



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11) Número de publicación: **2 306 483**

51) Int. Cl.:

**C12N 15/18** (2006.01)

**C07K 14/475** (2006.01)

**C07K 16/22** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**A61K 38/22** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86) Número de solicitud europea: **98959767 .9**

86) Fecha de presentación : **27.10.1998**

87) Número de publicación de la solicitud: **1027440**

87) Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2000**

54) Título: **Proteína inhibidora de la ruta de señalización de wnt.**

30) Prioridad: **27.10.1997 DE 197 47 418**

45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2008**

45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2008**

73) Titular/es: **Deutsches Krebsforschungszentrum  
Stiftung des Öffentlichen Rechts  
Im Neuenheimer Feld 280  
69120 Heidelberg, DE**

72) Inventor/es: **Niehrs, Christof y  
Glinka, Andrei**

74) Agente: **Arizti Acha, Mónica**

ES 2 306 483 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteína inhibidora de la ruta de señalización de wnt.

5 La presente invención se refiere a una proteína inhibidora de la ruta de señalización de wnt, a un ADN que codifica para una proteína de este tipo y a un procedimiento para la producción de una proteína de este tipo. La invención se refiere además al uso del ADN y de la proteína así como a anticuerpos dirigidos frente a la proteína.

10 La ruta de señalización de wnt desempeña un papel importante en la regulación de la diferenciación y proliferación celulares durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*, *Xenopus laevis* y del ratón. La ruta de señalización de wnt comprende la combinación de glicoproteínas secretoras, que están codificadas por genes wnt, por ejemplo Xwnt-8, y receptores de wnt, a los que se unen las glicoproteínas. Además, la ruta de señalización de wnt está implicada en seres humanos de manera causal en el carcinoma de mama y de colon así como en el melanoma (véase Peifer, M., Science 275, (1997), 1752-1753). Por tanto, los inhibidores de la ruta de señalización de wnt podrían representar una  
15 posibilidad de poder intervenir terapéuticamente en el caso de enfermedades tumorales.

20 Si bien las solicitudes de patente de prioridad estadounidenses 08/843.704 y 08/842.898, que coinciden ampliamente con la publicación PCT WO 98 46755, describen determinadas proteínas CRSP (dkk3 = hCRSP-1 = T59), lo hacen sin embargo sin ninguna función.

Por consiguiente, la presente invención se basa en el objetivo de proporcionar un agente con el que pueda inhibirse la ruta de señalización de wnt.

25 Esto se consigue según la invención mediante los objetos en las reivindicaciones.

Por consiguiente, es objeto de la presente invención una proteína inhibidora de la ruta de señalización de wnt, codificándose la proteína por el ADN de la figura 2.1, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 ó 2.7 o por un ADN relacionado con este ADN mediante el código genético degenerado.

30 La presente invención se basa en el conocimiento del solicitante de que existe una proteína en animales, especialmente mamíferos, muy especialmente el ser humano, que inhibe la ruta de señalización de wnt. El solicitante ha encontrado que la expresión del gen wnt, Xwnt-8, en *Xenopus laevis* conduce a la formación de gemelos siameses. Esta malformación se evita cuando se expresa simultáneamente la proteína citada anteriormente. Esta proteína es una proteína secretora de aproximadamente 40 kD. Las variantes de la proteína están expuestas en forma de sus ADN en la figura 2. Además, el solicitante ha reconocido que se expresan variantes de la proteína en distintos tejidos (véase la  
35 tabla 1 y la figura 3).

En la presente invención, la proteína citada anteriormente se denomina como "inhibidor de wnt" (wnt-I).

40 Otro objeto de la presente invención es un ADN que codifica para (wnt-I). Éste puede ser por ejemplo un ADN genómico o un ADNc. Éste es un ADN que comprende lo siguiente:

(a) el ADN de la figura 2.1, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 ó 2.7

45 (b) un ADN relacionado con el ADN de (a) mediante el código genético degenerado.

El ADN de la figura 2 comprende siete ADN, que proceden de *Xenopus laevis*, ratón, ser humano o gallina y codifican para (wnt-I). Seis de estos ADN se depositaron en la DSMZ ("Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen", Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) el 19 de septiembre de 1997 tal  
50 como sigue:

Figura 2.1 (ADN de ser humano) como phdck-3 con DSM 11762

55 Figura 2.2 (ADN de gallina) tiene la denominación pcdck-3

Figura 2.3 (ADN de ratón) como pmdck-2 con DSM 11759

Figura 2.4 (ADN de ser humano) como phdck-2 con DSM 11761

60 Figura 2.5 (ADN de ratón) como pmdck-1 con DMS 11758

Figura 2.6 (ADN de ser humano) como phdck-1 con DSM 11760

65 Figura 2.7 (ADN de *Xenopus laevis*) como pRNdck-1 con DSM 11757

A continuación se describe un ADN según la invención en forma de un ADNc. Éste representa a modo de ejemplo cualquier ADN que está abarcado por la presente invención.

## ES 2 306 483 T3

Para la producción de un ADNc según la invención es favorable partir de una biblioteca de ADNc de *Xenopus laevis* (véase Glinka, A. *et al.*, Mechanisms Develop. 60, (1996), 221-231). A partir de los clones de ADNc individuales se sintetizan los correspondientes ARNm por medio de la ARN polimerasa. Éstos se microinyectan junto con el ARNm de genes *wnt*, por ejemplo *Xwnt-8*, en *Xenopus laevis*. Se examina la formación de gemelos siameses en *Xenopus laevis*. Estos se obtienen cuando el ARNm del gen *wnt* se microinyecta solo o junto con tal ARNm de *Xenopus laevis*, que no codifica para (*wnt-I*). Por consiguiente, la no aparición de gemelos siameses se valora como prueba de la existencia de un ARNm que codifica para (*wnt-I*). Un ARNm de este tipo puede reconocer directamente al correspondiente ADNc.

Un ADNc según la invención puede encontrarse en un vector o vector de expresión. El experto conoce ejemplos de éstos. En el caso de un vector de expresión para *E. coli* estos son por ejemplo pGEMEX, derivado de pUC, pGEX-2T, pET3b y pQE-8. Para la expresión en levadura han de mencionarse por ejemplo pY100 y Ycpad1, mientras que para la expresión en células animales se exponen por ejemplo pKCR, pEFBOS, cDM8 y pCEV4. Para la expresión en células de insecto es especialmente adecuado el vector de expresión de baculovirus pAcSGHisNT-A.

El experto conoce células adecuadas para expresar un ADNc que se encuentra en un vector de expresión según la invención. Los ejemplos de tales células comprenden las cepas de *E. coli* HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 y SG 13009, la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y las células animales L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero y HeLa así como las células de insecto sf9.

El experto sabe de qué manera debe insertarse un ADNc según la invención en un vector de expresión. También conoce que puede insertarse este ADNc junto con un ADN que codifica para otro péptido o proteína, de modo que el ADNc según la invención puede expresarse en forma de una proteína de fusión.

Además, el experto conoce las condiciones para cultivar células transformadas o transfectadas. También conoce procedimientos para aislar y para purificar la proteína expresada por el ADNc según la invención. Por consiguiente, una proteína de este tipo, que también puede ser una proteína de fusión, es también objeto de la presente invención.

Otro objeto de la presente invención es un anticuerpo dirigido frente a una proteína o proteína de fusión citada anteriormente. Un anticuerpo de este tipo puede producirse mediante procedimientos habituales. Puede ser monoclonal o policlonal. Para su producción es favorable inmunizar con una proteína (de fusión) citada anteriormente o fragmentos de la misma, animales, especialmente conejos o gallinas para obtener un anticuerpo policlonal y ratones para obtener un anticuerpo monoclonal. Pueden tener lugar otras "inmunizaciones de recuerdo" en los animales con la misma proteína (de fusión) o fragmentos de la misma. El anticuerpo policlonal puede obtenerse entonces a partir del suero o la yema de huevo de los animales. Para el anticuerpo monoclonal se fusionan células esplénicas de los animales con células de mieloma.

La presente invención permite estudiar y entender mejor la ruta de señalización de *wnt*. Con un anticuerpo según la invención puede detectarse (*wnt-I*) en organismos. Además puede detectarse un autoanticuerpo dirigido frente a esta proteína con un (*wnt-I*) según la invención. Ambas detecciones pueden tener lugar mediante procedimientos habituales, especialmente una inmunotransferencia de tipo Western, un ELISA, una inmunoprecipitación o mediante inmunofluorescencia. Además puede detectarse la expresión del gen que codifica para (*wnt-I*) con un ácido nucleico según la invención, especialmente un ADN y cebadores derivados del mismo. Esta detección puede tener lugar de manera habitual, especialmente en una transferencia de tipo Southern.

Por consiguiente, con la presente invención también pueden estudiarse, es decir diagnosticarse, y entenderse mejor procesos que están relacionados con la ruta de señalización de *wnt*. Éstos son por ejemplo la diferenciación y proliferación celulares así como enfermedades de diferente tipo. Ejemplos de las últimas son enfermedades del ojo y de los huesos así como enfermedades tumorales, especialmente carcinoma de mama y de colon así como melanoma.

Además, la presente invención es adecuada para tomar medidas para y contra la existencia de (*wnt-I*) en organismos. Con un anticuerpo según la invención puede inhibirse (*wnt-I*) en organismos. Por otro lado puede elevarse la cantidad de (*wnt-I*) en organismos con un (*wnt-I*) según la invención, especialmente tras el acoplamiento a una proteína no considerada como extraña por el cuerpo, por ejemplo transferrina o BSA. De manera correspondiente puede conseguirse también con un ácido nucleico según la invención, especialmente con un ADN, que se produce bajo el control de un promotor que puede inducirse en determinados tejidos y tras su expresión conduce a la facilitación de (*wnt-I*) en estos tejidos. Además, también puede utilizarse un ácido nucleico según la invención, especialmente un ADN, para la inhibición de (*wnt-I*). Para esto puede usarse el ácido nucleico, por ejemplo como base para la producción de oligonucleótidos antisentido para la inhibición de la expresión del gen que codifica para (*wnt-I*).

Por consiguiente, la presente invención proporciona también la posibilidad de intervenir activando o inhibiendo en la ruta de señalización de *wnt*. Lo primero podría tener lugar por ejemplo mediante la administración de un anticuerpo según la invención frente a (*wnt-I*). Para lo último es apropiado administrar (*wnt-I*) según la invención. La activación de la ruta de señalización de *wnt* podría ser razonable si se piensa en criar organismos para la donación de órganos. Sin embargo, la inhibición de la ruta de señalización de *wnt* es apropiada para poder intervenir terapéuticamente en enfermedades de huesos y del ojo así como en enfermedades tumorales, especialmente carcinomas de mama y de colon así como melanoma.

Especialmente se destaca la presente invención porque puede utilizarse de manera específica de tejido. Esto sirve tanto para el diagnóstico como para el tratamiento. Por ejemplo es adecuado un ADN según la invención, DKK-1, una proteína correspondiente o un anticuerpo frente a los mismos especialmente para tejidos tales como cerebro, corazón, vasos, huesos, cartílago, tejido conjuntivo y ojo. Además es adecuado un ADN según la invención, DKK-2, una proteína correspondiente o un anticuerpo frente a los mismos especialmente para tejidos tales como cerebro, corazón, vasos, huesos, tejido conjuntivo, riñones, testículos, bazo, ovarios, músculo, útero, cartílago, ojo y glándula mamaria. Además es adecuado un ADN según la invención, DKK-3, una proteína correspondiente o un anticuerpo frente a los mismos, especialmente para tejidos tales como cerebro, corazón, vasos, huesos, cartílago, ojo, tejido conjuntivo, pulmón, ovarios, músculo y glándula mamaria.

10

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra las secuencias I y II consenso de aminoácidos de un (wnt-I) según la invención. La indicación “-” significa un aminoácido, siendo variable el número de aminoácidos cuando presentan un asterisco.

15

La figura 2 muestra la secuencia de bases de siete ADN que codifican para (wnt-I) con la indicación de las bases que contribuyen a las secuencias consenso de aminoácidos de (wnt-I).

20

La figura 3 muestra la expresión de tres ADN que codifican para (wnt-I), DKK-1, DKK-2 y DKK-3, en tejidos.

La presente invención se explica mediante los ejemplos citados a continuación.

#### Ejemplo 1

25

##### *Producción y purificación de un (wnt-I) según la invención*

Para la producción de un (wnt-I) según la invención se dotó el ADN de la figura 2.6, phdkk-1 de ligadores de Bam HI, posteriormente se escindió con Bam HI y se insertó en el vector de expresión pQE-8 (Qiagen) escindido con Bam HI. Se obtuvo el plásmido de expresión pQ/wnt-I. Éste codifica para una proteína de fusión de 6 restos de histidina (componente del extremo N-terminal) y un (wnt-I) según la invención (componente del extremo C-terminal). Se usó pQ/wnt-I para la transformación de SG 13009 de *E. coli* (véase Gottesman, S. *et al.*, J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273). Se cultivaron las bacterias en un medio LB con 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina y se indujeron durante 4 h con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 60 µM. Mediante la adición de clorhidrato de guanidina 6 M se consiguió una lisis de las bacterias, posteriormente se realizó con el lisado una cromatografía (resina de Ni-NTA) en presencia de urea 8 M de manera correspondiente a las indicaciones del fabricante (Diagen) del material de cromatografía. Se eluyó la proteína de fusión unida en un tampón con pH 3,5. Tras su neutralización, se sometió la proteína de fusión a una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 18% y se tiñó con azul de Coomassie (véase Thomas, J.O. y Kornberg, R.D., J. Mol. Biol. 149 (1975), 709-733).

40

Se mostró que una proteína (de fusión) según la invención puede producirse en forma altamente pura.

#### Ejemplo 2

45

##### *Producción y detección de un anticuerpo según la invención*

Se sometió una proteína de fusión según la invención del ejemplo 1 a una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 18%. Tras la tinción del gel con acetato de sodio 4 M, se cortó una banda de aproximadamente 40 kD del gel y se incubó en disolución de cloruro de sodio tamponada con fosfato. Se sedimentaron fragmentos de gel, antes de determinar la concentración de proteína del sobrenadante mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, a la que le siguió una tinción con azul de Coomassie. Se inmunizaron animales con la proteína de fusión purificada en gel tal como sigue:

50

##### *Protocolo de inmunización para obtener anticuerpos policlonales en conejos*

55

Se utilizaron por inmunización 35 µg de proteína de fusión purificada en gel en 0,7 ml de PBS y 0,7 ml de adyuvante de Freund completo o incompleto.

Día 0: 1ª Inmunización (adyuvante de Freund completo)

60

Día 14: 2ª Inmunización (adyuvante de Freund incompleto; icFA)

Día 28: 3ª Inmunización (icFA)

65

Día 56: 4ª. Inmunización (icFA)

Día 80: Sangrado

## ES 2 306 483 T3

Se sometió a prueba el suero del conejo en inmunotransferencia. Para esto, se sometió una proteína de fusión según la invención del ejemplo 1 a una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y se transfirió a un filtro de nitrocelulosa (véase Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Se realizó el análisis de inmunotransferencia de tipo Western tal como se describe en Bock, C.-T. *et al.*, Virus Genes 8, (1994), 215-229. Para esto, se incubó el filtro de nitrocelulosa durante una hora a 37°C con un primer anticuerpo. Este anticuerpo era el suero del conejo (1:10000 en PBS). Tras varias etapas de lavado con PBS se incubó el filtro de nitrocelulosa con un segundo anticuerpo. Este anticuerpo era un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo monoclonal acoplado a fosfatasa alcalina (Dianova) (1:5000) en PBS. Tras una incubación de 30 minutos a 37°C siguieron varias etapas de lavado con PBS y posteriormente la reacción de detección de la fosfatasa alcalina con revelador (fosfato de 5'-bromo-4-cloro-3-indolilo 36  $\mu$ M, azul de nitrotetrazolio 400  $\mu$ M, Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) a temperatura ambiente, hasta que fueron visibles las bandas.

Se mostró que puede producirse el anticuerpo policlonal según la invención.

15

### *Protocolo de inmunización para obtener anticuerpos policlonales en gallina*

Se utilizaron por inmunización 40  $\mu$ g de proteína de fusión purificada en gel en 0,8 ml de PBS y 0,8 ml de adyuvante de Freund completo o incompleto.

20

Día 0: 1ª Inmunización (adyuvante de Freund completo)

Día 28: 2ª Inmunización (adyuvante de Freund incompleto; icFA)

25

Día 50: 3ª Inmunización (icFA)

Se extrajeron anticuerpos de yema de huevo y se sometieron a prueba en inmunotransferencia de tipo Western. Se detectaron anticuerpos policlonales según la invención.

30

### *Protocolo de inmunización para obtener anticuerpos monoclonales de ratón*

Se utilizaron por inmunización 12  $\mu$ g de proteína de fusión purificada en gel en 0,25 ml de PBS y 0,25 ml de adyuvante de Freund completo o incompleto; en la 4ª inmunización la proteína de fusión estaba disuelta en 0,5 ml (sin adyuvante).

35

Día 0: 1ª Inmunización (adyuvante de Freund completo)

40

Día 28: 2ª Inmunización (adyuvante de Freund incompleto; icFA)

Día 56: 3ª Inmunización (icFA)

Día 84: 4ª Inmunización (PBS)

45

Día 87: Fusión

Se sometieron a prueba sobrenadantes de hibridomas en inmunotransferencia de tipo Western. Se detectaron anticuerpos monoclonales según la invención.

50

55

(Tabla pasa a página siguiente)

60

65

# ES 2 306 483 T3

TABLA 1

*Expresión de ADN según la invención en embriones de ratón*

	<b>Dkk-1</b>	<b>Dkk-2</b>	<b>Dkk-3</b>
<b>Neuroepitelio</b>			
E9.5 diencéfalo	+++ ventral	+++ medial	+ medial
E 12.5	telencéfalo M /manto	hipotálamo	telencéfalo M /zona ventricular
Ojo	epitelio pigmentado	membrana coroidea	retina
Médula espinal	-/+	-	placa del techo de zona ventricular
<hr/> <b>Mesodermo:</b>			
Corazón E10	Endocardio de bulbo arterioso, Septo transverso	endotelio	miocardio
Corazón E12	almohadilla endocárdica	endotelio	almohadilla endocárdica
Vasos sanguíneos	+++ aorta	+++ arteria pulmonar	+++ aorta + arteria pulmonar
Mesénquima del primordio de la extremidad	E9 S	I	D

## ES 2 306 483 T3

	Hueso	pericondrio	S/mesénquima	pericondrio
5	E12			I/mesénquima
	Hueso	centros de osificación	-	-
	E15			
10	Urogenital	cuerpo en forma de coma, cuerpo en	mesénquima metanéfrico	-
15		forma de S del conducto renal		
20	Paladar	+++	++	+
	Folículo piloso	+++ mesénquima + epitelio	+ -	+ -
25	Mesénquima dental	-	-	+++
30	Mesodermo troncal	+/-	+++	++

35 Leyenda: Mesodermo: (D) decp ("*dorsal ectoderm primordium*", primordio  
ectodérmico dorsal), (I) intermedio, (L) lateral, (M) medial, (S), superficial.  
40 Nivel de expresión: (-) ausencia, (+/-) expresión muy débil, (+) media, (++) fuerte,  
(+++) muy fuerte.

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

5 1. Proteína inhibidora de la ruta de señalización de wnt, codificándose la proteína por el ADN de la figura 2.1, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 ó 2.7 o por un ADN relacionado con este ADN mediante el código genético degenerado.

2. ADN, que codifica para la proteína según la reivindicación 1, siendo el ADN aquél de la figura 2.1, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 ó 2.7 o un ADN relacionado con este ADN mediante el código genético degenerado.

10 3. Plásmido de expresión, que comprende el ADN según la reivindicación 2.

4. Transformante, que contiene el plásmido de expresión según la reivindicación 3.

15 5. Procedimiento para la producción de la proteína según la reivindicación 1, que comprende el cultivo del transformante según la reivindicación 4 en condiciones adecuadas.

6. Anticuerpo monoclonal, dirigido frente a la proteína según la reivindicación 1.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

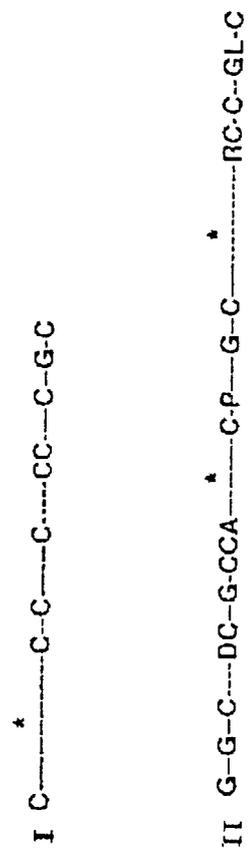


Fig. 1





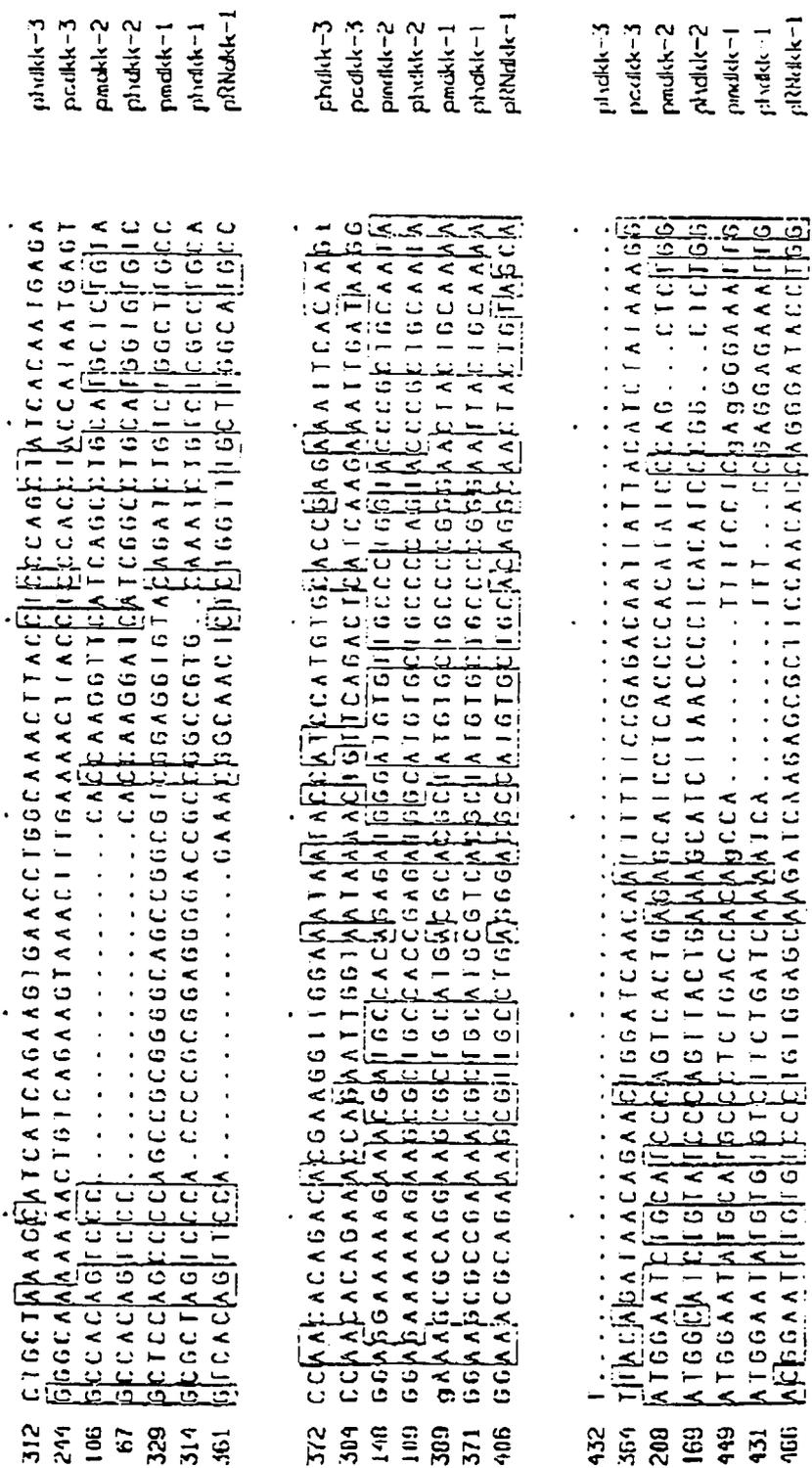


Fig. 2 (continuación)





```

433 . . . . . C C T G A T G G A G T A C T A G A G C C G C T G C C C A T G T G C A A G T G G C T T G A T C T T G C C A A C C T C A G A G C
703 . . . . . A A A C A C T G . G A A G A G T C A T C A C T A G C C A G A C T G T G A A T T T G T G T A T T T A A T G C A T T A T G G C
619 . . . . . C A C C A T T G A G G A A C A T C A T C A A T T G C A G A C T G T G A A G T T G T G T A T T T A A T G C A T T A T A G C
856 . . . . . A C C G A C A G T C . . . . . T A A A T A T G A T G G A C T C T T T T A T C T A A T A T A T G C T A C G A A A A T C
829 . . . . .
803 C G A G G C C T A C A G A G . . . . . C C T G A A G G A C C T T C T C T A A A T T A A G C T A A T T A A G A C T T T G G T A C
. . . . .

435 . . . . . A G C C A C A G T A C T A C A T C T G T G T G A A C T G T C C T C C A A T G A A A C C A G G A A A A A A C G A A A A A
843 . . . . . A T G A T G G A A A C C T G G A T T G G A A T G C G G A A G A A T G A G G G A T G T G G T A A G A A T G T G G A G C A G
670 . . . . . A T G G T G G A A A A A A G G T T C A G A T G C A G A A G A A T . . . . . G G C T A A A A T A A G A A A C G T G A T A A G
640 . . . . . C T T T A T G A T T T G T C A G C T C A A T C C C A A G G A T G T A G G A A T C T T C A G T G T A A T T A A G C A T
910 . . . . .
929 . . . . . C T G C A T G T T A T T T C T C A G T T T A C A T G A A A G T G C T C T G G T C T C C C T G A A C C C G G A A T G C T G
941 . . . . .

433 . . . . . G A A G A T C C C T T G A A C A T G G A T G A G A T G C C A T T T A T C A G T T A A T A C C C A G A G A T A T C T T
903 . . . . . A A G A G G G C A G G A C T G A A T C A A G T A G A G T C G A C A A C A A C C A A A G T A C T A C C A G T G C T T C C G
730 . . . . . A A T A T A G A T G A T C A C A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
697 . . . . . T C C G A C A A T A C T T T C C A A A A G C T C T G G A G T G T A A G G A C T T T G T T T C T T G A T G G A A C T C C C
970 . . . . .
929 . . . . . C G C A A C T T G T T C T T T T T T G A G G A A C T T C C T A A T T A A T G C T A A T T A C A G T A A A T T A C T G
1001 . . . . .

```

phdtk-3  
pcdtk-3  
pmdtk-2  
phdtk-2  
pmdtk-1  
phdtk-1  
pRNdtk-1

phdtk-3  
pcdtk-3  
pmdtk-2  
phdtk-2  
pmdtk-1  
phdtk-1  
pRNdtk-1

phdtk-3  
pcdtk-3  
pmdtk-2  
phdtk-2  
pmdtk-1  
phdtk-1  
pRNdtk-1

Fig. 2 (continuación)







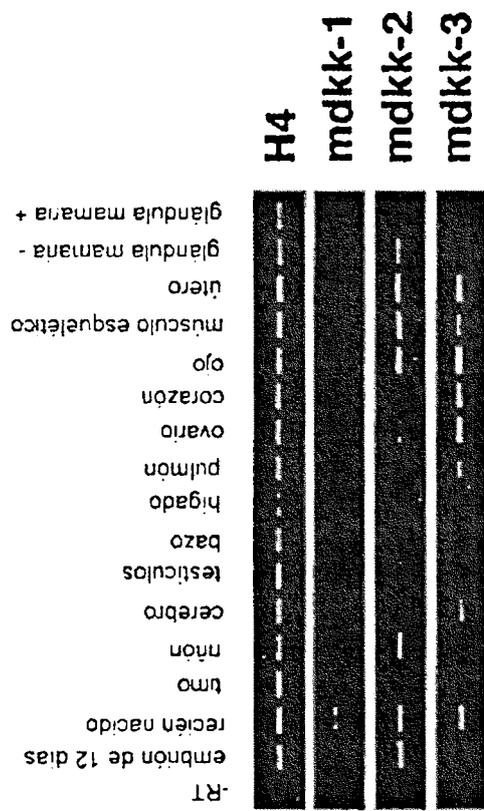


FIG. 3

# ES 2 306 483 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) DATOS GENERALES:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: Deutsches Krebsforschungszentrum (Centro alemán de investigación del cáncer)
  - (B) CALLE: Im Neuenheimer Feld 280
  - 10 (C) CIUDAD: Heidelberg
  - (E) PAÍS: Alemania
  - (F) CÓDIGO POSTAL: 69120
- 15 (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Proteína inhibidora de la ruta de señalización de wnt
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 7
- (iv) VERSIÓN LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 20 (A) SOPORTE DE DATOS: disco flexible
  - (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
  - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release nº 1.0, Versión nº 1.30 (EPA)
- 25 (v) DATOS DE LA SOLICITUD PREVIA:
- NÚMERO DE SOLICITUD: DE 19747418.7

### (2) DATOS PARA LA SEQ ID NO: 1:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1297 Pares de base
  - 35 (B) TIPO: Nucleótido
  - (C) FORMA DE LA CADENA: Monocatenaria
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- 45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:
- 50
- 55
- 60
- 65

## ES 2 306 483 T3

	GACAGTCGGA GCCGGCGCTG CAGCATCAAA GGGACTTATC TTGGAGGACT TGTGAATTCT	60
5	CATCCTGCCA TTCTGGTTAC TGAGTCTGST TGGACAGAGG AATGGGCAGC AACATGTTCC	120
	CGGTGCCTCT TATTGTCTTT TGGGGTTTTA TCTTGGATGC GGCACCTGGC TTTGTGATGA	180
	TGACCAACTC CAACTCCATC AAGAATGTGC CCGCGGCACC AGCAGGTCAG CCCATTGGCT	240
10	ACTACCTGT GAGCGTCAGT CCGGACTCCC TATATGATAT TGCCAACAAG TACCAACCTC	300
	TGGATGCCTA CCCCCTCTAC AGTTGCACGG AAGATGATGA CTGTGCCCTT GATGAATTCT	360
	GTCACAGTTC CAGAAACGGC AACTCTCTGG TTTGCTTGGC ATGCCGGAAA CGCAGAAAGC	420
15	GTTGCCTGAG GGACGGCCTG TGCTGCACAG GCAACTACTG TAGCAACGGA ATTTGTCTCC	480
	CTGTGGAGCA AGATCAAGAG CGCTTCCAAC ACCAGGGATA CCTGGAAGAA ACCATTCTGG	540
	AAAACATAAA TAATGCTGAT CATGCAACAA TGGATACTCA TTCCAAATTA ACCACGTCCC	600
20		
	CATCTGGAAT GCAGCCCTTT AAAGGCCGTG ATGGTGATGT TTGCCTCCGA TCAACTGACT	660
25	GTGCGCCAGG TCTATGCTGT GCCCGTCATT TCTGGTCAAA GATCTGCAAG CCGGTCCCTG	720
	ATGAAGGCCA AGTGTGCACC AAGCACAGGA GGAAAGGCTC TCACGGGCTA GAGATTTTCC	780
	AGCGTTGTCA CTGCGGTGCC GGACTCTCGT GCCGGTTACA GAAAGGAGAA TTTACAAC TG	840
30	TCCCTAAAAC ATCGAGACTT CACACTTGCC AAAGACACTA AGCGAGGCCT ACAGAGCCTG	900
	AAGGACCTTC TCTAAATTAA GCTAATTAAG ACTTTGGTAC CTGCATGTTA TTTTCTCAGT	960
	TTACATGAAG TGCTCTGGTC TTCCCTGAAC CCGGAAGCTG CGCAACTGT TTTTTTTTTT	1020
35	GAGGAACTTC CTAATTAATG CTAATTACAG TAAATTACTG TGTGTAAAT ACTACGCAAG	1080
	GAGACCTGTA AAAACTGTAA ATACCCGTGT ATAGAAAGTG TACATGATCT TCTCTATTGT	1140
	AACCTGCCAC CTTGTACATT CCGACGCGCT CTTCCTTTT TATATATATA TATATATAAA	1200
40	TATATATTAT ATTATGTAGA GTTTACGTCT AGTATGTCTG TATTTTAAAT TGAANAATAA	1260
	CATTTCTAAA CTTAAAAACA AAAAAAAAAA AAAAAA	1297

### (2) DATOS PARA LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 881 Pares de base

(B) TIPO: Nucleótido

(C) FORMA DE LA CADENA: Monocatenaria

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

## ES 2 306 483 T3

	TGCAGGCATG AACAAAGGACT GGGTTCGGCG GCAGTGAGAA GGGCAALACC CTGGGGCAGG	60
5	CCTACCCCTTG CAGCAGTGAT AAGGAATGTG AAGTTGGAAG ATACTGCCAC AGTCCCCACC	120
	AAGGTTCAATC AGCCTGCATG CTCTGTAGGA GGAAAAGAA ACGATGCCAC AGAGATGGGA	180
	TGTGTTGCCG TGGTACCCGC TGCAATAATG GAATCTGCAT CCCAGTCACT GAGAGCATCC	240
10	TCACCCACA TATCCCAGCT CTGGATGGCA CCCGGCATAG AGATCGCAAC CATGGTCACT	300
	ATTCCAACCA TGACCTGGGA TGGCAGAATC TAGGAAGGCC ACACTCCAAG ATGCCTCATA	360
	TAAAAGGACA TGAAGGAGAC CCATGCCTAC GGTATCAGA CTGCATTGAT GGGTTTTGTT	420
15	GTGCTCGCCA CTTCTGGACC AAAATCTGCA AACCAGTGCT CCATCAGGGG GAAGTCTGTA	480
	CCAAACAACG CAAGAAGGGT TCGCAGGGC TGCAGATTTT CCAGAGGCT GACTGTGCAA	540
	AGGSCCTGTC CTGCAAGTG TGGAAAGATG CCACCTACTC TCCAAAGCC AGACTCCATG	600
20	TATGCCAGAA GATCTGATAA ACACTGGAAG AGTCATCACT AGCAGACTGT GAATTTGTGT	660
25	ATTTAATGCA TTATGGCATG ATCGAAACCT GGATTGGAAT GCGGAAGAAT GAGGGATGTG	720
	GTAAGAATGT GGAGCAGAAG AGGGCAGGAC TGAATCAAGT AGAGTCGACA ACAACCAAG	780
	TACTACCAGT GCTTCCGTTA TGTGCCTCAT CTATGTAAAT AATGTACACA TTTGTAAAA	840
30	TGCTATTATT AAAAGAAAGC ACACCATGGA AATTACAAAA A	861

35 (2) DATOS PARA LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 1226 Pares de base
- (B) TIPO: Nucleótido
- (C) FORMA DE LA CADENA: Monocatenaria
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

55

60

65

## ES 2 306 483 T3

	GACCCACCGG TCCGTGCCTG FTTGCGTCCCT TCGGAGATGA TGSTTGTGTG TGCACCCGCA	60
5	GCTGTCCGGT TCTTGGCCGT GTTTACAATG ATGGCTCTCT GCAGCCTCCC TCTGCTAGGA	120
	GCCAGTGCCA CCTTGAAGTC AGTTCTCATC AATTCCAACG CGATCAAGAA CCTGCCCCCA	180
	CCGCTGGGTG GTGCTGGGGG GCAGCCGGGC TCTGCTGTCA GTSTGGCGCC GGGAGTTCTC	240
	TATGAGGGCG GGAACAAGTA CCAGACTCTT GACAAGTACC AGCCCTACCC TTGGCGTGAA	300
10	GATGAGGACT GCGCTCTGTA CGAGTACTGC TCCAGCCCCA GCCCGGGGGC AGCCGGCCTC	360
	GGAGGTGTAC AGATCTGTCT GGCTTGCCGA AAGCGCAGGA AGCGCTGCAT GACGCACGCT	420
	ATGTGCTGCC CCGGGAAGTA CTGCAAAAAT GGAATATGCA TGCCCTCTGA CCACAGCCAT	480
15	TTTCCTCGAG GGGAAATTGA GGAAAGCATC ATTGAAAACC TTGGTAATGA CCACAACGCC	540
	GCCGCGGGGG ATGGATATCC CAGAAGAACC ACACTGACTT CAAAAATATA TCACACCAAA	600
	GGACAAGAAG GCTCCGTCTG CCTCCGATCA TCAGACTGTG CCGCAGGSCT GTSTTGTGCA	660
20	AGACACTTCT GGTCCAAGAT CTGTAAACCT GTCCTTAAAG AAGGTCAGGT GTGCACCAAG	720
	CACAAACGSA AAGGCTCCCA CGGGCTGGAG ATATTCCAGC GCTGTTACTG CCGGGAAGGC	780
	CTGGCTTGCA GGATACAGAA AGATCACCAT CAAGCCAGCA ATTCTTCTAG GCTCCACACC	840
25	TGCCAGAGAC ACTAAACCGA CAGTCTAAAT ATGATGGACT CTTTTATCT AATATATGCT	900
	ACGAAAATCC TTTATGATTT GTCAGCTCAA TCCCAAGGAT GTAGGAATCT TCAGTGTGTA	960
30	ATTAAGCATT CCGACAATAC TTTCCAAAAG CTCTGGAGTG TAAGGAOETT STTTCTTGAT	1020
	GGAACTCCCC TGTAATTGCA GTAAATTACT GTGTTGTAAA TCCTCAGTGT GGCACCTACC	1080
	TGTAAATGCA GCLAAACTTT TAATTATTTT TCTAGAGGTG TGGTACATTG CTTGTTTTCT	1140
35		
	CTTGCATGTA AATTTTTTTT GTACACGGTT GATTGTCTTG ACTCATAAAT ATTCTATAT	1200
40	GGAGTAGAAA AAAAAAAAAA AAAAAA	1226

(2) DATOS PARA LA SEQ ID NO: 4:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 768 Pares de base
  - (B) TIPO: Nucleótido
  - 50 (C) FORMA DE LA CADENA: Monocatenaria
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico
- 55 (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:
- 60
- 65

## ES 2 306 483 T3

5  
10  
15  
20  
25

```
ATACGACTCA CTATAGGGAA TTTGGCCCTC GAGGCCAAGA ATTCGGCAGC AGGGTTGGGA      60
GGTATTGCCA CAGTCCCCAC CAAGGATCAT CGGCCTGCAT GGTGTGTCCG AGAAAAAGA      120
AGCGCTGCCA CCGAGATGGC ATGTGCTGCC CCAGTACCCG CTGCAATAAT GGCATCTGTA      180
TCCAGTAC TGAAAGCATC TTAACCCCTC ACATCCCGGC TCTGGATGGT ACTCGGCACA      240
GAGATCGAAA CCACGGTCAT TACTCAAACC ATGACTTGGG ATGGCAGAAT CTAGGAAGAC      300
CACACACTAA GATSTCACAT ATAAAAGGGC ATGAAGGAGA CCCCTGCCTA CGATCATCAG      360
ACTGCATTCA AGGTTTTTGC TGTGCTCCTC ATTCTGGAC CAAAATCTGC AAACCAGTGC      420
TCCATCAGGG GGAAGTCTGT ACCAACAAC GCAAGAAGCG TTCTCATGGG CTGGAAATTT      480
TCCAGCGTTG CCACTGTCCG AAGGGCCTGT CTGCAAAGT ATGGAAAGAT GCCACCTACT      540
CCTCCAAAGC CAGACTCCAT GTGTGTCAGA AAATTGATC ACCATTGAGG AACATCATCA      600
ATTGCAGACT GTGAAGTTGT GTATTTAATG CATTATAGCA TGTTGGAAA TAAGGTTTCCAG      660
ATGCAGAAGA ATGGCTAAAA TAAGAAACGT GATAAGAATA TAGATGATCA CAAAAAAAAA      720
AAAAAAAAAG ATCGGCCCGC AAGCTTATTC CCTTTAGTGA GGGTTAAT      768
```

30 (2) DATOS PARA LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 828 Pares de base

(B) TIPO: Nucleótido

(C) FORMA DE LA CADENA: Monocatenaria

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

50

55

60

65

## ES 2 306 483 T3

	TGGCCCCGCA CGCCAAAAAT TCGGCACGAG GGTCTGGCAC TCAGAGGATG CTCTGACCTT	60
5	GAAAGGGTCC TATCTGJAGA CGAGGGAGTA CAACGTGCTG AATGTGTGCG GTTCAGGGAG	120
	CATTTGGTAA CCCTGCATTT GGGAGCAGTG GGCACAAACC GGTITTTGGAG AGGTGGACAC	180
	ATAAGGACTG TGATCAGCGC CCGGGTCCAA GAGGGCGGGT ACCTGGACCT CTGGGTGCCT	240
10	CACCCTCTCC CGGAACCCCTT CCCACAGCCG TACCCGTGCG CAGAGGACGA GGAGTCCGGC	300
	ACTGATGAGT ACTGCGCTAG TCCCACCCCG CCGAGGGGAC CGCCGGCCGT GCAAATCTGT	360
	CTCGCCTGCA GGAAGCGCCG AAAACCGTGC ATGCGTCACG CTATGTGCTG CCCCAGGAAT	420
15	TACTGCAAAA ATGGAATATG TGTGTCTTCT GATCAAAATC ATTTCCGAGG AGAAATTGAG	480
	GAAACCATCA CTGAAAGCTT TGTAATGAT CATAGCACCT TGGATGSGTA TTCCAGAAGA	540
	ACCACCTTGT CTTCAAAAAAT GTATCACACC AAAGGACAAG AAGGTTCTGT TTGTCTCCCG	600
20	TCATCAGACT GTGCCTCAGG ATTGTGTGTG GCTAGACACT TCTGGTCCAA GATCTGTAAA	660
	CCTGTCTTGA AAGAAGGTCA AGTGTGTACC AAGCATAGGA GAAAAGGCTC TCATGGACTA	720
	GAAATATTCG AGCCTTGTTA CTGTGSAGAA GGTCTGTCTT GCCGATACA GAAAGATCAC	780
25	CATCAAGCCA GTAATCTTC TAGGCTTCAC ACTGTGCAGA GACACTAA	826

30

(2) DATOS PARA LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

35

(A) LONGITUD: 432 Pares de base

(B) TIPO: Nucleótido

(C) FORMA DE LA CADENA: Monocatenaria

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICO: NO

45

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

50

GCGGTGCGCG CCGCTCTAGA ATAGTGGATC CCCCAGGCTG CAGGAATTCC GCACGAGCGG 60

CTGCGGSCCC AGAGCGGAGA TGCAGCGGCT TGGGCCACCC TGCTGTGCCT GCTGCTGCGG 120

GCGGCGSTCC CCACGGCCCC CGCGCCCGCT CCGACGGCGA CCTCGGCTCC AGTCAAGCCC 180

55

GGCCCCGCTC TCACCTACCC GCAGGAGGAG GGCACCCTCA ATGAGATGTT CCGCGGCTGA 240

GGAACTGATG GAGGACACGC AGCACAATT GCGCAGCGCG GTGSAAGAGA TGGAGGCAGA 300

AGAAGCTGCT GCTAAAGCAA TCATCAGAAG TGAACCTGSC AAACCTACCT CCCAGCTATC 360

60

ACAATGAGAC CACACAGAC ACGAAGGTTG GAAATAATAA CCATCCATGT GCACCGAGAA 420

ATTCACAAGT T. 432

65

## ES 2 306 483 T3

(2) DATOS PARA LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1383 Pares de base
- (B) TIPO: Nucleótido
- (C) FORMA DE LA CADENA: Monocatenaria
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

20	CGGCGAGCGG CAGCGGCGGC TGAGGAGCCG CCGGGATGCG GCGGGGAGAG GGACCGGCGC	60
	CGCGGCGGCG ATGGCTGCTG CTGTTGGCCG TGCTGCGGC TCTGTCTGTC GCCGCGGCGG	120
	GGAGCGGCGG GCGGCGGCGA GCGGCCAGCC TGGGCGAGAT GCTGCGGGAG GTGGAGGCGC	180
25	TGATGAGGA CACGCGCAC AAGCTGCGCA ACGCCGTGCA GGAGATGGAA GCTGAAGAAG	240
	AAGGGSCAAA AAAACTGTCA GAAGTAAACT TTGAAAACCT ACCTCCCACC TACCATAATG	300
	AGTCCAACAC AGAAACCAGA ATTGGTAATA AACTGTTCA GACTCATCAA GAAATTCATA	360
30	AGSTTACAGA TAACAGAACT GGATCAACAA TTTTTCCGA GACAATTATT ACATCTATAA	420
	AGGGTGGAGA AAACAAAAGA AATCATGAGT GTATCATTGA TGAAGACTGT GAAACAGGAA	480
	AGTATTGCCA GTTCTCCACC TTTGAATACA ACTGTCAGCC CTGTAAAACC CAGCATAAC	540
35	ACTGCTCACG AGATGTTGAA TGCTGCGGAG ACCAGCTTGG TGTGTTGGGGT GAGTGCAGGA	600
	AAGCCACTTC AAGAGGAGAA AATGGTACCA TTTGTGAGAA CCAACATGAC TGCAACCCAG	660
	GAACGTCCTG TGCTTTTCAG AAAGAAGTGC TGTTCTCTGT GTGCACTCCG TTACCCGAAG	720
40	AAGGTGAACC TTGCCATGAT CCTTCAAACA GACTTCTCAA CCTGATCACC TGGGAAGTGG	780
	AACCTGATGG AGTACTAGAG CGCTGCCCAT GTGCAAGTGG CTTGATCTGC CAACCTCAGA	840
	GCAGCCACAG TACTACATCT GTGTGTGAAC TGTCCTCCCA TGAAACCAGG AAAAAAGAAA	900
45	AAGAAGATCC CTGGAACATG GATGAGATGC CATTATCAG TTTAATACCC AGAGATATTC	960
	TTTCTGATTA CGAAGAAAGC AGCGTCATTC AGGAAGTGCG TAAAGAATTA GAAAGCCTGG	1020
	AGGACCAAGC AAGTGTGAAG TCTGAGCATG ACCCGGCTCA TGACCTATTT CTGGGAGATG	1080
50	AAATATGAAG TTCAAACACC AGTTTAGTTA GTCCTAGAAA TTGTTGCTCA GTGTCTTGCT	1140
	TACATACACC CTTAACAGAT ACTGCTGCAT AGAAGTGCAA TAAACATCTT CATTGAGCAT	1200
	CCGTTTTGCT GCACCAAACC TGCATGTTCA AATTCATGTT GAATTCACTC AATCTTTGGA	1260
55	CCAAACTTTC CATCAAAGAC AAATGAGAAA GGCATCAGTG TTTCCCTTGG ATTAATCCTT	1320
	TCCTTTGTAC AGCAGAAATA AACGTATCAG TACTCGTACT CATTAAAAAA ACACACGGAG	1380
60	 <b>CAT</b>	 <b>1383</b>

65