (a) un contenedor que comprende un anticuerpo que une la Dkk-5;
- (b) un contenedor que comprende una muestra de estándar que contiene Dkk-5; y

ES 2 304 210 B1

- (c) instrucciones para usar el anticuerpo y la muestra de estándar para detectar el trastorno en una muestra procedente del mamífero, en donde, o el anticuerpo que se une a la Dkk-5 está marcado de forma detectable, o el equipo comprende además otro contenedor que comprende un segundo anticuerpo que está marcado de forma detectable y se une a la Dkk-5 o al anticuerpo que se une a la Dkk-5. Preferiblemente, el anticuerpo que se une a la Dkk-5 es un anticuerpo monoclonal, y el mamífero es un humano.

En una realización ulterior, la invención proporciona un equipo para tratar un trastorno de resistencia a la insulina en un mamífero, comprendiendo dicho equipo:

- (a) un contenedor que comprende la Dkk-5; y
- (b) instrucciones para usar la Dkk-5 para tratar el trastorno.

En una realización preferida, el trastorno es la NIDDM, el contenedor es un vial, y las instrucciones especifican colocar el contenido del vial en una jeringa para su inmediata inyección. También se prefiere cuando el equipo contiene además un contenedor que comprende un agente para tratar la resistencia a la insulina, y cuando el mamífero es un humano.

En otra realización, la invención proporciona un fragmento de proteína del corte interno de la SEC. N° ID.: 5 que tiene la secuencia N-terminal MALFDWTDYEDLK (SEC. N° ID.: 8) y un peso molecular de aproximadamente 16 kDa.

En un aspecto ulterior, la invención proporciona una composición que comprende este fragmento de proteína y un portador, y más preferiblemente esta composición comprende además una Dkk-5 que comprende la SEC. N° ID.: 5, con o sin su péptido señal asociado. Si la Dkk-5 que comprende la SEC. N° ID.: 5 carece de su péptido señal asociado, generalmente comprende la secuencia entre aproximadamente el residuo 20, hasta aproximadamente el residuo 30, y el final de la SEC. N° ID.: 5, más preferiblemente entre los residuos 25 a 347 de la SEC. N° ID.: 5.

La invención proporciona además un hibridoma que produce un anticuerpo contra la Dkk-5, seleccionado de entre el PTA-3090, PTA-3091, PTA-3092, PTA-3093, PTA-3094, PTA-3095, y PTA-3096. También se proporciona un anticuerpo producido por uno cualquiera de estos hibridomas.

La invención comprende además un procedimiento para evaluar el efecto de una droga farmacéutica candidata sobre un trastorno de resistencia a la insulina en un mamífero, el cual comprende administrar dicha droga a un modelo animal no humano transgénico que sobreexpresa el cADN del *dkk-5*, y determinar el efecto de la droga sobre la desaparición de la glucosa de la sangre en dicho modelo. Preferiblemente, el modelo animal es un roedor, más preferiblemente un ratón o rata, y los más preferiblemente un modelo de ratón. En otra realización preferida, el cADN de *dkk-5* se sobreexpresa en tejido muscular.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 descubre la estructura esquemática de la familia de proteínas Dkk (hDkk-1, hDkk-2, hDkk-3, hDkk-4, y hDkk-5).

La Figura 2 muestra el alineamiento de secuencia de la familia de proteínas humana Dkk, Dkk-1 (SEC. N° ID.: 1), Dkk-2 (SEC. N° ID.: 2), Dkk-3 (SEC. N° ID.: 3), Dkk-4 (SEC. N° ID.: 4), y Dkk-5 (SEC. N° ID.: 5). La regiones enmarcadas denotan dominios ricos en cisteína, y los triángulos invertidos indican la ubicación del sitio de corte interno para proteínas de esta familia.

La Figura 3 muestra los niveles de expresión relativa de la Dkk-5 en varios tejidos adultos humanos.

La Figura 4 muestra los niveles relativos de expresión de la Dkk-5 en embrión de ratón.

La Figura 5A-5E muestra el análisis de la hibridación *in situ* de embriones de ratón enteros en días diferentes de desarrollo, correspondiendo la Figura 5A al día 8,5-9 p.c., la Figura 5B al día 10 p.c., la Figura 5C a (cerca de) el día 10 p.c., la Figura 5D al día 11 p.c., y la Figura 5E al día 12,5 (cabeza) p.c.

La Figura 6 muestra el nivel de expresión relativa de la Dkk-5 durante la diferenciación celular L6 desde el día 1 hasta el día 8.

La Figura 7 muestra un gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie-blue de la hDkk-5 expresada en baculovirus, y su corte, correspondiendo el carril 1 a condiciones no reductoras y correspondiendo el carril 2 a condiciones reductoras.

La Figura 8A-8B muestra el efecto de la Dkk-5 sobre la captación de glucosa basal y estimulada por insulina en células musculares L6, a las 48 horas de tratamiento (Figura 8A) y a las 96 horas de tratamiento (Figura 8B). Las barras más pequeñas representan que no se ha usado insulina, y las barras más elevadas representan el uso de insulina 30 nM.

ES 2 304 210 B1

La Figura 9A-9B muestra el efecto de la Dkk-5 sobre la incorporación de glucosa en glucógeno, basal y estimulada por insulina, en células musculares L6, a las 48 horas de tratamiento (Figura 8A) y a las 96 horas de tratamiento (Figura 8B). Las barras más pequeñas representan que no se ha usado insulina, y las barras más elevadas representan el uso de insulina 30 nM.

5

Las Figuras 10A-10G ilustran el efecto de la Dkk-5 sobre los niveles de expresión de diferentes genes implicados en la miogénesis en las células musculares L6. La Figura 10A muestra el efecto sobre la expresión de la cadena ligera de la miosina (MLC-2); la Figura 10B muestra el efecto sobre la expresión de la Myf5; la Figura 10C muestra el efecto sobre la expresión miogénica; la Figura 10D muestra el efecto sobre la expresión de la Pax3; la Figura 10E muestra el efecto sobre la expresión de la cadena ligera de la MLC 1/3; la Figura 10F muestra el efecto sobre la expresión de la cadena ligera de la MyoD; y la Figura 10G muestra el efecto sobre la expresión de la cadena pesada de la miosina (HC). Los rombos representan células sin tratar y los triángulos representan células tratadas con Dkk-5.

10

La Figura 11 muestra el efecto de la Dkk-5 sobre la expresión de genes implicados en la vía de señalización de la insulina (implicados en el metabolismo de la glucosa). La barra a la izquierda de cada par corresponde a Dkk-5 en el día 5, y la barra a la derecha de cada par corresponde a Dkk-5 en el día 7.

15

La Figura 12 muestra un análisis FACS de unión de la Dkk-5 a células L6, y qué puede suprimir la unión.

20

Las Figuras 13A-13B muestra en efecto de la Dkk-5 sobre la captación de glucosa basal y estimulada por insulina en adipocitos, a las 48 horas de tratamiento (Figura 13A) y a las 96 horas de tratamiento (Figura 13B). Las barras más bajas representan sin insulina y las barras más altas representan el uso de insulina 30 mM.

25

Las Figuras 14A-14B muestra el efecto de la Dkk-5 sobre la incorporación basal y estimulada por insulina de la glucosa en lípidos en adipocitos, a las 48 horas de tratamiento (Figura 14A) y a las 96 horas de tratamiento (Figura 14B). Las barras más bajas representan sin insulina y las barras más altas representan el uso de insulina 30 mM.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

30

Tal como se usa en ésta, “Dkk-5” o “Dickkopf-5” o “polipéptido Dkk-5” se refiere a un polipéptido que tiene al menos el 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa del polipéptido Dkk-5 mostrada en la Figura 2 (SEC. N° ID.: 5), o un polipéptido que tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del polipéptido Dkk-5 mostrada en la Figura 2 (SEC. N° ID.: 5) y que carece de su péptido señal asociado, o un polipéptido que tiene al menos el 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia codificante de longitud completa del ADN depositada bajo el número de acceso de ATCC PTA-1179, o cualquier otro fragmento del polipéptido de longitud completa SEC. N° ID.: 5 tal como se descubre en ésta, a condición de que el polipéptido Dkk-5 tal como se define en ésta tenga la actividad de tratar un trastorno de resistencia a la insulina.

35

El Dkk-5 definido en ésta podría aislarse a partir de una variedad de fuentes, tales como a partir de tipos de tejidos humanos o a partir de otra fuente nativa, o prepararse mediante procedimientos recombinantes o sintéticos. El término “Dkk-5” abarca especialmente las formas truncadas o secretadas del polipéptido especificado que ocurren de forma natural (por ejemplo, una secuencia de un dominio extracelular), formas variantes que ocurren de forma natural (por ejemplo, formas empalmadas alternativamente), y variantes alélicas del polipéptido que ocurren de forma natural. En varias realizaciones de la invención, el polipéptido de Dkk-5 es un polipéptido de secuencia nativa de longitud completa o maduro que comprende la totalidad de la longitud de la secuencia de aminoácidos de la SEC. N° ID.: 5 mostrada en la Figura 2. Sin embargo, mientras que el polipéptido de Dkk-5 descubierto en la Figura 2 anexa como SEC. N° ID.: 5, se muestra que empieza con un residuo metionina, es concebible y posible que otros residuos metionina, ubicados cadena arriba o cadena abajo respecto la posición de inicio de aminoácidos de la SEC. N° ID.: 5 en la Figura 2, pudieran emplearse como residuo aminoácido de inicio para el polipéptido de Dkk-5.

40

Los polipéptidos de Dkk-5 incluyen, por ejemplo, los polipéptidos en donde uno o mas residuos aminoácidos están añadidos o suprimidos en los extremos N- o C-terminales de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa de la SEC. N° ID.: 5. Un polipéptido de Dkk-5 tendrá al menos el 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 81% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 82% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 83% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 84% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 85% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 86% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 87% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 88% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 89% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 90% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 91% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 92% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 93% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 94% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al

55

60

65

ES 2 304 210 B1

menos aproximadamente el 96% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 97% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 98% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos, y alternativamente al menos aproximadamente el 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEC. N° ID.: 5 tal como se descubre en ésta, o con la SEC. N° ID.: 5 que carece del péptido señal tal como se descubre en ésta, a condición de que tenga la actividad de tratar un trastorno de resistencia a la insulina.

Ordinariamente, los polipéptidos de Dkk-5 tienen al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o más, a condición de que tengan la actividad de tratar un trastorno de resistencia a la insulina.

El producto de corte interno aislado (que empieza con MA), formado a partir del corte en el sitio interno marcado con una flecha invertida en la SEC. N° ID.: 5 de la Figura 2, que tiene aproximadamente un peso molecular de 16 kDa, es activo para potenciar la captación de glucosa basal y estimulada por la insulina en células musculares, al igual que lo es la preparación recombinante que contiene la mayoría de la proteína madura y/o proteína que contiene la secuencia señal.

Los preferidos son aquellos con al menos aproximadamente el 85%, preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC. N° ID.: 5. Son todavía más preferidos son los polipéptidos de la SEC. N° ID.: 5 de la Figura 2 en ésta, el polipéptido denominado PRO10268 en WO 01/40.465 (PCT/US00/30.873), y el polipéptido denominado PSECO258 en EP-1.067.182-A2 publicada el 10 de enero de 2001. Son todavía más preferidos el polipéptido que tiene la SEC. N° ID.: 5 de la Figura 2 en ésta y el PRO10268 de WO 01/40.465, y los polipéptidos maduros de los mismos, así como el fragmento de proteína del corte interno de la SEC. N° ID.: 5 que tiene la secuencia N-terminal MALFDWTDYEDLK (SEC. N° ID.: 8) y un peso molecular de aproximadamente 16 kDa, y mezclas de los mismos con una Dkk-5 que tenga la secuencia SEC. N° ID.: 5, con o carente de su péptido señal asociado. El más preferido es el polipéptido que comprende la SEC. N° ID.: 5 de la Figura 2 en ésta, con o sin su péptido señal asociado, y/o el fragmento de proteína del corte interno de la SEC. N° ID.: 5 que tiene la secuencia N-terminal MALFDWTDYEDLK (SEC. N° ID.: 8) y un peso molecular de aproximadamente 16 kDa.

La ubicación aproximada del "péptido señal" del polipéptido descubierto en ésta va desde la metionina en la posición 1 hasta la alanina en la posición 24 de la SEC. N° ID.: 5 de la Figura 2, hallándose el sitio de corte entre la alanina en la posición 24 y la glicina en la posición 25 de la SEC. N° ID.: 5 de la Figura 2. No obstante, se destaca que el extremo C-terminal de un péptido señal podría variar, aunque lo más probable es que en no más de aproximadamente cinco aminoácidos en cada lado del extremo C-terminal del péptido señal, tal como se ha identificado inicialmente en ésta, en donde el extremo C-terminal del péptido señal podría identificarse de acuerdo con criterios empleados rutinariamente en la técnica para identificar este tipo de elemento en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen *et al.*, *Prot. Eng.* 10:1-6 (1997) y von Heinje *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 14:4683-4690 (1986)). Más aún, también se reconoce que, en algunos casos, el corte de una secuencia señal a partir de un polipéptido secretado no es enteramente uniforme, resultando en más de una especie secretada. Esto polipéptidos maduros, en donde el péptido señal se corta dentro de no más de aproximadamente cinco aminoácidos en cada lado del extremo C-terminal del péptido señal tal como se identifica en ésta, y los polinucleótidos que los codifican, se contemplan en la presente invención.

El "porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos" con respecto las secuencias de polipéptido de la Dkk-5 identificadas en ésta, se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos en la secuencia polipeptídica específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es preciso, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de la secuencia, y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de la secuencia. El alineamiento con propósito de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas formas que se hallan dentro de los conocimientos propios de la técnica, por ejemplo, usando programas de ordenador disponibles públicamente, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN, o Megalign (DNASTAR). Aquellos especialistas en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualesquier algoritmos necesarios para conseguir el alineamiento máximo a los largo de la totalidad de la longitud de las secuencias que se comparan. No obstante, para los propósitos en ésta, los valores de % de identidad de la secuencia de aminoácidos se generaron usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2, en donde el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 de WO-01/16.319, publicada el 8 de marzo de 2001, y WO-00/73.452, publicada el 7 de diciembre de 2000. El programa de ordenador para la comparación de secuencias ALIGN-2 fue escrito por Genentech, Inc., y el código fuente ha sido registrado con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos, Washington D.C., 20559, en donde se halla registrado bajo el n° de registro de derechos de autor TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema

ES 2 304 210 B1

operativo UNIX, preferiblemente el UNIX V4.0D de Digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones en las que se empleó ALIGN-2 para las comparaciones de las secuencias de aminoácidos, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una determinada secuencia de aminoácidos A respecto a, con, o frente a una determinada secuencia de aminoácidos B (lo cual puede alternativamente redactarse como: una determinada secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un cierto % de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a, con, o frente a una determinada secuencia de aminoácidos B) se calcula como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

en donde X es el número de residuos aminoácidos puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de A y B por parte del programa, y en donde Y es el número total de residuos aminoácidos en B. Se apreciará que, cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A respecto B no igualará el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de B respecto A. En las TABLAS 2 y 3 de WO-01/16.319, publicada el 8 de marzo de 2001, y WO-00/73.452, publicada el 7 de diciembre de 2000, se proporcionan ejemplos de cálculos de identidades de secuencias de aminoácidos usando ALIGN-2.

A menos que se especifique lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos usados en ésta se obtuvieron, tal como se ha descrito en el párrafo inmediatamente precedente, usando el programa de ordenador ALIGN-2. No obstante, los valores del % de identidad de las secuencias de aminoácidos también podrían obtenerse, tal como se describe más abajo, usando el programa de ordenador WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se ajustan a valores por defecto. Aquellos no ajustados a valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se ajustan con los siguientes valores: extensión del solapamiento = 1, fracción de solapamiento = 0,125, nivel de palabra (T) = 11, matriz de puntuación = BLOSUM62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos se determina dividiendo (a) el número de residuos aminoácidos de emparejamiento entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido de Dkk-5 de interés, que tiene una secuencia derivada del polipéptido de Dkk-5 nativo, y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia contra la cual se está comparando el polipéptido de Dkk-5 de interés), según es determinado por WU-BLAST-2, por (b) el número total de residuos aminoácidos del polipéptido de Dkk-5 de interés. Por ejemplo, en la afirmación “un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos A, la cual tiene o posee al menos el 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos B”, la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de interés, y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del polipéptido de Dkk-5 de interés.

El porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos también podría determinarse usando el programa de comparación de secuencia NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 puede descargarse de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, u obtenerse de otro modo de los National Institutes of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en donde todos los parámetros de búsqueda se ajustan a valores por defecto, incluyendo, por ejemplo, desenmascarado = sí, hebra = todas, ocurrencias esperadas = 10, longitud de complejidad baja mínima = 15/5, valor “e” de múltiple paso = 0,01, constante para múltiple paso = 25, disminución para el alineamiento con huecos final = 25, y matriz de puntuación = BLOSUM62.

En las situaciones en las que se emplea NCBI-BLAST2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de las secuencias de aminoácidos de una determinada secuencia de aminoácidos A respecto a, con, o frente a una determinada secuencia de aminoácidos B (lo que puede redactarse alternativamente como: una determinada secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a, con, o contra un determinada secuencia de aminoácidos B) se calcula como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

en donde X es el número de residuos aminoácidos puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineamiento de secuencias NCBI-BLAST2 en el alineamiento de A y B por parte del programa, y en donde Y es el número total de residuos aminoácidos en B. Se apreciará que, cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A respecto B no igualará el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de B respecto A.

Tal como se usa en ésta, “tratar” describe la gestión y cuidado de un paciente para el propósito de combatir un trastorno de resistencia a la insulina, e incluye la administración para prevenir el inicio de los síntomas o complicaciones, aliviar los síntomas o complicaciones, o eliminar la enfermedad, condición o trastorno de resistencia a la insulina. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, aliviar los síntomas asociados con la resistencia a la insulina, disminuir la extensión de los síntomas de la resistencia a la insulina, estabilizar (es decir, no empeorar) los síntomas de la resistencia a la insulina (por ejemplo, reducción de los requerimientos de insulina), incrementar la sensibilidad a la insulina y/o la secreción de insulina para prevenir el fallo de los células de los islotes, y retrasar o ralentizar la progresión de la resistencia a la insulina, por ejemplo, la progresión de la diabetes. Tal como será comprendido por alguien con formación en la técnica, los síntomas particulares

ES 2 304 210 B1

que conducen al tratamiento de acuerdo con la invención dependerán del tipo de trastorno de resistencia a la insulina que se esté tratando. Aquellos “que precisan el tratamiento” incluyen los mamíferos que ya padecen el trastorno, así como aquellos propensos a padecer el trastorno, incluyendo aquellos en los que debe prevenirse el trastorno.

5 El término “mamífero”, para los propósitos de tratamiento y diagnóstico, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo, pero no limitándose a, los humanos, los animales de deportes, de zoológicos, de compañía, y domésticos o de granja, tales como perros, gatos, terneras, ovejas, cerdos, caballos, y primates, tales como monos. Preferiblemente, el animal es un humano.

10 Un “trastorno de resistencia a la insulina” es una enfermedad, condición, o trastorno que resulta de un fallo en la respuesta metabólica normal de tejidos periféricos (insensibles) a la acción de la insulina exógena, es decir, es una condición en la que la presencia de insulina produce una respuesta biológica inferior a la normal. En términos clínicos, la resistencia a la insulina se presenta cuando los niveles normales o elevados de glucosa en sangre persisten en presencia de niveles normales o elevados de insulina. Representa, en esencia, una inhibición de la síntesis de glucógeno, por la cual, o la síntesis de glucógeno basal o estimulada por insulina, o ambas, están reducidas por debajo de los niveles normales. La resistencia a la insulina juega un papel primordial en la diabetes del Tipo 2, tal como lo demuestra el hecho de que la hiperglicemia presente en la diabetes del Tipo 2 puede revertirse a veces mediante la dieta o una pérdida de peso suficiente, para restaurar aparentemente la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina. El término incluye la tolerancia anormal a la glucosa, así como muchos trastornos en los que la resistencia a la insulina juega un papel clave, tales como la obesidad, diabetes mellitus, hiperandrogenismo ovárico, e hipertensión.

25 “Diabetes mellitus” se refiere a un estado de hiperglicemia crónica, es decir, exceso de azúcar en la sangre, que es consecuencia de una ausencia relativa o absoluta de acción de la insulina. Hay tres tipos básicos de diabetes mellitus, la diabetes mellitus del Tipo I o dependiente de la insulina (IDDM), la diabetes mellitus del Tipo II o no dependiente de la insulina (NIDDM), y la resistencia a la insulina del Tipo A, aunque el tipo A es relativamente raro. Los pacientes con la diabetes del Tipo I o Tipo II pueden devenir insensibles a los efectos de la insulina exógena a través de una variedad de mecanismos. La resistencia a la insulina del Tipo A resulta de mutaciones en los genes del receptor de la insulina, o de defectos en sitios posteriores al receptor de acción crítica en el metabolismo de la glucosa. Los sujetos diabéticos pueden ser fácilmente reconocidos por el médico, y se caracterizan por una hiperglicemia, tolerancia alterada a la glucosa, hemoglobina glicosilada, y, en algunos casos, cetoacidosis asociada con trauma o enfermedad.

30 La “diabetes mellitus no dependiente de la insulina” o “NIDDM” se refiere a la diabetes del Tipo II. Los pacientes de la NIDDM tienen una concentración de glucosa en sangre anormalmente elevada cuando ayunan, y una captación retardada de la glucosa a continuación de comidas o después de un ensayo de diagnóstico conocido como el ensayo de la tolerancia a la glucosa. La NIDDM se diagnostica en base a criterios reconocidos (American Diabetes Association, *Physician’s Guide to Insulin-Dependent (Type I) Diabetes*, 1988; American Diabetes Association, *Physician’s Guide to Non-Insulin-Dependent (Type II) Diabetes*, 1988).

40 Los síntomas y complicaciones de la diabetes, a ser tratados como un trastorno tal como se define en ésta, incluyen la hiperglicemia, el control glicémico insatisfactorio, la cetoacidosis, la resistencia a la insulina, los niveles elevados de hormona del crecimiento, los niveles elevados de hemoglobina glicosilada y de productos finales de glicosilación avanzada (AGE), el fenómeno del amanecer, el perfil insatisfactorio de lípidos, la enfermedad vascular (por ejemplo, la aterosclerosis), la enfermedad microvascular, los trastornos retinales (por ejemplo, retinopatía diabética proliferativa), los trastornos renales, la neuropatía, las complicaciones del embarazo (por ejemplo, finalización prematura y defectos de nacimiento), y similares. En la definición de tratamiento se incluyen tales puntos finales como, por ejemplo, el incremento en la sensibilidad a la insulina, la reducción en la dosis de insulina a la vez que se mantiene el control glicémico, la disminución en la HbA1c, el control glicémico mejorado, complicaciones vasculares, renales, neuronales, retinales, y otras complicaciones diabéticas reducidas, prevención o reducción del fenómeno del amanecer, perfil lipídico mejorado, complicaciones del embarazo reducidas, y cetoacidosis reducida.

50 Una “composición terapéutica” o “composición”, tal como se usa en ésta, se define como que comprende Dkk-5 y un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua, minerales, proteínas, y otros excipientes conocidos para un especialista en la técnica.

55 El término “anticuerpo” se usa en ésta en el sentido más amplio, y abarca específicamente los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos) formados por al menos dos anticuerpos intactos, y los fragmentos de anticuerpos, a condición de que exhiban la actividad biológica deseada tal como se detalla más adelante en ésta, por ejemplo, uniéndose la Dkk-5 en un ensayo de diagnóstico.

60 El término “anticuerpo monoclonal” tal como se usa en ésta, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que ocurren de forma natural, las cuales podrían estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos con un único sitio antigénico. Más aún, en contraste con las preparaciones de anticuerpo policlonal, que incluyen diferentes anticuerpos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno.

Además de por su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que pueden sintetizarse sin contaminación de otros anticuerpos. El adjetivo “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo: que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe considerarse que requiera la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención podrían prepararse mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, *Nature* 256:495 (1975), o podrían prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (por ejemplo, patente estadounidense nº 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” podrían aislarse también a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando, por ejemplo, las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *Mol. Biol.* 222:581-597 (1991).

Los anticuerpos monoclonales en ésta incluyen específicamente los anticuerpos “quiméricos”, en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a, u homóloga con las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados a partir de una especie particular, o perteneciente a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es (son) idéntica(s) a otra clase o subclase de anticuerpo, así como a los fragmentos de tales anticuerpos, a condición de que exhiban la actividad biológica deseada, tal como se destaca en ésta (patente estadounidense nº 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en ésta incluyen los anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, monos del viejo mundo, simios, etc.), y secuencias de la región constante humana.

Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que preferiblemente comprende de la región de unión al antígeno o región variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y los Fv; los diacuerpos; los anticuerpos lineales; las moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y los anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpo.

Un anticuerpo “intacto” es aquél que comprende una región variable de unión al antígeno, así como un dominio constante de la cadena ligera (C_L) y dominios constantes de la cadena pesada (C_H1, C_H2 y C_H3). Los dominios constantes podrían ser dominios constantes de la secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de la secuencia nativa humana) o una variante de la secuencia de aminoácidos de la misma.

El término “muestra”, tal como se usa en ésta, se refiere a una muestra biológica que contiene o se sospecha contiene la Dkk-5. Esta muestra podría proceder de cualquier fuente, preferiblemente de un mamífero, y más preferiblemente de un humano. Tales muestras incluyen los fluidos acuosos, tales como el suero, plasma, fluido linfático, fluido sinovial, fluido folicular, fluido seminal, leche, sangre entera, orina, fluido cerebroespinal, saliva, esputos, lágrimas, sudor, mocos, medio de cultivo de tejidos, extractos de tejidos, y extractos celulares.

Un “agente para el tratamiento de la resistencia a la insulina” o “agente hipoglicémico” (usados de forma intercambiable en ésta) es un agente distinto de la Dkk-5 que se usa para tratar un trastorno de resistencia a la insulina, tal como, por ejemplo, la insulina (una o más insulinas diferentes); los imitadores de insulina, tales como una insulina de molécula pequeña, por ejemplo, la L-783.281; los análogos de la insulina (por ejemplo, el LYSPRO™ (Eli Lilly Co.), Lys^{B28}insulina, Pro^{B29}insulina, o Asp^{B28}insulina, o los descritos en, por ejemplo, las patentes estadounidenses nº 5.149.777 y 5.514.646), o fragmentos fisiológicamente activos de los mismos; los péptidos relacionados con la insulina (péptido-C, GLP-1, IGF-1, o el complejo IGF-1/IGFBP-3) o análogos o fragmentos de los mismos; el ergoset; el pramlintide; la leptina; el BAY-27-9955; el T-1095; los antagonistas del inhibidor del receptor quinasa de tirosina de la insulina; los antagonistas de la función TNF-alpha; un agente liberador de la hormona del crecimiento; la amilina o anticuerpos contra la amilina; un sensibilizador a la insulina, tales como los compuestos de la familia del glitazone, incluyendo aquellos descritos en la patente estadounidense nº 5.753.681, tales como el troglitazone, el pioglitazone, el englitazone, y los compuestos relacionados; el LINALOL™ sólo o con la Vitamina E (patente estadounidense nº 6.187.333); y los potenciadores de la secreción de la insulina, tales como el nateglinide (AY-4166), el (2S)-2-bencil-3-(cis-hexahidro-2-isoindolinilcarbonil)propionato dihidrato de calcio (mitiglinide, KAD-1229), el repaglinide, y los fármacos de sulfonilurea, por ejemplo, la acetohexamida, el clorpropaminda, la tolazamida, la tolbutamida, la glicopiramida y su sal amónica, la glibenclamida, glibornurida, gliclazida, 1-butil-3-metanilurea, carbutamida, glipizida, gliquidona, glioxepid, glibutiazola, glibuzola, glihexamida, glimidina, glipinamida, fenbutamida, tolcliamida, glicmepirida, etc., así como los biguanidos (tales como el fenformin, el metformin, el butformin, etc.), y los inhibidores de la α -glucosidasa (tales como la acarbosa, la voglibosa, el miglitol, el emiglitalo, etc.), y tales tratamientos atípicos como el trasplante de páncreas y los reactivos autoinmunes.

Tal como se usa en ésta, el término “insulina” se refiere a cualquiera de todas las sustancias que tienen la acción de la insulina, y están ejemplificadas, por ejemplo, por la insulina animal extraída a partir de páncreas bovino o porcino, y la insulina humana sintetizada enzimáticamente a partir de insulina extraída a partir del páncreas porcino, y la insulina humana sintetizada mediante técnicas de manipulación genética, típicamente usando *E. coli* o levaduras, etc. Además, la insulina puede incluir el complejo de insulina-zinc que contiene aproximadamente un 0,45 a 0,9% (pip) de zinc, la protamina-insulina-zinc producida a partir de cloruro de zinc, sulfato de protamina, e insulina, etc. La insulina podría estar en forma de sus fragmentos o derivados, por ejemplo, INS-1. La insulina también podría incluir sustancias similares a la insulina, tales como la L83281 y los agonistas de la insulina. Aunque la insulina está disponible en una variedad de tipos, tales como de actuación súper-inmediata, de actuación inmediata, de actuación bimodal, de actuación intermedia, de larga actuación, etc., estos tipos pueden seleccionarse apropiadamente de acuerdo con la condición del paciente.

ES 2 304 210 B1

Tal como se usa en ésta, el término “transgén” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que es parcial o totalmente heteróloga, es decir, ajena al animal transgénico en el que se ha introducido, o es homóloga a un gen endógeno del animal transgénico en el cual se ha introducido, pero que se diseña para ser insertado, o se inserta, en el genoma del animal de tal forma que se altera el genoma de la célula en la cual está insertado (por ejemplo, se inserta en una ubicación que difiere de la del gen natural). Un transgén puede estar operativamente unido a una o más secuencias reguladoras de la transcripción, y a cualquier otro ácido nucleico, tal como intrones, que pudieran ser necesarios para la expresión óptima de un ácido nucleico seleccionado. En ésta, el transgén codifica la Dkk-5.

Los “animales transgénicos no humanos” en ésta incluyen todos, en sus diversas células, el transgén que codifica la Dkk-5, el cual altera el fenotipo de la célula huésped con respecto a la eliminación de la glucosa en sangre.

“Aislado”, cuando se usa para describir los varios polipéptidos y fragmentos de proteína descubiertos en ésta, significa un polipéptido o proteína que ha sido purificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que típicamente interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos del polipéptido o proteína, y podrían incluir los enzimas, las hormonas, y otros solutos proteicos y no proteicos. En las realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos interna N-terminal mediante el uso de un “sequenator” de copa rotatoria, o (2) hasta su homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras, usando la tinción con azul de Coomassie o, preferiblemente, con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido in situ dentro de las células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural de la Dkk-1 no estará presente. No obstante, ordinariamente el polipéptido aislado se preparará mediante al menos un paso de purificación.

Modos para realizar la invención

En base a los descubrimientos en ésta de las acciones de la Dkk-5 sobre las células musculares L6 y otros datos, se descubren procedimientos nuevos para diagnosticar y tratar un trastorno de resistencia a la insulina usando la Dkk-5. Por tanto, la presente invención proporciona procedimientos útiles en un cierto número de situaciones de diagnóstico y terapéuticas *in vitro* e *in vivo*.

Uso terapéutico

La Dkk-5 se administra a mamíferos mediante cualquier vía apropiada, incluyendo una vía de administración parenteral, tales como, pero no limitándose a, la intravenosa (IV), intramuscular (IM), subcutánea (SC), e intraperitoneal (IP), así como las vías transdérmica, bucal, sublingual, intrarectal, intranasal, e inhalante. La administración IV, IM, SC e IP podría ser mediante bolo o infusión, y en el caso de la SC también podría ser mediante un dispositivo implantable de liberación lenta, incluyendo, pero no limitándose a, bombas, formulaciones de liberación lenta, y dispositivos mecánicos. Preferiblemente, la administración es sistémica, y se manifiesta una disminución en la resistencia a la insulina en forma de caída en los niveles circulantes de glucosa y/o insulina en el paciente.

Un procedimiento específicamente preferido para la administración de la Dkk-5 es mediante infusión subcutánea, particularmente usando un dispositivo de infusión medida, tal como una bomba. Tal bomba puede ser reutilizable o desechable, e implantable o montada externamente. Las bombas de infusión de medicamentos que se emplean de forma útil con este propósito incluyen, por ejemplo, las bombas descubiertas en las patentes estadounidenses n° 5.637.095, 5.569.186 y 5.527.307. Las composiciones pueden administrarse continuamente a partir de tales dispositivos, o de forma intermitente.

Las formulaciones terapéuticas de la Dkk-5 apropiadas para su almacenamiento incluyen mezclas de la proteína, que tiene el grado de pureza deseado, con portadores, excipientes, o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Ed. A. Osol (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes, o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, tales como el fosfato, citrato y de otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (tales como el cloruro de octadecildimetilbencilamonio; el cloruro de hexametonio; el cloruro de benzalconio; el cloruro de bencetonio; fenol; el alcohol butílico o bencílico; los alquilparabenes, tales como el metil- o propilparabén; el catecol; el resorcinol; el ciclohexanol; el 3-pentanol; y el *m*-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como la albúmina de suero, la gelatina, o las inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como la polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como la glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo la glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como el EDTA; azúcares, tales como la sacarosa, manitol, trehalosa, o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como el sodio; complejos de metales (por ejemplo, los complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como el TWEEN™, PLURONICS™, o el polietilenglicol (PEG). Las formulaciones preferidas de Dkk-5 liofilizada se describen en WO-97/04.801. Estas composiciones incluyen la Dkk-5, conteniendo desde aproximadamente el 0,1 hasta el 90% en peso de la Dkk-5 activa, preferiblemente en una forma soluble, y más generalmente desde aproximadamente el 10 hasta el 30% en peso.

Los ingredientes activos también podrían atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, respectivamente microcápsulas de hidroximetilcelulo-

ES 2 304 210 B1

sa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), en sistemas de liberación de drogas coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en microemulsiones. Tales técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, ver más arriba.

5 La Dkk-5 descubierta en ésta también podría formularse en inmunoliposomas. Se preparan liposomas conteniendo la Dkk-5 mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos por Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030 (1980); las patentes estadounidenses nº 4.485.045 y 4.544.545; y la WO-97/38.731, publicada el 23 de octubre de 1997. En la patente estadounidense nº 5.013.556 se descubren liposomas con tiempo de circulación mejorado.

10 Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación en fase inversa, con una composición de lípido que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruden a través de filtros con tamaño de poro definido para rendir liposomas con el diámetro deseado.

15 Podrían prepararse preparaciones de liberación ininterrumpida. Los ejemplos de preparaciones de liberación ininterrumpida incluyen las matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen la Dkk-5, matrices que se hallan en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación ininterrumpida incluyen los poliésteres, los hidrogeles (por ejemplo, el poli(2-hidroxietil-metacrilato), o el poli(vinilalcohol)), los poliláctidos (patente estadounidense nº 3.773.919), los copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, el acetato de etilvinilino no degradable, los copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico y ácido glicólico y acetato de leuprólido), y el poli-D(-)-3-hidroxitirato.

25 La Dkk-5 puede unirse a una proteína portadora para incrementar su vida media en el suero. Las formulaciones que deben usarse para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril.

30 La formulación en ésta también podría contener más de un compuesto activo, según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente aquellos cuyas actividades complementarias no se afectan negativamente entre ellas. También, tal compuesto activo puede administrarse de forma separada al mamífero que se está tratando. Tales otras drogas podrían administrarse, mediante una ruta y en una cantidad comúnmente usada para ellas, de forma contemporánea o secuencialmente con la Dkk-5. Cuando la Dkk-5 se usa contemporáneamente con una o más de otras drogas, se prefiere una forma de dosificación unitaria farmacéutica que contenga tal otra droga en adición de la Dkk-5. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen aquéllas que también contienen uno o más ingredientes activos además de la Dkk-5. Los ejemplos de agentes para el tratamiento de la resistencia a la insulina o agentes hipoglucémicos que podrían combinarse con la Dkk-5, bien administrándolos separadamente o en las mismas composiciones farmacéuticas, incluyen, pero no se limitan a:

40 (a) sensibilizadores a la insulina, incluyendo (i) los agonistas PPAR-gamma, tales como las glitazonas (por ejemplo, incluyendo aquellos descritos en la patente estadounidense nº 5.753.681, tales como la troglitazona (Noscal o Resilina), la pioglitazona HC1, el englitazona, MCC-555, BRL-49653, ALRT 268, LGD 1069, el picolinato crómico, DIAB II™ (V-411) o el GLUCANIN™ y similares), y los compuestos descubiertos en WO-97/27.857, WO-97/28.115, WO-97/28.137 y WO-87/27.847, y (ii) las biguanidas, tales como la metformina y la phenformina;

45 (b) la insulina (una o más de diferentes insulinas), las imitaciones de la insulina, tales como una insulina de molécula pequeña, por ejemplo, la L-783.281, los análogos de la insulina (por ejemplo, LYSPRO™ (Eli Lilly Co.), Lys^{B28}insulina, Pro^{B29}insulina, o Asp^{B28}insulina, o aquellos descritos en, por ejemplo, las patentes estadounidenses nº 5.149.777 y 5.514.646), o los fragmentos fisiológicamente activos de los mismos, los péptidos relacionados con la insulina (péptido-C, GLP-1, IGF-1, o el complejo IGF-1/IGFBP-3), o análogos o fragmentos de los mismos;

50 (c) las sulfonilureas, tales como la acetohexamida, clorpropamida, tolazamida, tolbutamida, glibenclamide, glibornurida, gliclazida, glipicida, gliquidona y glimidina;

55 (d) los inhibidores de la alfa-glucosidasa;

60 (e) los agentes que disminuyen el colesterol, tales como (i) los inhibidores de la HMG-CoA reductada (lovastatina, simvastatina y pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, y otras estatinas), (ii) los secuestrantes (colestiramina, colestipol, y un derivado dialquilaminoalquil de un dextrano entrecruzado), (iii) el ácido nicotínico alcohol nicotínico o una sal del mismo, (iv) agonistas del proliferador-activador alfa-receptor, tales como los derivados del ácido fenofbrico (gemfibrozil, clofibrato, fenofibrato, y benzafibrato), (v) inhibidores de la absorción del colesterol, por ejemplo, el beta-sitosterol y los inhibidores de la aciltransferasa de acil-CoA:colesterol, por ejemplo, la melinamida, (vi) el probucol, (vii) la vitamina E, y (viii) los tiromiméticos;

65 (f) los agonistas PPAR-delta, tales como los descubiertos en WO-97/28.149;

ES 2 304 210 B1

- (g) los compuestos anti-obesidad, tales como la fenfluramina, la dexfenfluramina, la phentermina, la sibutramina, el orlistat, y otros agonistas del receptor adrenérgico beta₃;
- (h) agentes modificadores del comportamiento alimenticio, tales como los antagonistas del neuropéptido Y (por ejemplo, el neuropéptido Y5), por ejemplo, aquellos descubiertos en WO-97/19.682, WO-97/20.820, WO-97/20.821, WO-97/20.822 y WO-97/20.823;
- (i) los agonistas PPAR-alfa, tales como los descritos en WO-97/36.579;
- (j) los agonistas PPAR-gamma, tales como los descritos en WO-97/10.813;
- (k) los inhibidores de la recaptación de serotonina, tales como la fluoxetina y la sertralina;
- (l) uno o más sensibilizadores a la insulina, junto con uno o más de una insulina ingerida oralmente, una insulina inyectada, una sulfonilurea, una biguanida o un inhibidor de la alfa-glucosidasa, tal como se describe en la patente estadounidense n° 6.291.495;
- (m) reactivos autoinmunes;
- (n) antagonistas del inhibidor del receptor quinasa de tirosina de la insulina (patentes estadounidenses n° 5.939.269 y 5.939.269);
- (o) el complejo IGF-1/IGFBP-3 (patente estadounidense n° 6.040.292);
- (p) antagonistas con la función TNF-alfa (patente estadounidense n° 6.015.558);
- (q) agente liberador de la hormona del crecimiento (patente estadounidense n° 5.939.387);
- (r) anticuerpos contra la amilina (patente estadounidense n° 5.942.227);

Otros agentes se especifican en la definición anterior o son conocidos por los especialistas en la técnica.

Tales moléculas adicionales se presentan de forma apropiada o se administran en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito deseado, típicamente menos de la que se usa si se administran solas sin la Dkk-5. Si se formulan juntas, podrían formularse en las cantidades determinadas de acuerdo con, por ejemplo, el sujeto, la edad y peso corporal del sujeto, el estado clínico actual, el tiempo de administración, la forma de dosificación, el procedimiento de administración, etc. Por ejemplo, una droga concomitante se usa preferiblemente en una porción de aproximadamente 0,001 hasta 10.000 partes de peso en relación a un parte de peso de la Dkk-5 en ésta.

El agente hipoglucémicos se administra al mamífero mediante cualquier técnica apropiada, incluyendo parenteral, intranasal, oralmente o mediante cualquier otra ruta efectiva. Más preferiblemente, la administración es mediante inyección (como de insulina) o mediante la ruta oral. Por ejemplo, las tabletas de MICRONASATM (gliburida) comercializadas por Upjohn en tabletas con concentraciones de 1,25, 2,5 y 5 mg, son apropiadas para la administración oral. La dosis de mantenimiento usual para los diabéticos del Tipo II, tratados con esta terapia, está generalmente en el rango de desde aproximadamente 1,25 hasta 20 mg por día, los cuales pueden administrarse como una única dosis o dividirse a lo largo del día según se considere apropiado (*Physician's Desk Reference*, 2563-2565 (1995)). Otros ejemplos de tabletas basadas en la gliburida disponibles para su prescripción incluyen el fármaco con nombre de marca GLYNASETM (Upjohn) y con nombre de marca DIABETATM (Hoechst-Roussel). El GLUCOTROLTM (Pratt) es el nombre comercial para una tableta de glipizida (1-ciclohexil-3-[p-[2-(5-metilpirazinacarboxamida)etil]fenil]sulfonilurea) disponible en ambas, dosis de 5 y 10 mg, y que también se prescribe a los diabéticos del Tipo II que requieren una terapia hipoglucémica a continuación del control dietario, o en pacientes que han dejado de responder a otras sulfonilureas (*Physician's Desk Reference*, 1902-1903 (1995)).

El uso de la Dkk-5 en combinación con la insulina permite la reducción de la dosis de insulina en comparación con la dosis en el momento de administrar insulina sola. Por tanto, el riesgo de una complicación en el vaso sanguíneo y de la inducción de hipoglucemia, ambos de los cuales podrían ser problemáticos con la administración de grandes cantidades de insulina, son menores. Para la administración de insulina a un paciente diabético adulto (peso corporal de aproximadamente 50 kg), por ejemplo, la dosis por día es usualmente aproximadamente de 10 a 100 U (Unidades), preferiblemente de aproximadamente 10 a 80 U, pero ésta podría ser inferior según lo determine el médico. Para la administración de potenciadores de la secreción de insulina al mismo tipo de pacientes, la dosis por día es, por ejemplo, preferiblemente de 0,1 a 1000 mg, más preferiblemente de 1 a 100 mg. Para la administración de biguanidas al mismo tipo de pacientes, la dosis por día es, por ejemplo, preferiblemente aproximadamente de 10 a 2500 mg, más preferiblemente aproximadamente de 100 a 1000 mg. Para la administración de inhibidores de la α -glucosidasa al mismo tipo de pacientes, la dosis por día es, por ejemplo, preferiblemente aproximadamente de 0,1 a 400 mg, más preferiblemente aproximadamente de 0,6 a 300 mg. La administración de ergoset, pramlintida, leptina, BAY-27-9955, o T-1095 a tales pacientes puede efectuarse a una dosis de preferiblemente aproximadamente 0,1 a 2500 mg, más preferiblemente aproximadamente 0,5 a 1000 mg. Todas las dosis anteriores pueden administrarse de una a varias veces al día.

ES 2 304 210 B1

La Dkk-5 también podría administrarse junto con un tratamiento sin droga apropiado para un trastorno de resistencia a la insulina, tal como un trasplante de páncreas.

Las dosis de Dkk-5 administradas a un mamífero resistente a la insulina serán determinadas por el médico a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la condición del mamífero, y la ruta de administración escogida. Los rangos de dosis presentados en ésta no se pretende que limiten el ámbito de la invención en modo alguno. Una cantidad “terapéuticamente efectiva” para los propósitos en ésta se determina a partir de los factores anteriores, pero de forma general es aproximadamente de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal/día. La dosis preferida es de aproximadamente 0,1-50 mg/kg de peso corporal/día, más preferiblemente de 0,1 a 25 mg/kg de peso corporal/día. Todavía más preferida, cuando la Dkk-5 se administra diariamente, la dosis intravenosa o intramuscular para un humano es de aproximadamente 0,3 a 10 mg/kg de peso corporal/día, más preferiblemente, aproximadamente 0,5 a 5 mg/kg de peso corporal/día. Para la administración subcutánea, la dosis es preferiblemente superior a la dosis terapéuticamente equivalente administrada intravenosa o intramuscularmente. Preferiblemente, la dosis subcutánea diaria para un humano es de aproximadamente 0,3 a 20 mg/kg de peso corporal/día, más preferiblemente aproximadamente 0,5 a 5 mg/kg de peso corporal/día.

La invención contempla una variedad de planes de dosificación. La invención abarca los planes de dosificación ininterrumpida, en los cuales la Dkk-5 se administra de forma regular (diaria, semanal o mensualmente, dependiendo de la dosis y de la forma de dosificación) sin interrupciones sustanciales. Los planes de dosificación continuada preferidos incluyen la infusión continua diaria, en la cual la Dkk-5 se infunde cada día, y los planes de administración continua de bolos, en los que la Dkk-5 se administra al menos una vez al día mediante inyección de un bolo o a través de las rutas inhalante o intranasal. La invención también abarca los planes de dosificación discontinua (por ejemplo, intermitente y de mantenimiento). Los parámetros exactos de tales planes de administración discontinua variarán de acuerdo con la formulación, procedimiento de suministro, y las necesidades clínicas del mamífero que se esté tratando. Por ejemplo, si la Dkk-5 se administra mediante infusión, los planes de administración podrían incluir un primer período de administración, seguido por un segundo período de administración en el cual no se administra la Dkk-5, el cual es mayor, igual, o inferior al primer período.

Cuando la administración es mediante inyección de un bolo, especialmente una inyección de un bolo de una formulación de liberación lenta, los planes de dosificación podrían ser también continuos, en el sentido de que la Dkk-5 se administra cada día, o podrían ser discontinuos, con un primer y segundo períodos, y así tal como se describe más arriba.

Los planes de administración continua y discontinua mediante cualquier procedimiento incluyen también los planes de dosificación en los que se modula la dosis a lo largo del primer período, de tal forma que, por ejemplo, al inicio del primer período la dosis es baja y se incrementa hasta el final del primer período, la dosis es inicialmente alta y disminuye durante el primer período, la dosis es inicialmente bajas, incrementa hasta un nivel máximo, a continuación disminuye hacia el final del primer período, y cualquier combinación de los mismos.

Los efectos de la administración de la Dkk-5 pueden medirse mediante una variedad de ensayos conocidos en la técnica. Más comúnmente, la mitigación de los efectos de la diabetes resultará en un control glicémico mejorado (según se mide mediante ensayos en serie de la glucosa en sangre), en la reducción de las necesidades de insulina para mantener un buen control glicémico, en la reducción de los niveles de insulina en suero, en la reducción de la hemoglobina glicosilada, en la reducción de los niveles en sangre de los productos finales de la glicosilación avanzada (AGE), en un “fenómeno del amanecer” reducido, en una cetoacidosis reducida, y en un perfil lipídico mejorado. Alternativamente, la administración de Dkk-5 puede resultar en la estabilización de los síntomas de la diabetes, tal como indica una reducción en los niveles de glucosa en sangre, una necesidad reducida de insulina, niveles de insulina en suero reducidos, glicosilación de la hemoglobina y de AGE en sangre reducidos, complicaciones renales, neuronales y retinales reducidas, complicaciones del embarazo reducidas, y perfil lipídico mejorado.

El efecto reductor del azúcar en sangre de la Dkk-5 puede evaluarse determinando la concentración de glucosa o Hb (hemoglobina) A_{1c} en el plasma sanguíneo venoso del sujeto, antes y después de la administración, y comparando a continuación la concentración obtenida antes de la administración y después de la administración. HbA_{1c} significa hemoglobina glicosilada, y se produce de forma gradual en respuesta a la concentración de glucosa en sangre. Por tanto, se cree que la HbA_{1c} es importante como un índice del control del azúcar en sangre, el cual no es fácilmente influenciado por cambios rápidos de azúcar en sangre en pacientes diabéticos.

La invención también proporciona equipos para el tratamiento de un trastorno de resistencia a la insulina. Los equipos de la invención comprenden uno o más contenedores de la Dkk-5, en una cantidad predeterminada, en combinación con un conjunto de instrucciones, generalmente instrucciones escritas, relacionadas con el uso y dosificación de la Dkk-5 para el tratamiento de un trastorno de resistencia a la insulina, preferiblemente la diabetes. Las instrucciones incluidas en el equipo generalmente incluyen información sobre la dosificación, plan de dosificación, y ruta de administración para el tratamiento del trastorno de resistencia a la insulina. Los contenedores de la Dkk-5 pueden ser dosis unitarias, de envasado a granel (por ejemplo, envasados de múltiples dosis), o dosis subunitarias.

La Dkk-5 podrían empaquetarse en cualquier envasado conveniente y apropiado. Por ejemplo, si la Dkk-5 es una formulación liofilizada, normalmente se usa como contenedor una ampolla o vial con un tapón elástico, de forma que puede reconstituirse fácilmente la droga inyectando un líquido a través del tapón elástico. Las ampollas con cierres no

ES 2 304 210 B1

elásticos, amovibles (por ejemplo vidrio sellado) o con tapones elásticos se usan más convenientemente para las formas inyectables de la Dkk-5. En este caso, las instrucciones especifican preferiblemente que se debe colocar el contenido del vial en una jeringa para su inmediata inyección. También se contemplan envasados para su uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, un dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador),
5 o un dispositivo de infusión, tal como una mini-bomba.

El equipo también podría comprender un contenedor incluyendo un agente para el tratamiento de la resistencia a la insulina en una cantidad predeterminada.

10 *Uso diagnóstico*

Se pueden usar muchos ensayos diferentes y formatos de ensayos para detectar la cantidad de Dkk-5 en una muestra relativa a una muestra control. A su vez, estos formatos son útiles en los ensayos de diagnóstico de la presente invención, los cuales se usan para detectar la presencia o aparición de un trastorno de resistencia a la insulina en un mamífero.
15

En la práctica de la presente invención puede usarse cualquier procedimiento conocido en la técnica para la medición de analitos solubles. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, los sistemas de ensayo competitivo y no competitivo usando técnicas tales como el radioinmunoensayo, los inmunoensayos con enzimas (EIA), preferiblemente ELISA, los inmunoensayos en "sándwich", las reacciones con precipitina, las reacciones de difusión en gel, los ensayos de inmunodifusión, los ensayos de aglutinación, los ensayos de fijación del complemento, los ensayos inmunoradiométricos, los inmunoensayos fluorescentes, los inmunoensayos con Proteína A, y los ensayos de inmunoelectroforesis. Para ejemplos de procedimientos de inmunoensayo preferidos consultar las patentes estadounidenses n° 4.845.026 y 5.006.459.
20

En una realización, se usan uno o más de los anticuerpos anti-Dkk-5 para medir la cantidad de Dkk-5 en la muestra. Para la aplicaciones diagnósticas, si se usa un anticuerpo anti-Dkk-5 para la detección, el anticuerpo típicamente estará marcado con un grupo detectable. Preferiblemente, tal anticuerpo se usa en un inmunoensayo. En un aspecto del marcaje, uno o más de los anticuerpos anti-Dkk-5 usados está marcado; en otro aspecto, un primer anticuerpo no está
25 marcado, y un segundo anticuerpo marcado se usa para detectar la Dkk-5 unida al primer anticuerpo, o se usa para detectar el primer anticuerpo.

Hay numerosas marcas disponibles, las cuales pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías:

- 35 (a) radioisótopos, tales como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , que están disponibles. El anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo o radionúcleo usando, por ejemplo, las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, volúmenes 1 y 2, Eds. Coligen *et al.* (Wiley-Interscience, Nueva York, 1991), y la radiactividad puede medirse usando el contador de centelleo.
- 40 (b) Marcas fluorescentes, tales como los quelados de tierras raras (quelados de europio) o la fluoresceína y sus derivados (tales como el isotiocianato de fluoresceína), la rodamina y sus derivados, la ficoeritrina, la ficocianina, la aloficocianina, el *o*-ftaldehído, la fluorescamina, el dansil, la lisamina, el Rojo de Tejas, los cuales están disponibles. Las marcas fluorescentes pueden conjugarse con el anticuerpo usando, por ejemplo, las técnicas descubiertas en *Current Protocols in Immunology*, ver más arriba. La fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro. El anticuerpo de detección también puede marcarse de forma detectable usando metales emisores de fluorescencia, tales como el ^{152}Eu u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse al anticuerpo usando grupos quelantes del metal tales como el ácido dietilenti-
45 triaminopentaacético (DTPA) o ácido etilen-diaminatetraacético (EDTA).
- 50 (c) Hay disponibles varias marcas que son sustrato de enzimas para un EIA, y la patente estadounidense n° 4.275.149 proporciona una revisión de algunas de éstas. El enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando varias técnicas. Por ejemplo, el enzima podría catalizar un cambio de color en un sustrato, el cual puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, el enzima podría alterar la fluorescencia, quimioluminiscencia, o bioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se describen más arriba. El sustrato quimioluminiscente pasa a estar electrónicamente excitado por una reacción química, y podría entonces emitir luz que puede medirse (usando, por ejemplo, un quimioluminómetro) o dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcas enzimáticas incluyen las luciferasas (por ejemplo, la luciferasa de la luciérnaga y la luciferasa bacteriana; patente estadounidense n° 4.737.456), la luciferina, la aequorina, las 2,3-dihidroftalazinedionas, la deshidrogenasa de malato, la ureasa, una peroxidasa, tal como la peroxidasa de rábano silvestre (HRPO), la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa, la glucoamilasa, la lisozima, las oxidasas de sacáridos (por ejemplo, la oxidasa de glucosa, la oxidasa de galactosa, la deshidrogenasa de alcohol de levadura, la deshidrogenasa del alfa-glicerofosfato, y la deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato), la nucleasa estafilococal, la isomerasa delta-V-esteroide, la isomerasa de triosa fosfato, la asparaginasa, la ribonucleasa, la ureasa, la catalasa, la acetilcolinesterasa, las oxidasas heterocíclicas (tales como la uricasa y la oxidasa de xantina), la lactoperoxidasa, la microperoxidasa, y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a los anticuerpos se describen en O'Sullivan *et al.*, *Methods in Enzymology* 73:147-166 (1981),
65 Eds. Langone y Van Vunakis, Academic Press, Nueva York.

ES 2 304 210 B1

Los ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen:

- (i) la peroxidasa de rábano silvestre (HRPO) con peroxidasa de hidrógeno como un sustrato, en donde la peroxidasa de hidrógeno oxida un precursor colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (ODP) o 3,3',5,5'-tetrametil bencidina hidrocloreuro (TMB));
- (ii) la fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenilfosfato como sustrato cromogénico; y
- (iii) la β -D-galactosidasa (β -D-Gal), con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

Hay numerosas combinaciones enzima-sustrato distintas disponibles para los especialistas en la técnica. Para una revisión general de éstas, consultar las patentes estadounidenses n° 4.275.149 y 4.318.980.

A veces, la marca se conjuga indirectamente con el anticuerpo. El especialista capacitado conocerá varias técnicas para conseguir esto. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina, y cualquiera de estas tres amplias categorías de marcas mencionadas más arriba puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a la avidina y, de este modo, la marca puede conjugarse con el anticuerpo de manera directa. Alternativamente, para conseguir la conjugación indirecta de la marca con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un pequeño hapteno (por ejemplo, digoxina), y uno de los diferentes tipos de marcas mencionadas más arriba se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, un anticuerpo anti-digoxina). Por tanto, puede conseguirse la conjugación indirecta de la marca con el anticuerpo.

En otra realización de la invención, el anticuerpo anti-Dkk-5 no es necesario que esté marcado, y la presencia del mismo puede detectarse usando un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo anti-Dkk-5.

Los anticuerpos de la presente invención podrían emplearse en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tal como los ensayos de unión competitivos, ensayos en "sándwich" directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

En los ensayos de la presente invención, el antígeno Dkk-5 o los anticuerpos contra el mismo están preferiblemente unidos a un soporte de fase sólida o portador. Por "soporte de fase sólida o portador" se quiere indicar cualquier soporte capaz de unir un antígeno o anticuerpos. Los soportes, o portadores, bien conocidos incluyen el vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nilón, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, agarosas, y la magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble hasta cierto punto o insoluble para los propósitos de la presente invención. El material de soporte podría tener virtualmente cualquier configuración estructural posible, con tal que la molécula acoplada sea capaz de unir un antígeno o anticuerpo. Por tanto, la configuración del soporte podría ser esférica, como en una cuenta, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo o la superficie externa de una barra. Alternativamente, la superficie podría ser plana, tal como una hoja, tira de ensayo, etc. Los soportes preferidos incluyen las cuentas de poliestireno. Los especialistas en la técnica conocerán muchos otros portadores apropiados para unir el anticuerpo o antígeno, o serán capaces de averiguar el mismo mediante el uso de experimentación rutinaria.

En una realización preferida, se realiza un inmunoensayo en sándwich de anticuerpo-antígeno-anticuerpo, es decir, el antígeno se detecta o mide mediante un procedimiento que comprende unir un primer anticuerpo al antígeno, y unir un segundo anticuerpo al antígeno, y determinar o medir el antígeno inmuno-específicamente unido por ambos, el primer y segundo anticuerpos. En una realización específica, el primer y segundo anticuerpos son anticuerpos monoclonales. En esta realización, si el antígeno no contiene epítopos repetitivos reconocidos por el anticuerpo monoclonal, el segundo anticuerpo monoclonal debe unirse a un sitio diferente del sitio del primer anticuerpo (tal como se refleja, por ejemplo, por la ausencia de inhibición competitiva entre los dos anticuerpos por la unión al antígeno). En otra realización específica, el primer o segundo anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En todavía otra realización específica, ambos, el primer y segundo anticuerpos son anticuerpos policlonales.

En una realización preferida se usa un inmunoensayo con enzima en sándwich "hacia adelante", tal como se describe esquemáticamente más abajo. Se une un anticuerpo (anticuerpo de captura, Ab1) dirigido con la Dkk-5 a una matriz de fase sólida, preferiblemente una microplaca. La muestra se pone en contacto con la matriz recubierta de Ab1, de tal forma que cualquier Dkk-5 en la muestra, para la cual el Ab1 es específico, se une a la fase sólida de Ab1. Los componentes de la muestra no unidos se retiran mediante lavado. Un segundo anticuerpo conjugado con enzima (anticuerpo de detección, Ab2), dirigido con un segundo epítopo del antígeno, se une al antígeno capturado por Ab1 y completa el sándwich. Después de retirar el Ab2 no unido mediante lavado, se añade un sustrato cromogénico para el enzima, y se forma un producto coloreado en proporción a la cantidad de enzima presente en el sándwich, lo que refleja la cantidad de antígeno en la muestra. La reacción se termina mediante la adición de una solución de detención. Se mide el color como absorbancia a la longitud de onda apropiada usando un espectrofotómetro. Se prepara una curva estándar a partir de diferentes concentraciones del antígeno, a partir de la cual pueden determinarse los valores de muestras desconocidos.

Otros tipos de ensayos en "sándwich" son los denominados ensayos "simultáneos" o "invertidos". Un ensayo simultáneo implica un único paso de incubación, ya que el anticuerpo unido al soporte sólido y el anticuerpo marcado

se unen ambos a la vez a la muestra que se está ensayando. Una vez se ha completado la incubación, se lava el soporte sólido para retirar el residuo de muestra de fluido y el anticuerpo marcado no complejo. La presencia de anticuerpo marcado asociado con el soporte sólido se determina a continuación como se haría en un ensayo sándwich “hacia adelante” convencional.

5 En el ensayo “invertido”, se utiliza la adición paso a paso de una solución de anticuerpo marcado a la muestra de fluido, seguida por la adición de anticuerpo sin marcar unido a un soporte sólido después de un período de incubación apropiado. Después de una segunda incubación, se lava la fase sólida de forma convencional para liberarla del residuo de la muestra que se está ensayando y de la solución de anticuerpo marcado sin reaccionar. La cantidad de anticuerpo
10 marcado asociado con un soporte sólido se determina a continuación como en los ensayos “simultáneos” y “hacia adelante”.

Los equipos que incluyen uno o más contenedores o viales que contienen los componentes para llevar a cabo los ensayos de la presente invención también se hallan dentro del ámbito de la invención. Tal equipo es una combinación
15 empaquetada de reactivos en cantidades predeterminadas, con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Por ejemplo, un equipo tal comprende un anticuerpo o anticuerpos, preferiblemente un par de anticuerpos contra el antígeno Dkk-5 que no compiten por el mismo sitio de unión sobre el antígeno. En una realización específica, la Dkk-5 podría pre-adsorberse sobre la matriz de fase sólida. El equipo contiene preferiblemente los otros reactivos de lavado necesarios, bien conocidos en la técnica. Para el EIA, el equipo contiene el sustrato cromogénico así como un reactivo
20 para detener la reacción enzimática cuando ha ocurrido el desarrollo del color. El sustrato incluido en el equipo es uno apropiado para el enzima conjugado con uno de las preparaciones de anticuerpo. Éstos son bien conocidos en la técnica, y más abajo se ilustran algunos. Opcionalmente, el equipo puede comprender también un estándar de Dkk-5; es decir, una cantidad de Dkk-5 purificada correspondiente a una cantidad normal de Dkk-5 en una muestra estándar.

25 Cuando el anticuerpo se marca con un enzima, el equipo incluirá los sustratos y cofactores requeridos por el enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, podrían incluirse otros aditivos, tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis), y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos podrían variarse ampliamente para proporcionar las concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente,
30 los reactivos podrían proporcionarse como polvos secos, usualmente liofilizados, incluyendo los excipientes, que en solución proporcionarían una solución de reactivo que tendrá la concentración apropiada.

En una realización específica, un equipo de diagnóstico para detectar la presencia o comienzo de un trastorno de resistencia a la insulina comprende; (1) un contenedor que comprende un anticuerpo que une la Dkk-5; (2) un
35 contenedor que comprende una muestra estándar que contiene la Dkk-5; y (3) instrucciones para usar el anticuerpo y muestra estándar para detectar el trastorno, en donde, o el anticuerpo que une la Dkk-5 está marcado detectablemente, o el equipo comprende además otro contenedor que contiene un segundo anticuerpo que está marcado detectablemente y une la Dkk-5 o al anticuerpo que se une a la Dkk-5. Preferiblemente, el anticuerpo que une la Dkk-5 es un anticuerpo monoclonal.
40

En otra realización específica, un equipo de la invención comprende en uno o más contenedores: (1) un portador de fase sólida, tal como una placa de microvaloración recubierta con un primer anticuerpo; (2) un segundo anticuerpo marcado detectablemente; y (3) una muestra estándar de la molécula Dkk-5 reconocida por el primer y segundo anticuerpos, así como las instrucciones apropiadas.
45

Examen usando animales transgénicos

Los animales no humanos, transgénicos, que sobre-expresan el cADN *dkk5* en células musculares pueden usarse para examinar drogas candidatas (proteínas, péptidos, polipéptidos, moléculas pequeñas, etc.) por su eficacia para
50 incrementar la eliminación de la glucosa de la sangre, indicando un tratamiento para un trastorno de resistencia a la insulina.

En una realización, los animales transgénicos se producen introduciendo el transgén *dkk5* en la línea germinal del animal no humano. Pueden usarse células diana embrionarias en varias etapas de desarrollo para introducir los trans-
55 genes. Se usan procedimientos diferentes dependiendo de la etapa de desarrollo de la célula diana embrionaria. La(s) línea(s) específica(s) de cualquier animal usado para practicar esta invención se seleccionan por su buena salud, buenos rendimientos embrionarios, buena visibilidad pronuclear en el embrión, y buena capacidad reproductora. Además, el haplotipo es un factor significativo. Por ejemplo, cuando se han de producir ratones transgénicos, a menudo se usan las cepas tales como C57BL/6 o FVB. La(s) línea(s) usada(s) para practicar esta invención podrían ser transgénicas por sí mismas, o podrían ser “knockouts” (es decir, obtenidas a partir de animales que tienen uno o más genes parcial o completamente suprimidos).
60

Las construcciones de transgén podrían introducirse en un embrión de etapa única. El cigoto es la mejor diana para la micro-inyección. El uso de cigotos como una diana para la transferencia de genes tiene una ventaja principal ya que
65 en la mayoría de los casos el ADN inyectado se incorporará en el gen del huésped antes del primer corte (Brinster *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4438-4442 (1985)). Como consecuencia, todas las células del animal transgénico serán portadoras del transgén incorporado. Esto se reflejará en general en la transmisión eficiente del transgén a las camadas del fundador, puesto que el 50% de las células germinales albergarán el transgén.

ES 2 304 210 B1

Normalmente, los embriones fertilizados se incuban en medio apropiado hasta la aparición del pronúcleo. Aproximadamente en ese momento, la secuencia de nucleótido que comprende el transgén se introduce en los pronúcleos de hembra o macho. En algunas especies, tales como los ratones, se prefiere el pronúcleo del macho. La material genético exógeno podría añadirse al complemento de ADN de macho del cigoto antes de ser procesado por el núcleo del *ovum* o el pronúcleo hembra del cigoto.

Por tanto, el material genético exógeno podría o añadirse al complemento del macho del ADN o a cualquier otro complemento del ADN antes de ser afectos por el pronúcleo de la hembra, lo cual es cuando los pronúcleos del macho y de la hembra están bien separados y ambos están ubicados cerca de la membrana celular. Alternativamente, el material genético exógeno podría añadirse al núcleo del esperma después de haberlo inducido a experimentar descondensación. El esperma conteniendo el material genético exógeno puede entonces añadirse al *ovum*, o el esperma descondensado podría añadirse al *ovum* añadiéndose a continuación las construcciones del transgén tan pronto como fuera posible.

Puede utilizarse cualquier técnica que permita la adición del material genético exógeno dentro del material genético nuclear, a condición de que no sea destructiva para la célula, membrana nuclear, u otras estructuras genéticas o celulares existentes. La introducción de la secuencia de nucleótidos del transgén en el embrión podría conseguirse mediante cualquier procedimientos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, microinyección, electroporación, o lipofección. El material genético exógeno se inserta preferentemente en el material genético nuclear mediante microinyección. La microinyección de células y estructuras celulares es conocida y se usa en la técnica. En el ratón, el pronúcleo del macho alcanza un tamaño de aproximadamente 20 micrómetros de diámetro, lo que permite la inyección reproducible de 1-2 pl de solución de ADN. A continuación de introducirla secuencia de nucleótidos del transgén en el embrión, el embrión podría incubarse *in vitro* durante diferentes intervalos de tiempo, o reimplantarse en el huésped sustituto, o ambos. La incubación *in vivo* hasta la madurez se halla dentro del ámbito de esta invención. Un procedimiento común es incubar el embrión *in vitro* durante aproximadamente 1-7 días, dependiendo de la especie, y reimplantarlo a continuación en el huésped sustituto.

El número de copias de las construcciones del transgén que se añaden al cigoto dependen de la cantidad total de material genético exógeno añadido, y será la cantidad que permite que ocurra la transformación del material genético. Teóricamente sólo se requiere una copia; no obstante, generalmente se utilizan numerosas copias, por ejemplo, 1000-20.000 copias de la construcción del transgén, para asegurarse de que una copia es funcional. En relación a la presente invención, podrían ser una ventaja tener más de una copia en funcionamiento de la secuencia de ADN exógeno introducido para potenciar la expresión fenotípica del mismo.

La camada transgénica del huésped sustituto podría examinarse en busca de la presencia y/o expresión del transgén mediante cualquier procedimiento apropiado. El examen se realiza a menudo mediante análisis de transferencia Southern o transferencia Northern, usando una sonda que es complementaria de al menos una porción del transgén. El análisis de transferencia Western usando un anticuerpo contra la Dkk-5 codificada por el transgén podría emplearse como una alternativa o procedimiento adicional para examinar en busca de la presencia del producto del transgén. Típicamente, se prepara ADN a partir del tejido de la cola, y se analiza mediante análisis de Southern o PCR en busca del transgén. Alternativamente, los tejidos o células que se cree expresan el transgén con los niveles más elevados se ensayan en busca de la presencia y expresión del transgén usando el análisis de Southern o PCR, aunque, para este análisis, podría usarse cualquier tipo de tejidos o células.

Los procedimientos alternativos o adicionales para evaluar la presencia del transgén incluyen, sin limitación, los ensayos bioquímicos apropiados, tales como los ensayos enzimáticos y/o inmunológicos, las tinciones histológicas de un marcador particular o de actividades enzimáticas, el análisis mediante citometría de flujo, y similares. Los análisis de sangre también podrían ser útiles para detectar la presencia del producto del transgén en la sangre, así como para evaluar el efecto del transgén sobre los niveles de constituyentes de la sangre, tales como la glucosa.

La progenie de los animales transgénicos podría obtenerse emparejando el animal transgénico con una pareja apropiada, o mediante fertilización *in vitro* de óvulos y/o esperma obtenido del animal transgénico. Cuando debe realizarse el emparejamiento con una pareja, la pareja podría ser o no transgénica y/o “knockout”; cuando sea transgénica podrá contener el mismo o diferente transgén, o ambos. Alternativamente, la pareja podría ser una línea progenitora. Cuando se usa la fertilización *in vitro*, el embrión fertilizado podría implantarse en un huésped sustituto o incubarse *in vitro*, o ambos. Usando uno de los dos procedimientos, la progenie podría evaluarse según la presencia del transgén usando procedimientos descritos más arriba, u otros procedimientos apropiados.

Los animales transgénicos producidos de acuerdo con esta invención incluirán material genético exógeno, es decir, una secuencia de ADN que resulta en la producción de la Dkk-5. La secuencia estará operativamente unida a un elemento de control transcripcional, por ejemplo, un promotor, el cual preferiblemente permite la expresión de la producción del transgén en un tipo de célula específico. El más preferido de tales elementos de control en ésta es un promotor específico del músculo que permita la sobreexpresión del cADN del *dkk5* en el tejido muscular. Un ejemplo de tal promotor es el promotor de la cadena ligera (Shani, *Nature* 314:283-286 (1985)), o el que dirige la expresión de la “smoothelina” A o B, o promotores similares, tal como se describe, por ejemplo, en WO-01/18.048, publicada el 15 de marzo de 2001.

También puede usarse la infección retroviral para introducir el transgén en un animal no humano. El embrión no humano en desarrollo puede cultivarse *in vitro* hasta el estado de blastocito. Durante este período, los blastómeros

pueden ser dianas para la infección retroviral (Jaenich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:1260-1264 (1976)). La eficiente infección de los blastómeros se obtiene mediante tratamiento enzimático para retirar la zona pelúcida (*Manipulating the Mouse Embryo*, Ed. Hoogan, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)). El sistema de vector viral usado para introducir el transgén es típicamente un retrovirus de replicación defectuosa, portador del transgén (Jahner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6927-6931 (1985); Van der Putten *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6148-6152 (1985)). La transfección puede obtenerse fácil y eficientemente cultivando los blastómeros sobre una monocapa de células productoras del virus (Van der Putten *et al.*, ver más arriba; Stewart *et al.*, *EMBO J.* 6:383-388 (1987)). Alternativamente, la infección puede realizarse en una etapa posterior. El virus o células productoras de virus pueden inyectarse en el blastocelo (Jahner *et al.*, *Nature* 298:623-628 (1982)). La mayoría de los fundadores serán mosaicos para el transgén, puesto que la incorporación sólo ocurre en un subconjunto de las células que formaban el animal no humano transgénico. Más aún, el fundador podría contener varias inserciones retrovirales del transgén en diferentes posiciones del genoma, que generalmente se segregarán en su descendencia. Además, también es posible introducir transgenes en la línea germinal mediante infección retrovirales intrauterina del embrión a mitad de la gestación (Jahner *et al.* (1982), ver más arriba).

Un tercer tipo de célula diana para la introducción del transgén es la célula madre embrionaria (ES). Las células ES se obtienen a partir de embriones previos a la implantación cultivados *in vitro* y fusionados con embriones (Evans *et al.*, *Nature* 292:154-156 (1981); Bradley *et al.*, *Nature* 309:255-258 (1984); Gossler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9065-9069 (1986); Robertson *et al.*, *Nature* 322:445-448 (1986)). Los transgenes pueden introducirse eficientemente en las células ES mediante transfección del ADN o mediante transducción mediada por retrovirus. Tales células ES transformadas pueden a continuación combinarse con blastocitos de un animal no humano. A continuación las células ES colonizan el embrión y contribuyen a la línea germinal del animal quimérico resultante. Para una revisión, consultar Jaenisch, *Science* 240:1468-1474 (1988).

Las drogas candidatas se examinan por su capacidad para tratar un trastorno de resistencia a la insulina proporcionándoselas a tales animales (mediante, por ejemplo, inhalación, ingestión, inyección, implantación, etc.) en una cantidad apropiada que puedan medirse la eliminación de la glucosa o el potencial de captación. La eliminación o captación incrementadas de la glucosa serían indicativas de la capacidad de la droga para tratar la diabetes y otros trastornos de resistencia a la insulina.

Terapia génica con la Dkk-5

La Dkk-5 puede usarse en la terapia génica para tratar la diabetes. Pueden adoptarse varias estrategias, tales como la terapia génica cutánea o la terapia génica con vector retroviral, para corregir la deficiencia en leptina, la cual produce un fenotipo de tejido adiposo reducido y resistencia a la insulina, así como una obesidad congénita y diabetes en los humanos (Larcher *et al.*, *FASEB J.* 15:1529-1538 (2001)). Otro procedimiento, para restaurar la sensibilidad a la insulina a través de la terapia génica, es usar la terapia génica mediada por adenovirus tal como se describe en Ueki *et al.*, *J. Clin. Invest.* 105:1437-1445 (2000). Un procedimiento ulterior es usar la terapia génica para contrarrestar la hiperglicemia diabética manipulando el músculo esquelético para que exprese el ADN que codifica la Dkk-5, tal como se describe en Otaegui *et al.*, *Human Gene Therapy* 11:1543-1552 (2000).

Los siguientes Ejemplos se exponen para asistir en la comprensión de la invención y no deberían, por supuesto, considerarse como específicamente limitantes de la invención descrita y reivindicada en ésta. Tales variaciones de la invención que deberían hallarse dentro del alcance de los especialistas en la técnica, incluyendo la sustitución de todos los equivalente ahora conocidos o desarrollados más tarde, debe considerarse que se hallan dentro del ámbito de la invención tal como se reivindica en ésta. Los descubrimientos de todas las citas en ésta se incorporan por referencia.

Ejemplo 1

Efectos de la Dkk-5

Materiales y procedimientos

Cultivo de las células L6

Los mioblastos L6 se proliferaron en medio de cultivo, compuesto por MEM-alfa (Gibco-BRL) con el 10% de suero fetal bovino. Antes de alcanzar la confluencia, se dispersaron las células con tripsina y se sembraron de nuevo en medio de cultivo nuevo. Se indujo la fusión de mioblastos cambiando el medio a medio de diferenciación en la confluencia (MEM-alfa con el 2% de suero fetal bovino). Se cultivaron las células en este medio durante 3-9 días y, para tratamientos más largos de 28 horas, se añadió Dkk-5 a este medio. Los tratamientos más cortos de 28 horas se realizaron en MEM-alfa con el 0,5% de suero fetal bovino (FBS).

Expresión de la Dkk-5 recombinante

La homóloga humana de la Dkk-5 (hDKK-5) (ver SEC. N° ID: 5 de la Figura 2 en ésta) se expresó en células de insecto infectadas con baculovirus como una fusión C-terminal de la marca 8X His, y se purificó mediante cromato-

ES 2 304 210 B1

grafía en columna de afinidad de níquel (WO-01/40.465 y WO-01/16.319). La identidad de la proteína purificada se verificó mediante análisis de la secuencia N-terminal. La proteína purificada fue menos de 0,3 EU/ml de niveles de endotoxina.

5

Captación de la DOG

Se incubaron células control y células tratadas con Dkk-5 en tampón Krebs-Ringer fosfato-HEPES (KRHB) (NaCl 130 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,3 mM, MgSO₄ 1,3 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, y HEPES 25 mM, pH 7,4) conteniendo 0,5 μ Ci de 2-deoxi[¹⁴C]glucosa, en presencia o ausencia de 0,5 μ M de insulina, durante 20 minutos, a 37°C. Las células se lavaron dos veces con KRHB y se lisaron en NaOH 100 mM, y la cantidad de 2-deoxi[¹⁴C]glucosa intracelular se midió mediante recuento del centelleo líquido (LSC).

15

Síntesis de glucógeno

La síntesis de glucógeno se determinó mediante la incorporación de [¹⁴C]glucosa en el glucógeno. Se incubaron durante 2 horas células L6 control y tratadas con Dkk-5, en medio MEM-alfa carente de suero que contenía [U-¹⁴C]glucosa (glucosa 5 mM; 1,25 μ Ci/ml), con o sin insulina 0,5 μ M. El experimento se terminó retirando el medio y lavando rápidamente las células tres veces con PBS enfriado en hielo, y lisándolas con KOH al 20% (p/v), el cual se neutralizó transcurrida 1 hora mediante la adición de HCl 1 M. Los lisados se hirvieron durante 5 minutos y se clarificaron mediante centrifugación, y el glucógeno celular en el sobrenadante se precipitó con isopropanol, a 0°C, durante 2 horas, usando 1 mg/ml de glucógeno “frío” como portador. El glucógeno precipitado se separó mediante centrifugación, se lavó con etanol al 70%, y se redisolvió en agua, y la incorporación de la [¹⁴C]glucosa en el glucógeno se determinó mediante LSC.

Incorporación de la glucosa en lípidos

Se incubaron adipocitos 3T3 L1 control y tratados con D-[U-¹⁴C]glucosa (0,2 μ Ci/ml) en MEM-alfa carente de suero, durante 2 horas, a 37°C, en presencia o ausencia de insulina 0,5 μ M. Se lavaron las células dos veces con PBS enfriado en hielo, y se lisaron con NaOH 100 mM. Los lisados se neutralizaron con ácido clorhídrico 100 mM. Los lípidos celulares en los lisados se extrajeron en *n*-heptano, y la incorporación de la [¹⁴C]glucosa en los lípidos extraídos se determinó mediante LSC.

35

PCR cuantitativa en tiempo real

La RTQ-PCR se realizó usando un Sistema de Detección de Secuencia y programa ABI PRISM 7700TM (PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA), tal como se describe en Gibson *et al.*, *Genome Res.* 6:995-1001 (1996) y Heid *et al.* *Genome Res.* 6:986-994 (1996).

Análisis

45

A menos que se indique lo contrario, todos los datos se presentan como la media, más y menos las desviaciones estándares. Las comparaciones entre las células control y tratadas, y entre los ratones transgénicos y del tipo salvaje se hicieron usando un test *t* de Student no emparejado.

50

Cultivo de los adipocitos 3T3/L1

Los fibroblastos 3T3/L1 se cultivaron hasta su confluencia y se diferenciaron a adipocitos (Rubin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 253:7570-7578 (1978)). Las células diferenciadas se trataron con Dkk-5 a las 72 horas después de la inducción de la diferenciación.

55

Animales

Todos los protocolos fueron aprobados por un Comité Institucional de Uso y Cuidado. A menos que se indique lo contrario, los ratones se mantuvieron con comida de laboratorio estándar, en un entorno con temperatura y humedad controladas. Se usó un ciclo de luz de 12 horas (6:00 PM/6:00 AM).

Ratones transgénicos

65

El cADN del *dkk5* humano se ligó 3' respecto el sitio donante/aceptor de empalme del pRK, el cual está precedido por el promotor de la cadena ligera de la miosina (Shani, *Nature* 314:283-286 (1985)). El cADN del *dkk5* estaba

ES 2 304 210 B1

seguido por los sitios donantes/aceptores de empalmes presentes entre los exones cuarto y quinto del gen de la hormona del crecimiento (Stewart *et al.*, *Endocrinology* 130:405-414 (1992)). El fragmento de expresión entero se purificó libre de secuencias vector contaminantes, y se inyectó en ovocitos de ratón de una célula derivados de emparejamientos FVB × FVB. Los ratones transgénicos se identificaron mediante análisis de PCR del ADN extraído de las biopsias de las colas.

Resultados

La Dkk-5 es una proteína secretada que está altamente relacionada con la familia dickkopf de proteínas. Ver las Figuras 1 y 2. Usando un mapado híbrido de radiación, se localizó el gen de la Dkk-5 en el cromosoma 1, entre DIS434 (32,2 cM) y DIS2843 (48,8 cM) por parte de los presentes inventores. Esta ubicación fue confirmada por los datos procedentes de otros esfuerzos de secuenciación, según se determinó mediante análisis con BLAST de las bases de datos de secuencias públicas (ver más abajo).

HS330012, *Homo sapiens*, Cromosoma 1, Clon RP3-330012, mapa p. 36.11-36.23,

SECUENCIACIÓN EN MARCHA, en piezas ordenadas, 119.969 p.b., DNA, HTG 28-JUN-2001

Nº DE ACCESO AL031731

VERSIÓN AL031731.36 GI:14575526

FUENTE humano

ORGANISMO *Homo sapiens*

REFERENCIA 1 (bases 1 a 119969)

AUTORES Martin, S.

TÍTULO Envío directo

REVISTA Enviado (26-JUN-2001), Sanger Centre, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SA, R.U.

COMENTARIO El 28 de junio de 2001, esta versión de la secuencia reemplazó la gi:14422201.

Se halló que la Dkk-5 estaba ampliamente expresada en los tejidos humanos adultos, tal como se muestra en la Figura 3. Esto se determinó mediante PCR cuantitativa en tiempo real, tal como se describió más arriba.

La Dkk-5 se expresó diferencialmente durante el desarrollo embrionario del ratón. El análisis de RT-PCR cuantitativa en tiempo real de los embriones de ratón reveló que la expresión de la Dkk-5 se inicia el día 10 p.c. y continúa hasta el día 16 p.c., con el pico en el día 12 p.c. Ver la Figura 4. El análisis de hibridación *in situ* de los embriones completos mostró que esta expresión se halla en la unión del cerebro medio-cerebro posterior y a lo largo de la placa dorsal, una región importante en la especificación del desarrollo del mesodermo. Ver la Figura 5.

Los resultados muestran que la expresión de la Dkk-5 estaba regulada durante la diferenciación de las células musculares L6. Los niveles del transcrito, tal como se midieron mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real, empezaron a incrementar el día 3 de la diferenciación y empezaron a declinar hacia el día 7 de la diferenciación. Ver la Figura 6, la cual muestra el nivel de expresión relativo de la Dkk-5 durante la diferenciación de las células L6, desde el día 1 hasta el día 8. Este patrón de expresión se corresponde con el período de tiempo durante el cual las células L6 responden a la Dkk-5, y también al período durante el cual es detectable la unión de la Dkk-5 a las células L6.

Cuando se expresó en células de insecto infectadas con baculovirus, la proteína de Dkk-5 de longitud completa se cortó internamente para obtener tres productos de corte que oscilaban desde los 16 kDa hasta los 20 kDa de tamaño. En el gel mostrado en la Figura 7, la banda "b" corresponde a la proteína de longitud completa. La secuencia N-terminal de la proteína de longitud completa, incluyendo la secuencia de señal, es MAGPAIHTAPML (SEC. Nº ID.: 6). La proteína madura empieza en GALAPGTP (SEC. Nº ID.: 7), de forma que el sitio de corte del péptido señal está entre la alanina en la posición 24 y la glicina en la posición 25 en la SEC. Nº ID.: 5. Las bandas agrupadas como "a" corresponden a las proteínas cortadas internamente, toda con las secuencia N-terminal MALFDWTDYEDLK (SEC. Nº ID.: 8). La proteína forma dímeros (banda "c", carril 1 de la Figura 7), los cuales se convierten a la forma monomérica en condiciones reductoras. La proteína cortada de 16 kDa, después de purificarla extensamente (hasta aproximadamente el 90% de pureza), a partir de la preparación de Dkk-5 de longitud completa producida de forma recombinante, mediante cromatografía de intercambio aniónico usando una columna de la marca MONO-Q™, potenció la captación,

ES 2 304 210 B1

basal y estimulada por insulina, de la glucosa en células musculares. La Dkk-5 mencionada en los experimentos de más adelante fue una preparación caracterizada como una mezcla de la proteína de longitud completa y cortada internamente, conteniendo aproximadamente el 5% de proteína cortada.

5 El fragmento de proteína cortada podría purificarse de la proteína recombinante de longitud completa, y de cualesquiera otras proteínas no deseadas, por medio de cualquier técnica clásica de la química de proteínas, no limitada a la cromatografía de intercambio iónico. Además, podrían expresarse grandes cantidades de la proteína Dkk-5 de longitud completa con proteólisis limitada, para obtener mayoritariamente material cortado; el sitio Arg-Arg en la molécula también podría cortarse, y el producto del corte deseado resultante podría purificarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño u otras técnicas convencionales de purificación de proteínas, bien conocidas por los especialistas en la técnica.

15 El tratamiento de las células musculares L6 con la Dkk-5 resultó en una captación incrementada de la glucosa (2-DOG). Ver la Figura 8. El efecto de la Dkk-5 puede observarse dentro de las 48 horas (Figura 8A) y depende del estado de diferenciación de las células. Los efectos del tratamiento con la Dkk-5 sobre el incremento en la captación de glucosa dependiente de insulina son más significativos a las 96 horas ($p = 0,001$) (Figura 8B), aunque el efecto se observa incluso a las 48 horas ($p = 0,05$).

20 El tratamiento de las células musculares L6 con la Dkk-5 resultó en una incorporación incrementada de la glucosa en el glucógeno. Ver la Figura 9. Tal como se muestra en la Figura 9A, los efectos de la Dkk-5 pueden observarse en 48 horas ($p = 0,003$), y, sin estar limitados por teoría alguna, esta acción podría estar mediada a través de la regulación de la actividad de la Akt y/o de la GSK-3 β , ambas de las cuales son intermediarias en las vías de señalización de la insulina y Wnt.

25 La Dkk-5 afectó la miogénesis en las células L6. Puesto que los efectos de la Dkk-5 se observaron a continuación de tratamientos largos, es posible, sin estar limitados por teoría alguna, que la proteína actúe afectando la diferenciación de las células L6. Se realizó el análisis de RT-PCR usando la PCR TAQMANTM para determinar los niveles de expresión de los genes implicados en la miogénesis, tales como el de la cadena pesada de la miosina (MHC), el de la cadena ligera de la miosina (MLC), el de la miogenina, el Pax3, el Myf5, y el MyoD, en células L6 tratadas con Dkk-5. Las Figuras 10A-G muestran que el tratamiento con la Dkk-5 resultó en la expresión alterada de la miogenina y del MyoD entre los días 4 y 6 de diferenciación, y del MLC2, Myf5, y Pax3 entre los días 2 y 4 de diferenciación.

30 La Dkk-5 reguló la expresión de genes en la vía de señalización de la insulina en células musculares. Se realizó el análisis RT-PCR (TAQMANTM) para determinar si la Dkk-5 afectaba los niveles de expresión de genes implicados en el metabolismo de la glucosa. Tal como se muestra en la Figura 11, el tratamiento con la Dkk-5 incrementó la expresión de la Akt (2 veces), de la sintasa de glucógeno (4 veces), y de la IRS-1 (2 veces) después de 96 horas, y disminuyó la expresión de la IRS-2 (0,2 veces después de 48 horas de tratamiento) y de la Glut-1 y PDK-1 (después de 96 horas).

40 Usando análisis FACS con anticuerpos policlonales contra la Dkk-5 y anticuerpos monoclonales contra la marca del epítipo His 8, se demostró que la Dkk-5 se une a las células L6 desde el día 2 hasta el día 5 de la diferenciación, pero esta unión disminuye/se pierde hacia el día 6. La unión de la Dkk-5 puede suprimirse desnaturalizando la proteína, puede eliminarse mediante competición usando un exceso de Dkk-5 marcada con Fc, y no se ve afectada por un exceso de proteína no relacionada marcada con His, sugiriendo que es una interacción específica. Ver la Figura 12. Por tanto, la Dkk-5 tiene un receptor específico sobre la superficie de las células musculares. La proteína relacionada Dkk-1 se une a la LRP6, y, sin estar limitados por teoría alguna, es probable que la Dkk-5 pudiera actuar también a través de este receptor. Los presentes inventores hallaron que estos receptores se expresaban sobre la superficie de las células L6, y otros hallaron que se expresaban en el músculo normal de ratones y humanos (Hey *et al.*, *Gene* 216:103-111 (1998); Brown *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248:879-888 (1998)).

50 El tratamiento con la Dkk-5 disminuyó la captación basal y estimulada por insulina de glucosa en adipocitos. Específicamente, las células 3T3 L1 tratadas con Dkk-5 mostraron un incremento en los niveles de captación basal y estimulada por insulina de la glucosa (Figuras 13A y 13B), así como una incorporación incrementada de glucosa en los lípidos a continuación de la estimulación con insulina (Figuras 14A y 14B). El incremento en la captación de glucosa dependiente de insulina observado después de 48 horas de tratamiento fue más pronunciado a continuación de 96 horas de tratamiento, y se observó una observación similar con la incorporación dependiente de insulina de la glucosa en lípidos.

60 Los efectos de la Dkk-5 *in vivo* se determinaron analizando el metabolismo de la glucosa de ratones transgénicos que expresaban el cADN de la Dkk-5 bajo el control de un promotor específico de músculo (Shani, ver más arriba). Los resultados preliminares mostraron que estos animales transgénicos concretos no tenían ningún metabolismo de la glucosa alterado. Sin estar limitados por teoría alguna, estos resultados podrían deberse a una baja expresión, corte incorrecto o ausente de la proteína en estos animales, o ausencia de secreción de la proteína desde las células musculares hacia las células vecinas, explicando de este modo la ausencia de cualesquier efectos visibles sobre el metabolismo de la glucosa. Usando un promotor diferente u otro sistema de expresión, tal como un sitio donante/aceptor de empalmes diferente en uno de los dos extremos del ADN del *dkk5* se espera obtener una expresión mayor. Además, la expresión del cADN que codifica sólo un producto de corte activo de la Dkk-5, tal como el producto del corte interno de 16 kDa, usando codones de inicio apropiados y otros elementos en la construcción de expresión, tal como sería evidente

a un especialista capacitado, permitiría la determinación de sus efectos sobre el metabolismo de la glucosa en estos animales transgénicos.

5 Resumen y Discusión

La Dkk-5 tuvo efectos distintos sobre la captación de glucosa en células musculares y en adipocitos. Las células musculares tratadas con la Dkk-5 fueron más sensibles al tratamiento con insulina. En las células musculares, el tratamiento con la Dkk-5 estimuló un pequeño incremento en la incorporación de glucosa en glucógeno, y, sin estar limitados por teoría alguna, esto podría deberse a sus efectos sobre los niveles de expresión de la sintasa de glucógeno. La Dkk-5 también podría ejercer sus efectos sobre el metabolismo de la glucosa en el músculo afectando los niveles de expresión de proteínas en la vía de señalización de la insulina. Adicionalmente, es probable que la Dkk-5 afecte también la actividad de proteínas en la vía de señalización de la insulina y/o regule la translocación del transportador de glucosa inducible por la insulina (GLUT-4) en las células L6.

En los adipocitos, el tratamiento con la Dkk-5 incrementó tanto la captación basal y estimulada por insulina de glucosa, como la incorporación de glucosa en los lípidos, a continuación de 96 horas de tratamiento. La captación de glucosa y la acumulación en los adipocitos dependen del estado de diferenciación de las células, y la diferenciación de los adipocitos está regulada por la señalización de la Wnt. Se espera que los ratones sobreexpresando la Dkk-5 activa tengan una tolerancia a la glucosa potenciada.

Conclusión

La Dkk-5 afectó el metabolismo de la glucosa en las células musculares L6, y se espera que haga lo mismo en ratones transgénicos que sobreexpresen la proteína en el músculo usando un sistema de expresión similar al de más arriba. Se espera que el uso de preparaciones inyectadas de proteína Dkk-5 recombinante, tal como se detallan en el gel de la Figura 7, que contienen ambas, la proteína de longitud completa y la porción de 16 kDa de la misma, o la porción de 16 kDa inyectada sola, sirva para tratar la resistencia a la insulina en mamíferos. El tratamiento de células musculares con la Dkk-5 (ambas, de longitud completa y el producto de 16 kDa de la cortada internamente) resulte en un incremento en la captación basal y estimulada por insulina de la glucosa. Este efecto se observó a continuación de un tratamiento de larga duración, sugiriendo, sin estar limitados por teoría alguna, que la Dkk-5 podría afectar la diferenciación muscular y tanto la actividad como los niveles de expresión de proteínas en la vía de señalización de la insulina. Las observaciones anteriores demuestran que la Dkk-5 induce la sensibilidad a la insulina. La resistencia a la insulina es una característica clave de la mayoría de formas de la NIDDM. Por tanto, la Dkk-5 sería útil en el tratamiento de los trastornos de resistencia a la insulina, y la Dkk-5 es útil como un marcador de diagnóstico en los ensayos de tales condiciones. También se espera que la Dkk-5 inhiba la progresión del fenotipo de la diabetes en modelos de animales transgénicos, tal como se descubre, por ejemplo, en la patente estadounidense n° 6.187.991, y que sea útil tanto para identificar nuevas drogas para tratar los trastornos de resistencia a la insulina, como en la terapia génica usando las técnicas detalladas en Larcher *et al.*, ver más arriba, Ueki *et al.*, ver más arriba, y Otaegui *et al.*, ver más arriba.

Ejemplo 2

45 Desarrollo de anticuerpos monoclonales anti-Dkk-5

Se hiperinmunizaron cinco ratones Balb/c hembra (Charles River Laboratories, Wilmington, DE) con Dkk-5 humana marcada con polihistidina (HISS) y recombinante, expresada en células de insecto infectadas por baculovirus (preparadas tal como se referencia en el Ejemplo 1), y diluidas en adyuvante RIBI™ (Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO). Los animales se inmunizaron dos veces por semana, usándose 50 µl por cada animal, administrados a través de la planta del pie. Después de cinco inyecciones, las células-B procedentes de los nodos linfáticos de los cinco ratones, que presentaban títulos elevados de anticuerpo anti-Dkk5, se fusionaron con células de mieloma de ratón (X63.Ag8.653; American Type Culture Collection, Manassas, VA) usando los protocolos descritos en Kohler y Milstein, ver más arriba; y Hongo *et al.*, *Hybridoma* 14:253-260 (1995). Transcurridos 10-14 días, se recolectaron los sobrenadantes y se examinaron en busca de producción de anticuerpos mediante ELISA directo. Siete clones positivos, que presentaban la inmunounión más elevada después de la segunda ronda de subclonación mediante dilución limitada, se inyectaron en ratones cebados con PRISTANE™ (Freund y Blair, *J. Immunol.* 129:2826-2830 (1982)) para la producción *in vivo* de anticuerpos monoclonales. Los fluidos ascíticos se juntaron y purificaron mediante cromatografía de afinidad con Proteína-A (cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) PHARMACIA™; Pharmacia, Uppsala, Suecia) tal como se describe en Hongo *et al.*, ver más arriba. Las preparaciones de anticuerpos purificados se esterilizaron mediante filtración (0,2 µm de diámetro de poro; Nalgene, Rochester, NY) y se almacenaron a 4°C en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Estos anticuerpos, preparados a partir de hibridomas detallados más adelante, pueden usarse en los procedimientos de diagnóstico detallados en ésta usando las técnicas descritas más arriba.

ES 2 304 210 B1

Depósito de material

Los siguientes materiales se han depositado en el American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. (ATCC):

5

<u>Denominación</u>	<u>N° Dep. ATCC</u>	<u>Fecha dep.</u>
DKK5.MAB3060.7A9.1A1.2G5	PTA-3090	21-feb-2001
DKK5.MAB3058.13E10.1G4.2B8	PTA-3091	21-feb-2001
DKK5.MAB3059.3A4.1B10.1G8	PTA-3092	21-feb-2001
DKK5.MAB3057.6C5.2C2.2E3	PTA-3093	21-feb-2001
DKK5.MAB3063.11A8.2F1.2B8	PTA-3094	21-feb-2001
DKK5.MAB3061.11H3.2F6.1E3	PTA-3095	21-feb-2001
DKK5.MAB3056.7H4.1H6.2B3	PTA-3096	21-feb-2001

10

15

20

Este depósito se realizó de acuerdo con las estipulaciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para el Propósito de Tramitación de Patente y las Regulaciones en el mismo (Tratado de Budapest). Este garantiza el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito lo hará disponible la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y estará sometido a un acuerdo entre Genentech, Inc. y la ATCC, el cual asegura una disponibilidad permanente y no restringida de la progenie del cultivo del depósito al público, a partir de la concesión de la pertinente patente estadounidense o a partir de la exposición al público de la solicitud de patente estadounidense o extranjera, lo que sea que acontece primero, y garantiza la disponibilidad de la progenie a alguien, determinado por el Comisionado de Patentes y Marcas Comerciales de los Estados Unidos, como autorizado a la misma, de acuerdo con la USC 35, sección 122, y las reglas del Comisionado conformes a los mismo (incluyendo la CFR 37, sección 1.14, con particular referencia a la 886 OG 638).

25

30

El cesionario de la de presente solicitud ha accedido a que, si un cultivo de los materiales en depósito muriera o se perdiera o fuera destruido estando cultivado en las condiciones apropiadas, los materiales serán reemplazados prontamente con otros iguales. La disponibilidad de los materiales depositados no debe considerarse como una licencia para practicar la invención contraviniendo los derechos garantizados, bajo la autoridad de cualquier gobierno, de acuerdo con sus leyes sobre patentes.

35

40

45

50

55

La especificación escrita precedente se considera que es suficiente para que un especialista en la técnica practique la invención. La presente invención no debe limitarse en su ámbito por las construcciones depositadas, puesto que las realizaciones depositadas se pretende que sean una sencilla ilustración de ciertos aspectos de la invención, y cualesquiera construcciones que sean funcionalmente equivalentes se hallan dentro del ámbito de la invención. El depósito de material en ésta no constituye una aceptación de que la descripción escrita contenida en ésta es inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni debe considerarse como limitante del ámbito de las reivindicaciones de las ilustraciones específicas que representa. Más aún, varias modificaciones de la invención, además de aquéllas mostradas y descritas en ésta, serán evidentes a los especialistas en la técnica a partir de las descripciones precedentes, y se hallan dentro del ámbito de las reivindicaciones anexas.

Los principios, realizaciones preferidas, y modos de operación de la presente invención se han descrito en la especificación precedente. No obstante, la invención que se pretende proteger en ésta no debe considerarse que está limitada por las formas concretas descubiertas, puesto que deben considerarse como ilustrativas en vez de restrictivas. Podrían hacerse variaciones y cambios, realizados por los especialistas en las técnica, sin apartarse del espíritu de la invención.

60

65

ES 2 304 210 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de una composición que comprende Dkk-5 y un agente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la resistencia a la insulina.
2. Utilización de la reivindicación 1 en donde el agente es insulina, el IGF-1, o una sulfonilurea.
3. Procedimiento para detectar la presencia o aparición de un trastorno de resistencia a insulina en un mamífero, que comprende los pasos de:
- 10 (a) medir la cantidad de Dickkopf-5 (Dkk-5) en una muestra obtenida de dicho mamífero; y
- 15 (b) comparar la cantidad determinada en el paso (a) con una cantidad de Dkk-5 presente en una muestra control, siendo indicativo de un trastorno de resistencia a la insulina un nivel disminuido de la cantidad de Dkk-5 en la muestra obtenida de dicho mamífero comparada con la muestra control.
4. Procedimiento de la reivindicación 3, en donde la medición se lleva a cabo utilizando un anticuerpo anti-Dkk-5 en un inmunoensayo.
- 20 5. Procedimiento de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo anti-Dkk-5 comprende una marca.
6. Procedimiento de la reivindicación 5, en donde la marca se selecciona de entre el grupo que consiste en una marca fluorescente, una marca radiactiva, o una marca enzimática.
- 25 7. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 3- 6, en donde el trastorno de resistencia a insulina es la diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM) o la obesidad.
- 30 8. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 3- 7, en donde la Dkk-5 comprende:
- a) la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 5;
- 35 b) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5 que comienza en cualquiera de los residuos 20 hasta el residuo 30 y que finaliza en el residuo 347;
- c) una secuencia aminoacídica de SEC ID N°: 5 que comienza en los residuos 20, 25 ó 30 y que finaliza en el residuo 347;
- 40 d) un fragmento proteico del corte interno de la SEC. N° ID.: 5, que tiene una secuencia N-terminal MALFDWTD-YEDLK (SEC. N° ID.: 8); o
- e) una combinación de dicho producto de corte y al menos uno de:
- 45 i) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 5;
- ii) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5 que comienza en cualquiera de los residuos 20 hasta el residuo 30 y que finaliza en el residuo 347; o
- 50 iii) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5 que comienza en cualquiera de los residuos 20, 25 ó 30 y que finaliza en el residuo 347.
9. Equipo de diagnóstico para detectar la presencia o aparición de un trastorno de resistencia a insulina, comprendiendo dicho equipo:
- 55 (a) un contenedor que comprende un anticuerpo que se une a la Dickkopf-5 (Dkk-5);
- (b) un contenedor que comprende una muestra control que contiene la Dkk-5; y
- 60 (c) instrucciones para utilizar el anticuerpo y la muestra control para detectar el trastorno, en donde, o el anticuerpo que se une a la Dkk-5 está marcado de manera detectable, o el equipo comprende otro contenedor que contiene un segundo anticuerpo que está marcado de manera detectable y que se une a la Dkk-5 o al anticuerpo que se une a la Dkk-5.
- 65 10. Equipo de la reivindicación 9, en donde el anticuerpo que une la Dkk-5 es un anticuerpo monoclonal.

ES 2 304 210 B1

11. Equipo de la reivindicación 9 ó 10, en donde la Dkk-5 comprende:

a) la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5;

5 b) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5 que comienza en cualquiera de los residuos 20 hasta el residuo 30 y que finaliza en el residuo 347;

c) una secuencia aminoacídica de SEC ID N°: 5 que comienza en los residuos 20, 25 ó 30 y que finaliza en el residuo 347;

10 d) un fragmento proteico del corte interno de la SEC. N° ID.: 5, que tiene una secuencia N-terminal MALFDWTD-YEDLK (SEC. N° ID.: 8); o

e) una combinación de dicho producto de corte y al menos uno de:

15 i) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5;

ii) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5 que comienza en cualquiera de los residuos 20 hasta el residuo 30 y que finaliza en el residuo 347; o

20 iii) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5 que comienza en cualquiera de los residuos 20, 25 ó 30 y que finaliza en el residuo 347.

25 12. Equipo para tratar un trastorno de resistencia a la insulina, comprendiendo dicho equipo:

(a) un contenedor que comprende la Dkk-5; y

30 (b) instrucciones para usar la Dkk-5 para tratar el trastorno.

13. Equipo de la reivindicación 12 en donde el trastorno es la diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM) o la obesidad.

35 14. Equipo de la reivindicación 12 ó 13, en donde el contenedor es un vial y las instrucciones especifican que se colocan los contenidos del vial en una jeringa para su inyección inmediata.

40 15. Equipo de cualquiera de las reivindicaciones 12-14 que comprende además un contenedor que comprende un agente para el tratamiento de la resistencia a insulina.

16. Equipo de cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en donde la Dkk-5 comprende:

a) la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 5; o

45 b) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5 que comienza en cualquiera de los residuos 20 hasta el residuo 30 y que finaliza en el residuo 347; o

c) una secuencia aminoacídica de SEC ID N°: 5 que comienza en los residuos 20, 25 ó 30 y que finaliza en el residuo 347; o

50 d) un fragmento proteico del corte interno de la SEC. N° ID.: 5, que tiene una secuencia N-terminal MALFDWTD-YEDLK (SEC. N° ID.: 8); o

e) una combinación de dicho producto de corte y al menos uno de:

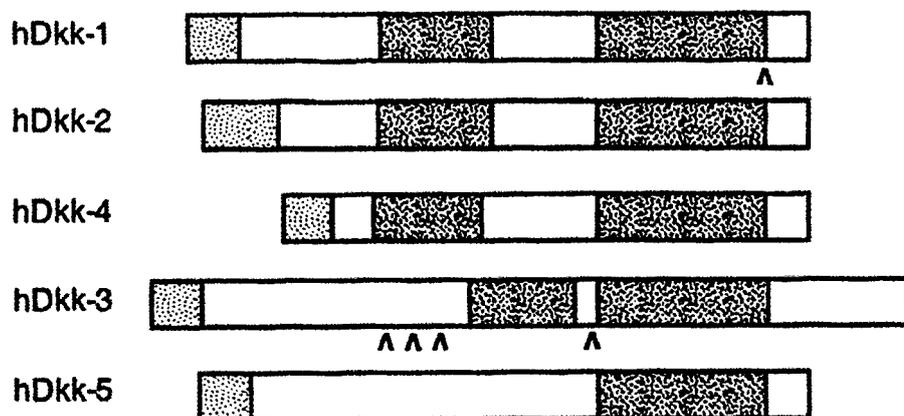
55 i) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 5;

ii) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5 que comienza en cualquiera de los residuos 20 hasta el residuo 30 y que finaliza en el residuo 347;

60 iii) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5 que comienza en cualquiera de los residuos 20, 25 ó 30 y que finaliza en el residuo 347.

65 17. Hibridoma que produce un anticuerpo contra la Dkk-5, seleccionado del grupo que consiste en PTA-3090, PTA-3091, PTA-3092, PTA-3093, PTA-3094, PTA-3095, y PTA-3096.

18. Anticuerpo producido por cualquiera de los hibridomas de la reivindicación 17.



λ Indica sitios de glicosilación putativos

FIG. 1

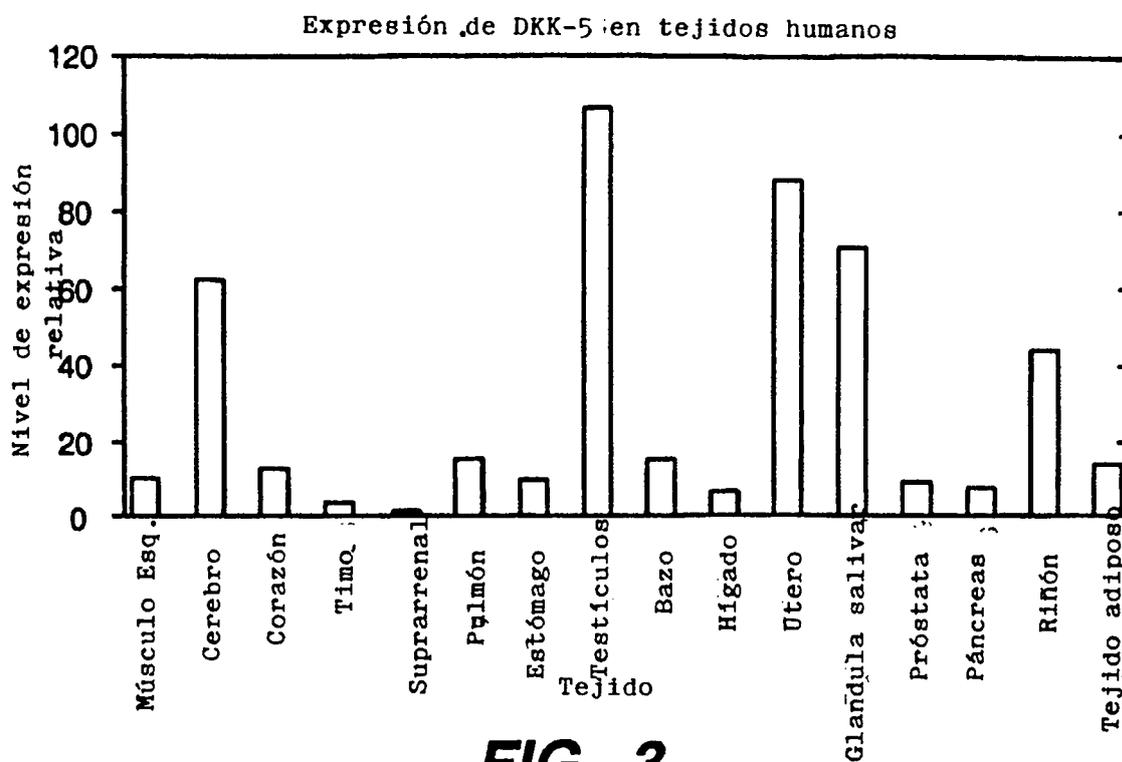


FIG._3

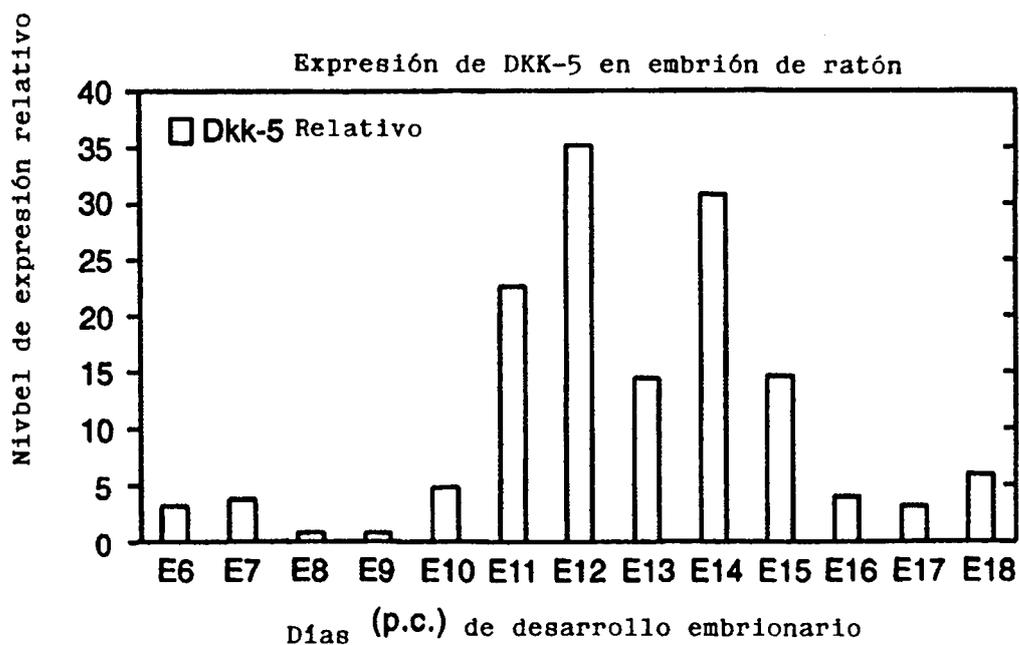


FIG._4



FIG._5A



FIG._5B



FIG._5C



FIG._5D



FIG._5E

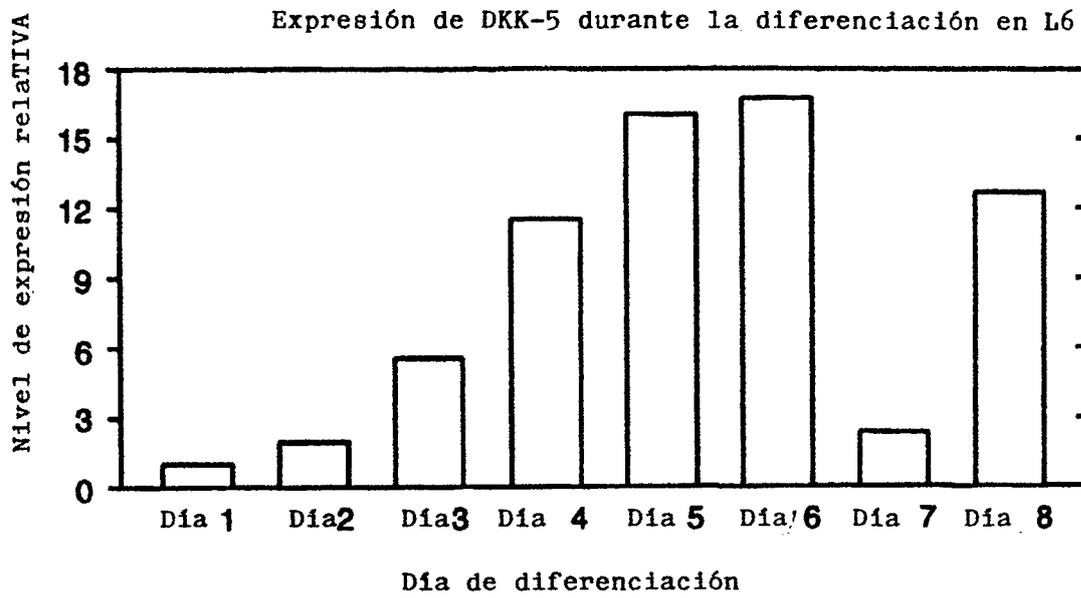


FIG._6

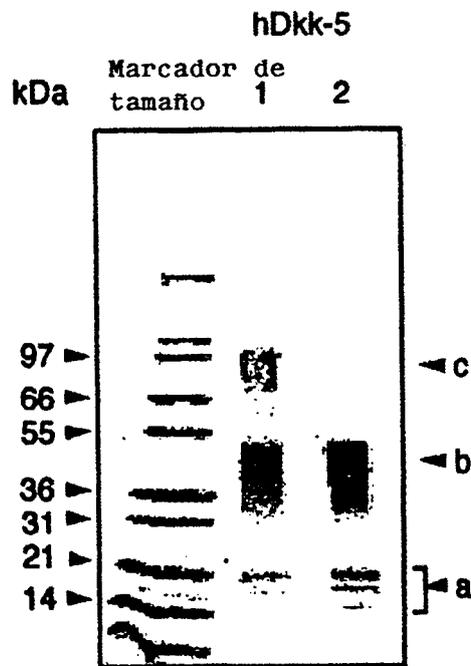


FIG._7

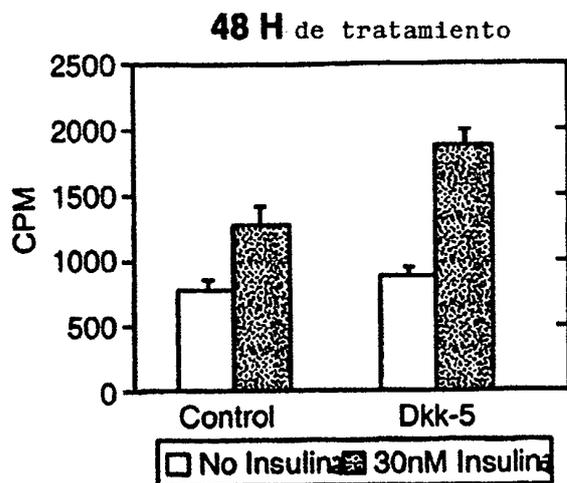


FIG._8A

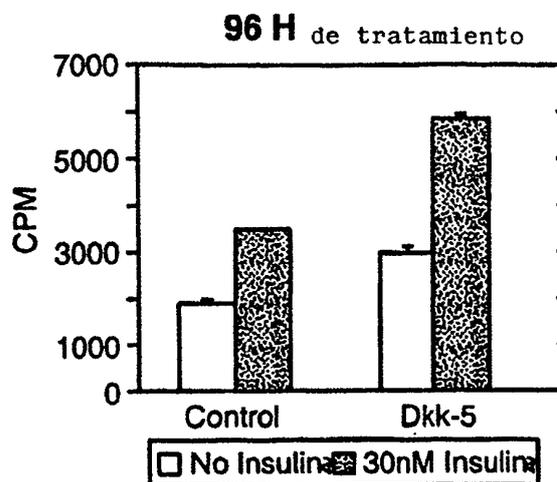


FIG._8B

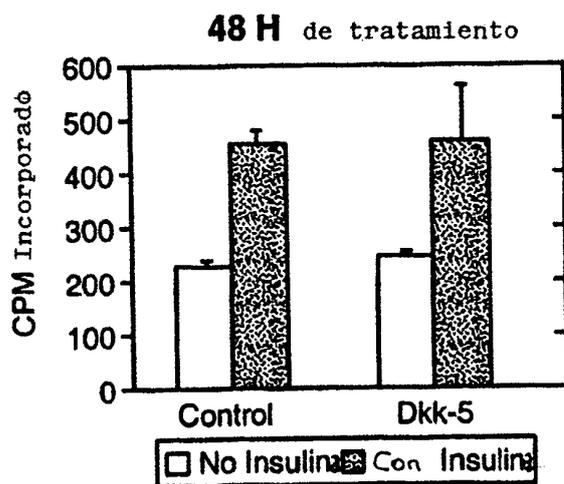


FIG._9A

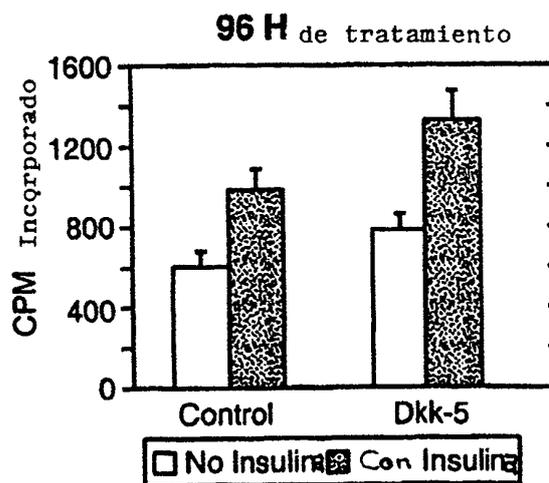


FIG._9B

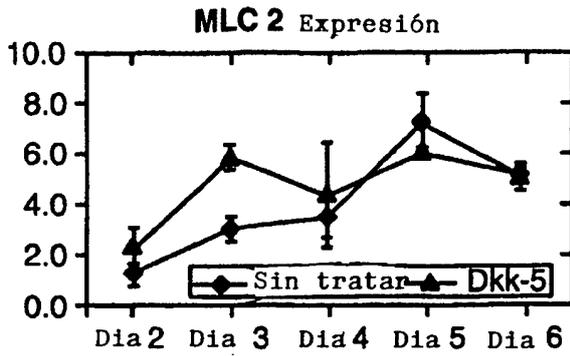


FIG. 10A

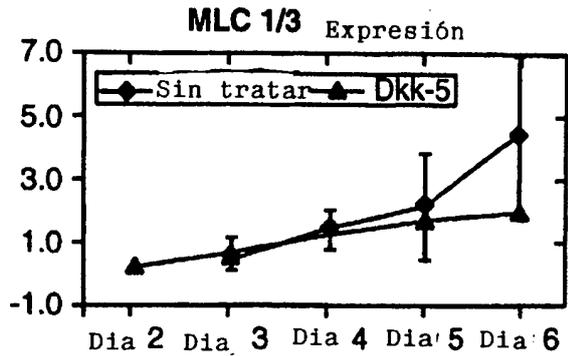


FIG. 10E

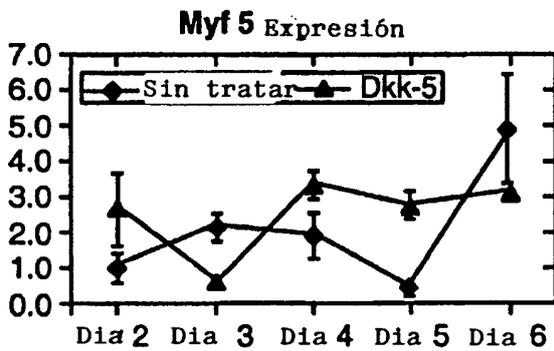


FIG. 10B

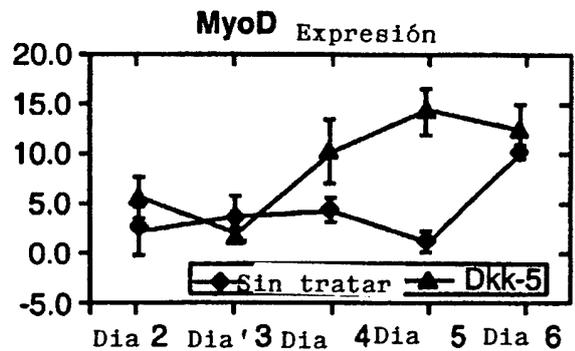


FIG. 10F

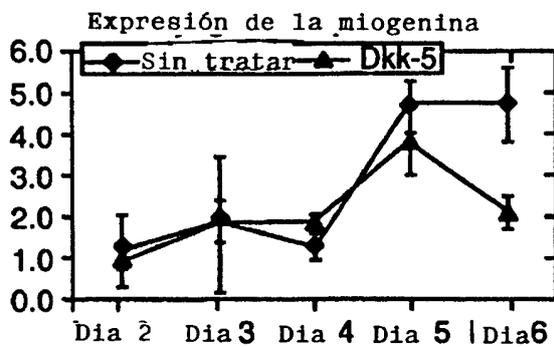


FIG. 10C

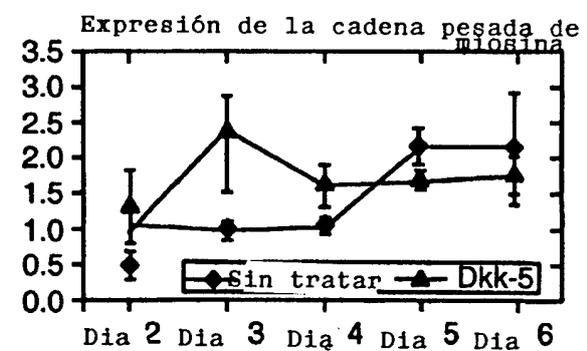


FIG. 10G

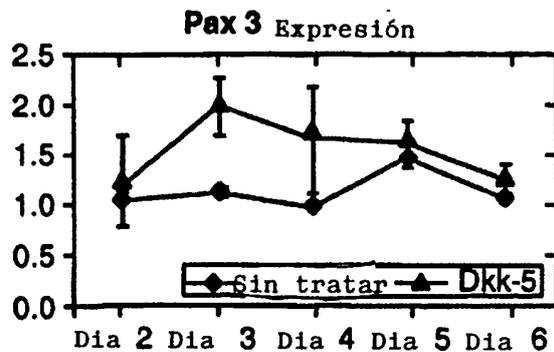


FIG. 10D

Efecto de DKK-5 en la expresión de genes de la vía de señalización de insulina

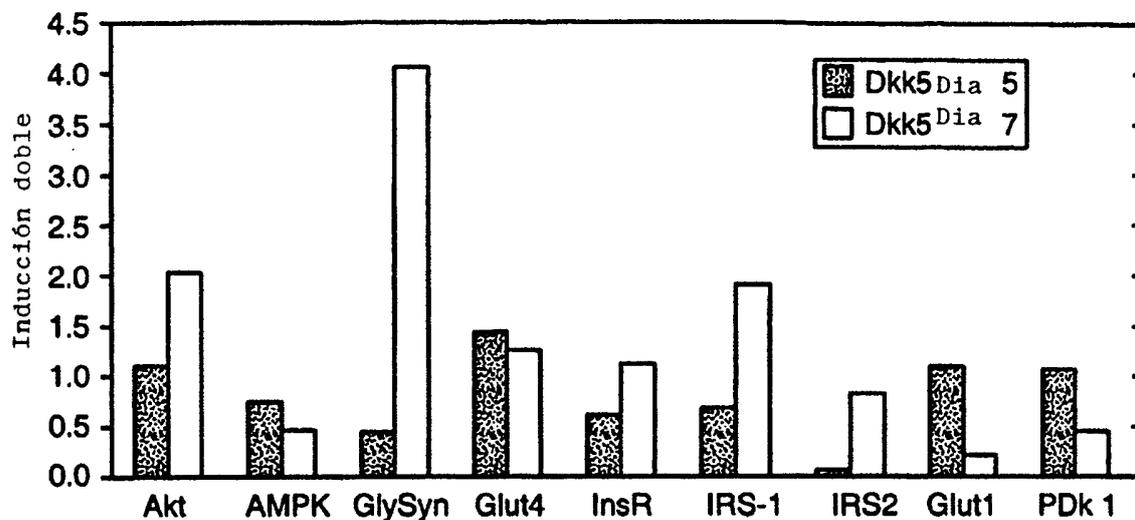
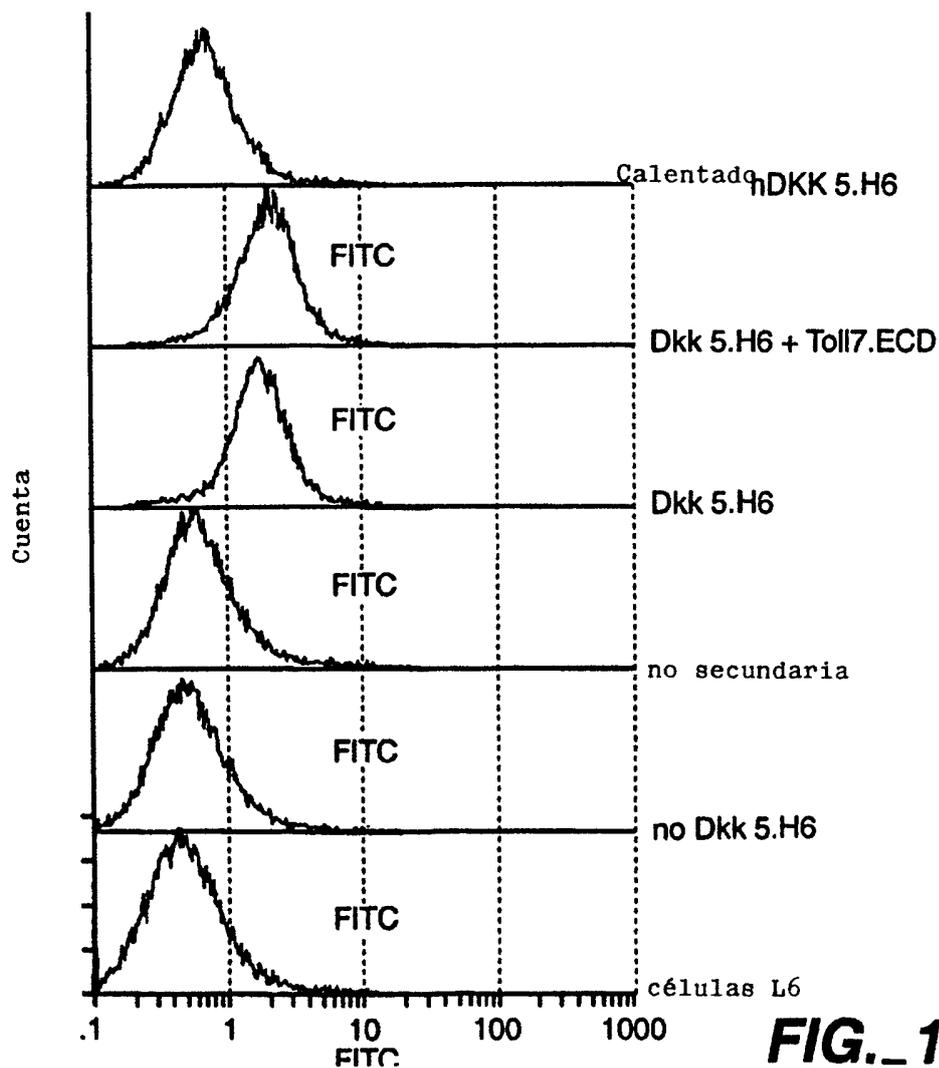


FIG._11



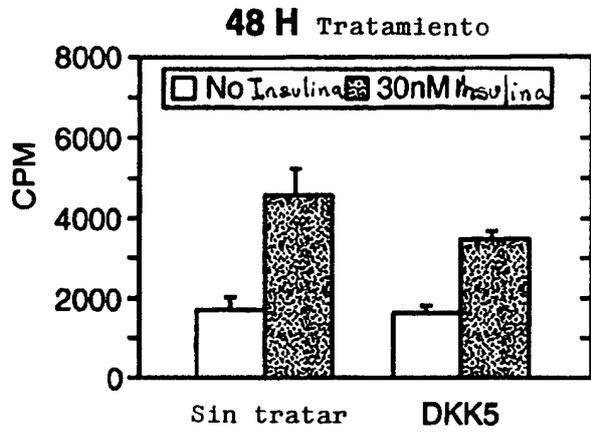


FIG. 13A

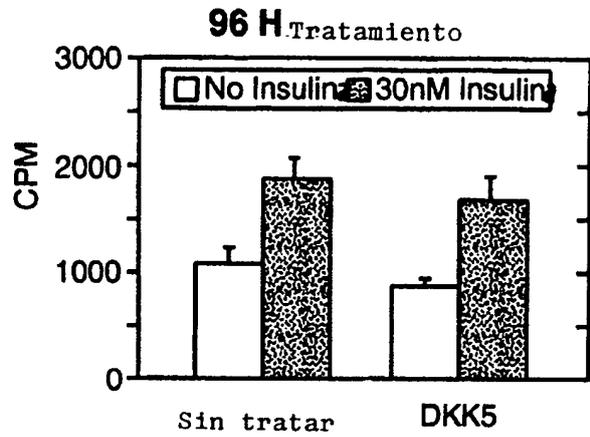


FIG. 13B

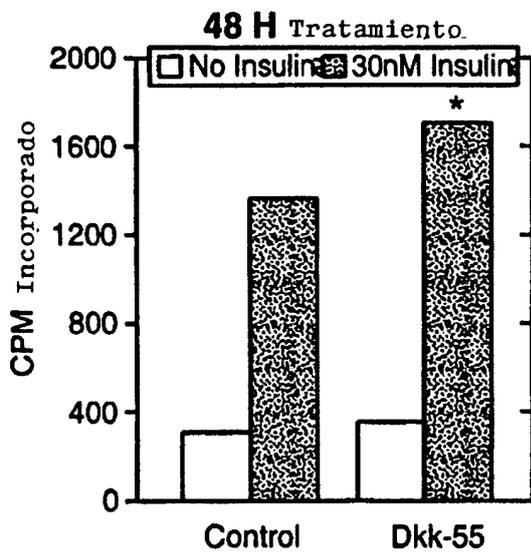


FIG. 14A

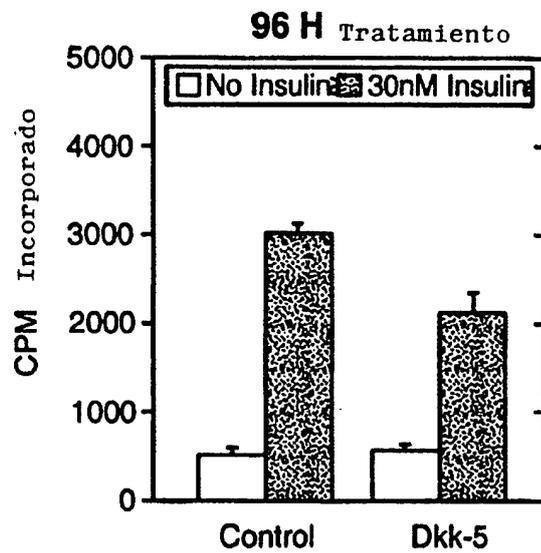


FIG. 14B



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 304 210

② Nº de solicitud: 200650052

③ Fecha de presentación de la solicitud: **15.10.2002**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 38/16** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 1161445 A2 (MILLENNIUM PHARM INC) 12.12.2001	1-18
A	KRUPNIK V. E. et al. "Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family". Gene. 01.10.1999. Vol. 238, N°2 páginas 301-313. ISSN 0378-1119.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

21.08.2008

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/1