



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 438**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

**A61P 19/00** (2006.01)

**A61P 13/12** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03746281 .9**

96 Fecha de presentación : **28.03.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1529062**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.05.2005**

54

Título: **Composiciones para terapia de enfermedades asociadas con la expresión aberrante de Kremen y/o Wnt.**

30

Prioridad: **17.04.2002 EP 02008650**

73

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

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.04.2011**

72

Inventor/es: **Niehrs, Christof y  
Mao, Bingyu**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.04.2011**

74

Agente: **Justo Bailey, Mario de**

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

## DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a (a) una molécula nucleotídica que codifica un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 o (b) un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 para uso como medicamento.

La cascada de señales Wnt juega un papel crucial en lo que respecta a la regulación de la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células durante la embriogénesis, y en el adulto como se muestra, v.g., en *Drosophila*, *Xenopus* y ratones (Nusse y Varmus, Cell 69 (1992), 1073-1087). Los genes Wnt codifican glicoproteínas secretoras que activan una cascada de señales bien caracterizada por la vía de un receptor de Wnt denominado "frizzled (rizado)". Además de "frizzled", los Wnts utilizan correceptores constituidos por miembros de la familia de las proteínas afines al receptor de proteínas de baja densidad (LRP), LRP5 y LRP6 para transmitir sus señales (Zorn, Curr. Biol. 11 (2001), R592-595). Las LRP5 juegan papeles importantes en diversas enfermedades. Para la presente solicitud, merece destacarse que, en estudios recientes, ha podido identificarse una nueva familia de proteínas, Dkk ("Dickkopf"), que actúan como inhibidores de Wnt. DKK1 fija e inhibe el correceptor de Wnt LRP 5/6 (Zorn, Curr. Biol. 11 (2001), R592-595) y por tanto puede proporcionar una herramienta importante para diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con LRP5/6 (WO02092015). Otros miembros notables de efectores de esta cascada de señales son beta-catenina y el gen supresor de tumores APC (Miller y Moon, Genes Dev. 10 (1996), 2527-2539).

Nakamura et al. (2001) clonaron Kremen 1 de ratón (Krm1). La proteína de 473 aminoácidos deducida contiene una secuencia señal N-terminal, seguida por un dominio en anillo ("kringle"), un dominio WSC, un dominio CUB, un dominio transmembranal, y una cola intracelular C-terminal. El análisis por transferencia Northern detectó un transcrito de 5,0 kb en todos los tejidos de ratón examinados, con expresión máxima en corazón, pulmón, riñón, y músculos esqueléticos. Sin embargo, Nakamura no presentó efecto alguno de Krm1 sobre un mecanismo metabólico, es decir el camino wnt canónico. La cascada de señalización Wnt y sus componentes juegan un papel importante en diversas enfermedades, lo que hace deseable modular su actividad:

## i) Cáncer

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

## ii) Enfermedad ósea

Las señales Wnts promueven la formación de hueso (v.g. Yang, Development, 130 (2003), 1003-15; Fischer, J. Biol. Chem. 277 (2002) 30870-30878). Coherentemente con esta idea, una mutación de aumento de función del receptor de Wnt LRP5, que conduce a resistencia a la inhibición de Dkk1, causa enfermedad ósea grave (Boyden, et al., 346 (2002) N Engl J Med, 1613-21; Little, et al., 70 (2002) Am J Hum Genet, 11-9.). Inversamente, mutaciones desactivadoras en LRP5 conducen al síndrome osteoporosis-pseudoglioma en humanos (Kato, et al., 157 (2002) J Cell Biol, 303-14; Gong, et al., 107 (2001) Cell, 513-23.).

## iii) Enfermedad oftálmica

Una mutación desactivadora en el receptor de Wnt LRP5 conduce a pseudoglioma en humanos y malformaciones oftálmicas en los ratones (Kato, et al., 157 (2002) J Cell Biol, 303-314; Gong, et al., 107 (2001) Cell, 513-23.).

## iv) Riñón

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

## v) Metabolismo de lípidos y glucosa, obesidad

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

Así pues, está claro por lo anterior que la señalización Wnt/LRP y el antagonismo por dkks están implicados en una diversidad de enfermedades humanas. Se sabe poco acerca del mecanismo de modulación de la cascada de señales Wnt/LRP por los inhibidores de la familia dkk.

Por consiguiente, no estaban disponibles medios para la terapia de las enfermedades asociadas con una cascada de señales desregulada. Por tanto, el uso de marcadores moleculares fiables de diagnóstico podría ser útil para una comprensión de la base molecular de las enfermedades asociadas con una cascada de señales Wnt aberrante. Puede esperarse que dichos marcadores sean útiles también para terapia y para el desarrollo de nuevas vías terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades dependientes de la cascada de señales Wnt, como se ha detallado arriba.

Por tanto, el problema técnico subyacente de la presente invención es proporcionar medios para la terapia de enfermedades asociadas con una cascada de señales Wnt aberrante.

La solución a dicho problema técnico se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Durante los experimentos que condujeron a la presente invención, pudieron identificarse dos genes, *kremen 1* y *2*, cuyos productos se fijan con afinidad alta a los polipéptidos Dkk1 y Dkk2 que, a su vez, son moduladores de los receptores LRP5 y LRP6 de Wnt. Pudo demostrarse que esta fijación tiene relevancia fisiológica, dado que la cotransfección de células con *dkk1* así como *kremen 1* y *2* da como resultado una inhibición sinérgica de la activación de la cascada de señales Wnt. Estos datos demuestran que Kremen (1 y 2) puede considerarse como un receptor para los polipéptidos Dkk y que la función biológica de Kremen es la mediación de la inhibición de la cascada de señales Wnt-LRP por los polipéptidos Dkk. Los datos obtenidos proporcionan evidencia de que la expresión de *kremen* está muy extendida y que los genes que codifican Kremen están implicados en una diversidad de funciones biológicas. Así pues, Kremen es útil para el desarrollo de terapias para enfermedades mediadas por Wnt-LRP que incluyen, pero sin carácter limitante, supresión de tumores, formación de hueso, metabolismo de colesterol y glucosa (con inclusión de diabetes), obesidad, enfermedad renal y enfermedad oftálmica. Puede esperarse que, v.g., la inhibición de la cascada de señales Wnt por aumento de la expresión de *kremen* y/o por estimulación de la actividad del polipéptido propiamente dicho podría tener un efecto terapéutico. Análogamente, puede esperarse que, v.g., la activación de la cascada de señales Wnt por disminución de la expresión de *kremen* y/o por represión de la actividad del polipéptido propiamente dicho podría tener un efecto terapéutico. Por otra parte, el receptor de Kremen (o del gen que la codifica) puede considerarse como una diana de fármacos que permite la identificación de compuestos útiles para terapia.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Alineación multisequencia de ácido nucleico de cDNAs que codifican Kremen1 (krm1) y 2 (krm2) de ratón y humano

Krm1 y 2 se deducen de la secuencia del genoma humano en bases de datos públicas. Los nucleótidos idénticos están resaltados en negro. Todas las secuencias de ácido nucleico comienzan con el codón ATG iniciador de la traducción.

Figura 2: Alineación multisequencia de aminoácidos de las proteínas Kremen 1 y 2 deducidas de cDNAs de ratón y humanos (véase Figura 1)

Los aminoácidos idénticos están resaltados en negro, y los aminoácidos similares se representan en gris.

Figura 3: Kremen es un receptor de afinidad alta para Dkk1 y Dkk2

Se transfectaron células 293T con plásmidos de expresión dirigidos por el promotor del citomegalovirus (CMV) que codifican *mkrm1* (superior) o *mkrm2* (inferior) como se indica, se incubaron con Dkk1-AP, Dkk2-AP o Dkk3-AP recombinantes, y se tiñeron respecto a actividad de AP combinada. **ARRIBA:** Curvas de fijación y análisis Scatchard de las proteínas de fusión Dkk-AP que se fijan a las células *mkrm2* transfectadas. **ABAJO:** Curvas de fijación para Dkk-APs que se fijan a las células *mkrm1* transfectadas. Se indican las constantes de disociación ( $K_d$ ); **a, c:** Curvas de fijación; **b, d, e:** Análisis Scatchard.

Figura 4: Kremen y Dkk1 inhiben sinérgicamente la cascada de señales Wnt

Se transfectaron células de riñón 293 con el informador Wnt (TOP-FLASH) con o sin los genes indicados. Dos días después de la transfección, se determinó la actividad de luciferasa expresada. RLU: unidades relativas de luz (normalizadas contra luciferasa de *Renilla* cotransfectada). Xdkk1 = dkk1 de *Xenopus*; mkrm1,2 = kremen 1,2 de ratón; wnt = wnt1 de ratón, fz = frizzled8 de ratón; lrp6 = lrp6 humano.

Figura 5: Expresión de *kremen* en los ratones

Se analizó la expresión de *kremen 1* y *kremen 2* por RT-PCR en diversos tejidos de ratones adultos. Los resultados se normalizaron utilizando expresión constitutiva de la histona H4. Abreviaturas: -RT = muestra de control en la cual

se omitió la transcriptasa inversa; músculo sk = músculo esquelético; glándula mam. = glándula mamaria; H4 = Histona 4 como control de carga; mkrm1,2 = kremen 1,2 de ratón.

La presente invención se refiere a (a) una molécula nucleotídica que codifica un polipéptido Kremen1 y/o Kremen 2 o (b) un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 para uso como medicamento.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "polipéptido Kremen 1" y "polipéptido Kremen 2" se refiere no sólo a polipéptidos codificados por la secuencia de nucleótidos que se representa en Figura 1 y/o 2, sino también a polipéptidos que difieren en secuencia de amino-ácidos debido a inserción, delección y/o sustitución de uno o más aminoácidos y que muestran la actividad biológica de un receptor de Kremen 1 y/o Kremen 2, v.g. la capacidad de inhibición de la transducción de señales después de la fijación de wnt. Preferiblemente, los polipéptidos referidos son polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos exhibe una identidad de al menos 40%, en particular una identidad de al menos 65%, preferiblemente de al menos 80% y, de modo particularmente preferido, de al menos 90% con las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos codificados por las secuencias de nucleótidos que se muestran en las Figuras 1 ó 2.

La presente invención se refiere también al uso in vitro de una molécula nucleotídica que codifica un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 o un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2, para inhibir la cascada de señales Wnt, en donde dicha cascada wnt comprende Dkk1/Dkk2, LRP5/LRP6 y frizzled.

Finalmente, la presente invención se refiere también al uso de una molécula nucleotídica o polipéptido de acuerdo con la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer o tumorigénesis, enfermedad ósea, enfermedad oftálmica, trastornos renales, trastornos del metabolismo de lípidos y glucosa, y obesidad.

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

Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados, etc. son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Dichos vehículos pueden formularse por métodos convencionales y se pueden administrar al individuo a una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse por diferentes vías, v.g. por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La ruta de administración, por supuesto, depende de la naturaleza de la enfermedad y de la clase de compuesto contenido en la composición farmacéutica. El régimen de dosificación será determinado por el médico que atienda el caso y otros factores clínicos. Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, que incluyen el volumen del paciente, el área de la superficie corporal, la edad, el sexo, el compuesto particular a administrar, el tiempo y la vía de administración, la clase y fase de la enfermedad, v.g., tumor, estado general de salud y otros fármacos que se administren simultáneamente.

El suministro de las moléculas de ácido nucleico que modifican un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 puede realizarse por aplicación directa o, preferiblemente, por utilización de un vector de expresión recombinante tal como un virus químico que contenga estos compuestos o un sistema de dispersión coloidal. La aplicación directa al sitio diana puede realizarse, v.g., por suministro balístico, como un sistema de dispersión coloidal o por catéter a un sitio en una arteria. Los sistemas de dispersión coloidal que pueden utilizarse para suministro de las moléculas de ácido nucleico anteriores incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas de base lipídica que incluyen emulsiones de aceite en agua (mixtas), micelas, liposomas y lipoplexos. El sistema coloidal preferido es un liposoma. Pueden utilizarse liposomas específicos de órganos o específicos de células a fin de realizar el suministro solamente al tejido deseado. El direccionamiento de los liposomas puede ser realizado por la persona experta en la técnica mediante aplicación de métodos de conocimiento general. Este direccionamiento incluye direccionamiento pasivo (utilizando la tendencia natural de los liposomas a distribuirse a las células del RES en órganos que contienen capilares sinusoidales) o direccionamiento activo (por ejemplo por acoplamiento del liposoma a un ligando específico, v.g. un anticuerpo, un receptor, azúcar, glicolípido, proteína, etc., por métodos bien

conocidos). En la presente invención, se utilizan preferiblemente anticuerpos monoclonales para direccionar los liposomas a tejidos específicos, v.g. tejido tumoral, mediante ligandos específicos de la superficie celular.

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

Con objeto de conseguir la expresión únicamente en el órgano diana, v.g., un tumor a tratar, las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 pueden enlazarse a un promotor específico de tejido y utilizarse para terapia génica. Dichos promotores son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, v.g. Zimmermann et al., (1994) *Neuron* 12, 11-24; Vidal et al.; (1990) *EMBO J.* 9, 833-840; Mayford et al., (1995), *Cell* 81, 891-904; Pinkert et al., (1987) *Genes & Dev.* 1, 268-76).

Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

### Ejemplo 1

#### Aislamiento de cDNAs que codifican Kremen 1 y 2, respectivamente

Se utilizó una biblioteca de cDNA de embrión de ratón de 13,5 días en el vector de expresión pCMV-SPORT2 (Gibco BRL) para preparar agrupaciones de aproximadamente 250 colonias, y el DNA plasmídico de cada agrupación se transfirió transitoriamente a células 293T en placas de 24 pocillos utilizando FuGENE 6 (Roche). Después de 48 horas, se incubaron las células con medio que contenía la proteína de fusión Dkk1-fosfatasa alcalina (Dkk1-AP) 1 nM (Mao et al., *Nature* 411 (2001) 321-325) y se procesaron respecto a histoquímica de AP. A partir de 1500 agrupaciones, se identificaron dos agrupaciones positivas y se aislaron clones simples por selección de consanguinidad. El análisis de secuenciación demostró que aquéllos representan aislados independientes de *mkremen 2*. Se aisló un clon de ratón de longitud total *Kremen1* de la misma biblioteca por PCR utilizando datos publicados de secuencias de nucleótidos (Nakamura et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1518 (2001), 63-72). El marco de lectura abierto de *mkremen 1* y 2 se clonó en pCS2+ para generar pCS2-mkrem 1 y -2. Se construyó pCS-flag-mkrm2 por inserción de un epítipo flag ("bandera") detrás del péptido señal y se utilizó como molde para generar el pCS-flag-mkrm2ΔWSC por PCR.

### Ejemplo 2

#### La fijación de Kremen 1 y 2 a Dkk1 y Dkk2 muestra afinidad alta y es fisiológicamente relevante

Para los ensayos de fijación, se transfectaron (T) células 293T con *mkrm1* o *mkrm2* como se indica, se incubaron con la proteína de fusión recombinante Dkk1-fosfatasa alcalina (Dkk1-AP) o fosfatasa alcalina (AP) y se tiñeron respecto a actividad de AP combinada. Los resultados se muestran en la Figura 3.

Como se muestra en la Figura 4, los ensayos de informadores de Wnt de luciferasa en las células 293T se realizaron en placas de 96 pocillos al menos por triplicado como se ha descrito (Wu et al., *Curr Biol* 10 (2000), 1611-1614). La actividad de luciferasa se normalizó contra la actividad de Renilla utilizando un kit comercial (Clontech). Xdkk1= *Xenopus dkk1* (Glinka, et al. *Nature* 391, (1998) 357-362); mkrm1,2= kremen 1,2 de ratón; wnt= wnt1 de ratón; fz= *frizzled8* de ratón; lrp6= lrp6 humano (Tamai, et al., *Nature* 407 (2000) 530-535); informador Wnt de luciferasa TOP-FLASH (Korinek et al. *Science* 275 (1997) 1784-1787).

Como se muestra en la Figura 3, la fijación de la proteína de fusión Dkk-fosfatasa alcalina a Kremen 2 y Kremen 1, respectivamente, muestra afinidad alta. Adicionalmente, pudo demostrarse que únicamente Dkk1 y Dkk2 se fijan a Kremen, pero no Dkk3.

En un experimento adicional, se transfectaron células 293 de riñón con el informador de Wnt (TOP-FLASH) con o sin los genes indicados. Dos días después de la transfección, se determinó la actividad de luciferasa expresada. Como se muestra en la Figura 4, la cotransfección de Wnt y su receptor, *frizzled* (fz) da como resultado la estimulación de la cascada de señales Wnt (véase Figura 4, pista 1 frente a pista 2) y la cotransfección de *dkk1* y *kremen 1* y *kremen 2* conduce a una inhibición sinérgica de esta activación de la cascada de señales Wnt. Este efecto es aún más acusado si Wnt se ha cotransfectado con su receptor *frizzled* (fz) y el correceptor Lrp6. Puede observarse una activación muy fuerte de la cascada de señales Wnt (pista 8). Esta activación puede ser inhibida únicamente por cotransfección con *dkk1* y *kremen 1,2* (pistas 12 y 13) pero no por transfección con los genes individuales (*dkk1*, pista 9; *kremen 2*, pista 10; *kremen 1*, pista 11).

### Ejemplo 3

#### Determinación del perfil de expresión de *kremen 1* y *2* en diversos tejidos de ratón

Se estudió la expresión de *Kremen 1* y *2* en diversos tejidos de ratones por RT-PCR. Se llevaron a cabo el aislamiento del RNA de órganos de ratón adulto y ensayos RT-PCR en la fase lineal de amplificación y con iniciadores de histona 4 como se ha descrito (Glinka et al., Nature 389 (1997), 517-519). Otros iniciadores fueron: *mkrm1* (directo, GTGCTTCACAGCCAACGGTGCA; inverso, ACGTAGCACCAAGGGCTCACGT); *mkrm2* (directo, AGGGAAACTGGTCGGCTC; inverso, AAGGCACGGAGTAGGTTGC).

Los núms. de ciclos fueron *H4*: 26 ciclos; *mkrm1*: 35 ciclos; *mkrm2*: 32 ciclos. Los resultados demuestran que ambos *kremens* se expresan en todos los tejidos de ratón testados, pero con nivel de expresión variable (Figura 5). Se obtuvieron resultados similares utilizando embriones de *Xenopus*.

**REIVINDICACIONES**

1. Molécula nucleotídica que codifica un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 o un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 para uso como medicamento.
- 5 2. Uso de la molécula nucleotídica o el polipéptido de la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer, tumorigénesis, enfermedad ósea, enfermedad oftálmica, trastornos renales, trastornos del metabolismo de lípidos y glucosa u obesidad.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica está destinada al tratamiento del cáncer de colon, cáncer de mama o melanoma.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la composición farmacéutica está destinada al tratamiento de enfermedad ósea grave o síndrome osteoporosis-pseudoglioma.
- 10 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la composición farmacéutica está destinada al tratamiento del pseudoglioma.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la composición farmacéutica está destinada al tratamiento de fibrosis renal o enfermedad poliquística renal.
- 15 7. Uso in vitro de una molécula nucleotídica que codifica un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2, o un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2, para inhibir la cascada de señales Wnt, en donde dicha cascada wnt comprende Dkk1/Dkk2, LRP5/LRP6 y "frizzled".

|       |                       |                       |                       |                     |     |
|-------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|-----|
| mkrm1 | - - - - - A           | T G G C G C G G C C   | C G C C G G C C G T   | C . . T C G C G C T | 29  |
| hkrm1 | - - - - - A           | T G G C G C G G C C   | A G G C C G G C C G C | C . . T C G C C C T | 29  |
| mkrm2 | A T G G G G A C A C   | C A C A T C T G C A   | G G G C T T C C T C   | . . . C T C C T C T | 37  |
| hkrm2 | A T G G G G A C A C   | A A G C C C T G C A   | G G G C T T C C T C   | T T T C T C C T C T | 40  |
| mkrm1 | G C T C T C G G C C   | G C T G C G C T C A   | C T C T G G . . . .   | C G G C C C G G C C | 65  |
| hkrm1 | G C T C T C G G C C   | G C T G C G C T C A   | C G G T G G . . . .   | C G G C C C G G C C | 65  |
| mkrm2 | T C C C A T T G G T   | G C T G C G G C T G   | C A C G G G G C C T   | C A G C A G G G A G | 77  |
| hkrm2 | T C C T C C G G C T   | G C T G C A G C C G   | C G T G G G G C C T   | C G G C T G G G A G | 80  |
| mkrm1 | G G C G G C C G G T   | C C C G G C T C C G   | G C C C C G A G T G   | C T T C A C A G C C | 105 |
| hkrm1 | C G C G G C C A G T   | C C C G G C C T C G   | G C C C C G A G T G   | T T T C A C A G C C | 105 |
| mkrm2 | C C T G C A C A G T   | C C A G G C C T T G   | . . . T C C G A A T G | C T T C C A G C T G | 114 |
| hkrm2 | C C T G C A C A G T   | C C A G G C C T T G   | . . . T C C G A A T G | C T T C C A G G T G | 117 |
| mkrm1 | A A C G G T G C A G   | A T T A C A G G G G   | A A C A C A G A G C   | T G G A C A G C G C | 145 |
| hkrm1 | A A T G G T G C G G   | A T T A C A G G G G   | A A C A C A G A A C   | T G G A C A G C A C | 145 |
| mkrm2 | A A C G G G C G C G   | A C T A C C G G G G   | C A C A C A G A A C   | T A G A C A G G C C | 154 |
| hkrm2 | A A T G G G C C T G   | A C T A C C G G G G   | C A C A C A G A A C   | C G G A C T G G C C | 157 |
| mkrm1 | T G C A . A G G . .   | T G G G A A G C C A   | T G T C T G T T C T   | G G A A C G A G A C | 182 |
| hkrm1 | T A C A . A G G . .   | C G G G A A G C C A   | T G T C T G T T C T   | G G A A C G A G A C | 182 |
| mkrm2 | C A C G C G G A G C   | T G G A C G C C C G   | T G T C T T T T C T   | G G G A C C A G A C | 194 |
| hkrm2 | C G C G G G G G C     | G G G C G C C C G     | T G G C T C T T G T   | G G G A C C A G A C | 197 |
| mkrm1 | T T T C C A G C A T   | C C G T A C A C A C   | C G C T G A A G T A   | C C C C A A C G G G | 222 |
| hkrm1 | T T T C C A G C A T   | C C A T A C A A C A   | C T C T G A A A T A   | C C C C A A C G G G | 222 |
| mkrm2 | A C A G C A G C A C   | A G C T A C A G C A   | G C G C C A G C G A   | C C C C C A G G G C | 234 |
| hkrm2 | G C A G C A A C A C   | A G C T A C A G C A   | G C G C C A G C G A   | C C C C C A C G G C | 237 |
| mkrm1 | G A A G G A G G A C   | T G G G T G A G C A   | C A A T T A T T G C   | A G A A A T C C A G | 262 |
| hkrm1 | G A G G G G C C C     | T G G G T G A G C A   | C A A C T A T T G C   | A G A A A T C C A G | 262 |
| mkrm2 | C G C T G G G G G T   | T G G G T G C G C A   | T A A C T T C T G T   | A G G A A C C C A G | 274 |
| hkrm2 | C G C T G G G G G C   | T G G G C G C G C A   | C A A C T T C T G C   | C G T A A C C C A G | 277 |
| mkrm1 | A T G G A G A C G T   | G A G C C C C T G G   | T G C T A C G T G G   | C C G A G C A T G A | 302 |
| hkrm1 | A T G G T G A C G T   | G C A G C C C T G G   | T G C T A C G T G G   | C A G A G A C A G A | 302 |
| mkrm2 | A C G G T G A C G T   | G C A G C C C T G G   | T G C T A C G T G G   | C A G A G A C A G A | 314 |
| hkrm2 | A C G G T G A C G T   | G C A G C C C T G G   | T G C T A C G T G G   | C T G A G A C A G A | 317 |
| mkrm1 | G G A C G G A G T C   | T A C T G G A A C T   | A C T G T G A A A T   | T C C T G C C T G C | 342 |
| hkrm1 | G G A G G G C A T C   | T A C T G G A A C T   | A C T G T G A A A T   | A C C C T G C C T G | 342 |
| mkrm2 | G G A G G G C A T C   | T A C T G G C G C T   | A C T G T G A A A T   | C C C C C A C A T G | 354 |
| hkrm2 | G G A G G G C A T C   | T A C T G G C G C T   | A C T G C G A C A T   | C C C C C A C A T G | 357 |
| mkrm1 | C A G A T G C C T G   | G A A A C C T T G G   | C T G C T A C A A G   | G A T C A T G G A A | 382 |
| hkrm1 | C A G A T G C C T G   | G A A A C C T T G G   | C T G C T A C A A G   | G A T C A T G G A A | 382 |
| mkrm2 | C A C A T G C C T G   | G C T A C C T T G G   | C T G C T T C G T G   | G A C T C T G G G G | 394 |
| hkrm2 | C A C A T G C C A G   | G C T A C C T T G G   | A T G C T T T G T G   | G A C T C A G G G G | 397 |
| mkrm1 | A C C C A C C T C C   | T C T C A C G G G C   | A C C A G T A A A A   | C C T C T A C A A A | 422 |
| hkrm1 | A C C C A C C T C C   | T C T C A C T G G C   | A C C A G T A A A A   | C C T C C A C A A A | 422 |
| mkrm2 | C A C C C C C A G C   | T C T C A G T G G T   | C C C A G T G G C A   | C C C C C A C A A A | 434 |
| hkrm2 | C A C C C C C A G C   | C C T C A G C G C C   | C C C A G T G G C A   | C C C C C A C A A A | 437 |
| mkrm1 | G C T C A G C A T A   | C A A A C C T G T A   | T C A G C T T C T G   | T C G G A G T C A G | 462 |
| hkrm1 | A C T C A C C A T A   | C A A A C T T G C A   | T C A G T T T T T G   | T C G G A G T C A G | 462 |
| mkrm2 | G C T C A C C T G T C | C A A G T G T G C C   | T T C G A T T C T G   | C C C C A T G A A G | 474 |
| hkrm2 | G C T C A C C G T C   | C A G G T G T G C C   | T T A C G C T T C T G | C C C C A T G A A G | 477 |
| mkrm1 | A G A T T C A A G T   | T T G C T G G G A T   | G G A G T C A G G C   | T A T G C C T G C T | 502 |
| hkrm1 | A G G T T C A A G T   | T T G C T G G G A T   | G G A G T C A G G C   | T A T G C C T G C T | 502 |
| mkrm2 | G G C T A C C A G C   | T T G C T G G G T G T | G G A G G C C T G G T | T A T G C C T G C T | 514 |
| hkrm2 | G G G T A C C A G C   | T T G C C G G C G T   | G G A G G C C G G T   | T A C G C C T G C T | 517 |
| mkrm1 | T C T G T G G A A A   | C A A T C C T G A C   | T A C T G G A A G C   | A C G G G G A G G C | 542 |
| hkrm1 | T C T G T G G A A A   | C A A T C C T G A C   | T A C T G G A A G T   | A C G G G G A G G C | 542 |
| mkrm2 | T C T G T G G C T C   | T G A A A G T G A C   | C T G G C C C G C G   | G A G G T C C A G C | 554 |
| hkrm2 | T C T G T G G C T C   | T G A A A G C G A C   | C T G G C C C G G G   | G A C G C C T G G C | 557 |
| mkrm1 | G G C C A G C A C C   | G A G T G C A A T A   | G T G T C T G C T T   | C G G G G A C C A C | 582 |
| hkrm1 | A G C C A G T A C C   | G A A T G C A A A C   | G C G T C T G C T T   | C G G G G A C C A C | 582 |
| mkrm2 | C C C C C C A C C     | G A C T G T G A C C   | A G A T C T G T T T   | T G G G C C A C C A | 594 |
| hkrm2 | C C C C C C A C C     | G A G T G T G A C C   | A G A T C T G T T T   | C G G C C A C C C T | 597 |

Alineación múltiple de DNAs de kremen de ratón y humanos (3-1)

Fig. 1 a



|       |                     |                       |                     |                     |      |
|-------|---------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|------|
| mkrm1 | A C G C A G C C T   | G C G G T G G G G A   | G G G C A G G A T T | A T C C T C T T T G | 622  |
| hkrm1 | A C C C A G C C T   | G T G G T G G G G A   | T G G C A G G A T T | A T C C T C T T T G | 622  |
| mkrm2 | G G C C A G C C T   | G T G G A G G G G A   | T G G A C G G A T T | G G C A T C T A T G | 634  |
| hkrm2 | G G A C A G C C T   | G T G C C G G G G A   | T G G C G G G C T G | G G C G T C T A T G | 637  |
| mkrm1 | A C A C T C T C G T | G G G C G C C T G C   | G G T G G G A A C T | A C T C A G C C A T | 662  |
| hkrm1 | A C A C T C T C G T | G G G C G C C T G C   | G G T G G G A A C T | A C T C A G C C A T | 662  |
| mkrm2 | A A G T G T C T G T | G G G C T C C T G C   | C A G G G A A A C T | G G T C G G G T C C | 674  |
| hkrm2 | A A G T G T C T G T | G G G C T C C T G C   | C A G G G A A A C T | G G A C A G C C C   | 677  |
| mkrm1 | G G C A G C C G T G | G T G T A T C T C C C | C T G A G T T C C G | T G A C A C C T A C | 702  |
| hkrm1 | G T C T T C T C T G | A T C T A C T C C C C | C G G A T T T T C C | G G A C A C C T A T | 702  |
| mkrm2 | T C A A G G A G T C | A T C T A C T C C C C | C G G A T T T T C C | G G A C A C C T A T | 714  |
| hkrm2 | T C A G G G C G T C | A T C T A C T C C C C | C G G A T T T T C C | G G A C A G A T A C | 717  |
| mkrm1 | G C C A C T G G G A | G A G T C T C C T A   | C T G G A C C A T C | C G G G T T C C A G | 742  |
| hkrm1 | G C C A C T G G G A | G G G T C T C C T A   | C T G G A C C A T C | C G G G T T C C G G | 742  |
| mkrm2 | G G A C C A G A C C | G G A A C T G G A G   | C T G G G T A T T G | G G C C A A C T G G | 754  |
| hkrm2 | G G G C C G G A C C | G G A A C T G G A G   | C T G G G C C C T G | G G C C C G C A G   | 757  |
| mkrm1 | G A G C C T C T C G | C A T C C A C T T C   | A A C T T C A C C C | T G T T T G A T A T | 782  |
| hkrm1 | G G G C C T C C C A | C A T C C A C T T C   | A A C T T C C C C C | T A T T T G A C A T | 782  |
| mkrm2 | G G G C C G C G C   | T A G A A C T C       | A C C T T C C G C C | T C T T T G A G T T | 791  |
| hkrm2 | G C G C C G C G C   | T G G A G C T C       | A C C T T C C G C C | T G T T C G A G C T | 794  |
| mkrm1 | C A G G G A G T C T | G C A G A C A T G G   | T G G A G C T G C T | G G A C G G C T A C | 822  |
| hkrm1 | C A G G G A C T C G | G C G G A C A T G G   | T G G A G C T T C T | G G A T G G C T A C | 822  |
| mkrm2 | G G C T G A T T C T | C G A G A C C G G C   | T G G A G C T A C G | C G A C G T C T . . | 829  |
| hkrm2 | G G C T G A C C E G | C G C G A C C G G C   | T G G A G C T G C G | C G A C . . .       | 832  |
| mkrm1 | A C C C A C C G C G | T C C T G G T C C G   | G C T C A G T G G G | A G G A G C C G C C | 862  |
| hkrm1 | A C C C A C C G T G | T C C T A G G C C G   | C T T C C A C G G G | A G G A G C C G C C | 862  |
| mkrm2 | C G T C C G G C A   | A C C T A C T C C G   | T G C C T T C G A C | G G C C C C C A T C | 868  |
| hkrm2 | C T T C C G G C A   | G C C T G C T C C G   | C G C C T T C G A T | G G C C C C C G C   | 871  |
| mkrm1 | G G C C T C T G T C | T T T C A A T G T C   | T C T C T G G A T T | T T G T C A T T T T | 902  |
| hkrm1 | G A C C C T C T G T | C T T C A A E G T C   | T C T C T G G A C T | T C G T C A T C T T | 902  |
| mkrm2 | G G G C C G C C T C | G G G A C C G G T G   | C G G C T G C G C A | C T G C T G C G C T | 908  |
| hkrm2 | G A C C G C C G T G | C G G C C C G G T G   | C G C C T G G G C A | C T G C C G C G C T | 911  |
| mkrm1 | G T A T T T C T T C | T C T G A T C G C A   | T C A A T C A G C C | C C A G G G A T T T | 942  |
| hkrm1 | G T A T T T C T T C | T C T G A T C G C A   | T C A A T C A G C C | C C A G G G A T T T | 942  |
| mkrm2 | G C T G C T C A C G | T T C C G C A G G G   | A G G C A A G A G G | C C A T G . . C T C | 946  |
| hkrm2 | G C T G C T C A C G | T T C C G A A G G G   | A G G C G C G G G G | C C A C G . . C G C | 949  |
| mkrm1 | G C T G T G T T G T | A G C A A G G C A C   | G A A G G A G A A A | C C G C C A G A G G | 982  |
| hkrm1 | G C T G T T T T A T | A G C A A G G C C T   | G A A G G A G A A A | C T G C C A G A G G | 982  |
| mkrm2 | A A G G G T T C G C | G G T C A C C T A C   | C G C G G C T G C   | A G G A T A C A G T | 986  |
| hkrm2 | A A G G C T T C G C | G G T C A G C T A C   | C G C G G C T G C   | A G G A C G C C C   | 989  |
| mkrm1 | A G A G A C C T G C | T G T C A A C C A G   | A C C C T G G C A G | A G G T G A T C A C | 1022 |
| hkrm1 | A G A G G G C C C G | T G T C A A C C A G   | A C C C T G G C C G | A G G T G A T C A C | 1022 |
| mkrm2 | G G A G G G C C A G | G C A T G T C C A G   | A G G A T T C A A   | C T G A G A T C T   | 1025 |
| hkrm2 | T G A G G A C C C A | G A G G C C C C G G   | A G G G C T C G G   | C C C A G A C C C   | 1028 |
| mkrm1 | G G A G C A A G C C | A A C C T C A G T G   | T C A G C C C T G C | C C A C T C C T C C | 1062 |
| hkrm1 | G G A G C A G G C C | A A C C T C A G T G   | T C A G C C C T G C | C C G G T C C T C C | 1062 |
| mkrm2 | C G C A G G G G A G | C G C G A T G G G G   | C T A A C G C G A G | C T G C A G C C C   | 1065 |
| hkrm2 | C G C G G C G C C G | C T C G A C G G G G   | C C A A C G T G A G | C T G C A G C C C   | 1068 |
| mkrm1 | A A A G T C C T C T | A T G T C A T C A C   | C C C C A G C C C C | A G C C A C C C C T | 1102 |
| hkrm1 | A A A G T C C T C T | A T G T C A T C A C   | C A G C C A G C C C | A G C C A C C C C A | 1102 |
| mkrm2 | A A G . . . C C C   | G G A G G T G A G     | A G G C T T G G A T | A G C T G C C C G A | 1101 |
| hkrm2 | A A G . . . C C C   | G G G G G T G C G     | C G G C C G G A T   | T G G G C C C G G   | 1104 |
| mkrm1 | C G C A G A C T G C | C C C A G G T A G G   | C A T T C C T G G G | C A C C G T C A G T | 1142 |
| hkrm1 | C T C A G A C T G T | C C C A G G T A G G   | A A T T C C T G G G | C G C C A C C C A T | 1142 |
| mkrm2 | G T C T T C T C C A | C G G T G A C G G C   | C T T C T G T G T G | C T G C T G C T G T | 1141 |
| hkrm2 | G T C T T C T C G A | C G G T G A C G G C   | T G T C T G G T G   | C T G C T G C T G C | 1144 |
| mkrm1 | T G G G G C A A C   | A G C C A C A G A G   | T G G A A G G A T G | G A C T G T G T A C | 1182 |
| hkrm1 | G G G G G C T G G A | A G C C A C A G A G   | T T G A A G G A T G | G A C A G T C T A T | 1182 |
| mkrm2 | T G C T C C T G T C | C C T A C T G C G T   | T T G C T G C G T C | G A C G G . . .     | 1176 |
| hkrm2 | T G C T C C T G G G | G C T G C T G C G T   | C G C T G C G C C   | G A C G G T G C G G | 1184 |

Alineación múltiple de DNAs de kremen de ratón y humanos (3-2)

Fig. 1 b

```

mkrm1  G G C C T G G C G A   C C C T C C T G A T   C C T C A C A G T C   A C A G C A G T T G   1222
hkrm1  G G T C T G G C A A   C T C T C C T G A T   C C T C A C A G T C   A C A G C C A T T G   1222
mkrm2  . . . . . . . . . .   . . . . . . . . . .   . . . . . . . . . .   . . . . . . . . . .   1181
hkrm2  G G C G C T G G G G   C A G G G C C T G A   G G G C G G A . C C   G G T G G A G C T G   1223

mkrm1  T C G G A A A G A T   T C T T G T G C A T   G T C A C A T T T A   A A T C T C A T G G   1262
hkrm1  T A G C A A A G A T   T A C T C T G G A G   G T C A C A T T T A   A A T C C C A T C G   1262
mkrm2  T C T G C T G G C T   C C A G G A A A A G   G G T C T C T G G C   C A T G G G A C C T   1221
hkrm2  T C T G C T G G C T   C C G G G A A A A G   G G C C C C C G G C   G C T G G G G G C T   1263

mkrm1  A G T C C C T G C A   T C A G G A G A C C   T T A G G G A C T G   T C G T C A G C C T   1302
hkrm1  T G T T C C T G C T   T C A G G G G G A C   T T A G G G A T T G   T C A T C A A C C A   1302
mkrm2  T C C G G G G C C C   G C G G G A G A A G   C T G G G C T G T G   T G G T A C C G C C   1261
hkrm2  T C C A G G G G C C   C C A G G A G A A G   C T G G G C T G T G   T G G T A C C A A C   1303

mkrm1  G G G G C T T C T G   G A G A T A T C T G   G A C G A T T T T C   T A T G A A G C T T   1342
hkrm1  G G G A C T T C G G   G G G A A A T C T G   G A G C A T T T T T   T A C A A G C C T T   1342
mkrm2  G G C G C C G A G G   G G T G G C C C T G   C C C T G T C C C C   C A G G G G A C T C   1301
hkrm2  A G C G C C G A G G   G G T G G C C T T G   G C C T G G T C C C   G C G G G G A C C C   1343

mkrm1  C C A . . C T A C A   A T C T C C A T C T   T T A A G A A G A A   G C T C A A G G G T   1380
hkrm1  C C A . . C T T C A   A T T T C C A T C T   T T A A G A A G A A   A C T C A A G G G T   1380
mkrm2  T C A G G C T G A G   G G T C C T G C T G   C G G G C T A C C G   T C C C C T G A G T   1341
hkrm2  C C A G G C T G A G   G G T T C T G C C G   C G G G C T A C C G   G C C T C T G A G T   1383

mkrm1  C A G A G T C A A C   A A G A T G A C C G   C A A T C C C C T C   G T G A G T G A C T   1420
hkrm1  C A G A G T C A A C   A A G A T G A C C G   C A A T C C C C T T   G T G A G T G A C T   1420
mkrm2  G C C T C C A G C C   A G A G C T C C T T   G C G C T C C C T C   G T C T C T G C T C   1381
hkrm2  G C C T C C A G C C   A G A G C T C C C T   G G G C T G G C T C   A T C T C C G C T C   1423

mkrm1  G A - - -   1422
hkrm1  A A - - -   1422
mkrm2  T C T G A   1386
hkrm2  T C T G A   1428

```

Alineación múltiple de DNAs de kremen de ratón y humanos (3-3)

Fig. 1 c

```

mkrm1 1 MAPPAAARLALLSAAALTLAARPAFGPRS.GP...ECFTANGADYRGTSQNTALQG
hkrml 1 MAPPAAARLALLSAAALTLAARPAFGPRS.GP...ECFTANGADYRGTSQNTALQG
mkrm2 1 MGTBHLQGFLLFLPLLR.LEGASAGSLHSPGLSECFQVNGADYRGHONRTQPRG
hkrml 1 MGTQALQGFLLFLPLLR.LEGASAGSLHSPGLSECFQVNGADYRGHONRTQPRG

mkrm1 52 .GKPCLEFNETFOHPYNELKYPNGEGGLGEHNYCRNPDGDVSPWCYVAEESDGVY
hkrml 52 .GKPCLEFNETFOHPYNELKYPNGEGGLGEHNYCRNPDGDVSPWCYVAEESDGVY
mkrm2 55 AGRPCLEFWDQTQOHSYSSASDPQGRWGLGAHNECRNPDGDVQPCYVAETEEGHV
hkrml 56 AGRPCLEFWDQTQOHSYSSASDPHGRWGLGAHNECRNPDGDVQPCYVAETEEGHV

mkrm1 106 WKYCEIPACOMPENLGCIYKDHGNPPPLTGTSTSNKLTQTCISFCRSQRKFKAG
hkrml 106 WKYCEIPACOMPENLGCIYKDHGNPPPLTGTSTSNKLTQTCISFCRSQRKFKAG
mkrm2 110 WKYCEIPTCHMPGYLGCEVDSGAPPALSGPSGTSTKLTQVQVCLRFRCMKGKQLAG
hkrml 111 WKYCEIPTCHMPGYLGCEVDSGAPPALSGPSGTSTKLTQVQVCLRFRCMKGKQLAG

mkrm1 161 MESGYACFCGNNPDYWKYGEAASTEENSVCFGDHTQPCGGDGRHILEDTLVGACG
hkrml 161 MESGYACFCGNNPDYWKYGEAASTEENSVCFGDHTQPCGGDGRHILEDTLVGACG
mkrm2 165 VEAGYACFCGSESDLAGRPPATDCDQICFGHPGQLCGGDGRLGIVEVSVGSQ
hkrml 166 VEAGYACFCGSESDLAGRPPATDCDQICFGHPGQLCGGDGRLGIVEVSVGSQ

mkrm1 216 GNYSAAMAVYSPDFPDYATGRVCIYTIIRVPGASRIHFNETLFOTRDSADMVEL
hkrml 216 GNYSAMSSVYSPDFPDYATGRVCIYTIIRVPGASRIHFNETLFOTRDSADMVEL
mkrm2 220 GNYSAPOGVYSPDFPDYATGRVCIYTIIRVPGASRIHFNETLFOTRDSADMVEL
hkrml 221 GNYSAPOGVYSPDFPDYATGRVCIYTIIRVPGASRIHFNETLFOTRDSADMVEL

mkrm1 271 LDGYTHRYVLRSLGRSRPP.LSFNVSLDFVLYFFSDRINQAQGFALVQATKEE
hkrml 271 LDGYTHRYVLRSLGRSRPP.LSFNVSLDFVLYFFSDRINQAQGFALVQATKEE
mkrm2 274 RDVSSGNILRAFDGARPPPGPLRRTAALLLTERSDARGHAQGFALTVRGLQET
hkrml 275 RDVSSGNILRAFDGARPPPGPLRRTAALLLTERSDARGHAQGFALTVRGLQET

mkrm1 325 PPOERPAVNOTVAEVIITEQANLSVSAARSSKVLYVITTPSPSHPPQTAPGSHSWAP
hkrml 325 PPOERPAVNOTVAEVIITEQANLSVSAARSSKVLYVITTPSPSHPPQTAPGSHSWAP
mkrm2 329 VE.....GRASPEDSTESLAGDEPDGAN.....ASCSP.....KPG....AA
hkrml 330 AE.....DPEAPEGSAQTFAAPEDGAN.....VSCSP.....KPG....AP

mkrm1 380 SVGANSRVEGWTVVGTATLLILTVTAIVAKILLHVT.....FKSHRVPASG.
hkrml 380 PMGAGSRVEGWTVVGTATLLILTVTAIVAKILLHVT.....FKSHRVPASG.
mkrm2 361 QASIGAEVFTVTAESVLLLLGLLRLRRRS.....CLLAPGKGS
hkrml 362 PAAIGAEVFTVTAESVLLLLGLLRLRRRCGAEQGLRADRNCLLAPGKGP

mkrm1 427 .DTRDCROPGASGDIWTTFVEFSTTSTSTFKKKLKGQSQ..QDDRNFLVSD----
hkrml 427 .DTRDCROPCTSGEIVSTFVKFSTSTSTFKKKLKGQSQ..QDDRNFLVSD----
mkrm2 403 LAMGPSRGPGRS...WAWMYRPRGVAPCPPGDSQAECPAAGYRPLSASSQSSSL
hkrml 417 PALGASRGPGRS...WAWMYRPRGVAPCPPGDPQAECPAAGYRPLSASSQSSSL

mkrm1 474 -----
hkrml 474 -----
mkrm2 455 RSLVSAL
hkrml 469 RSLVSAL

```

Alineación múltiple de proteínas kremen de ratón y humanas

Fig. 2

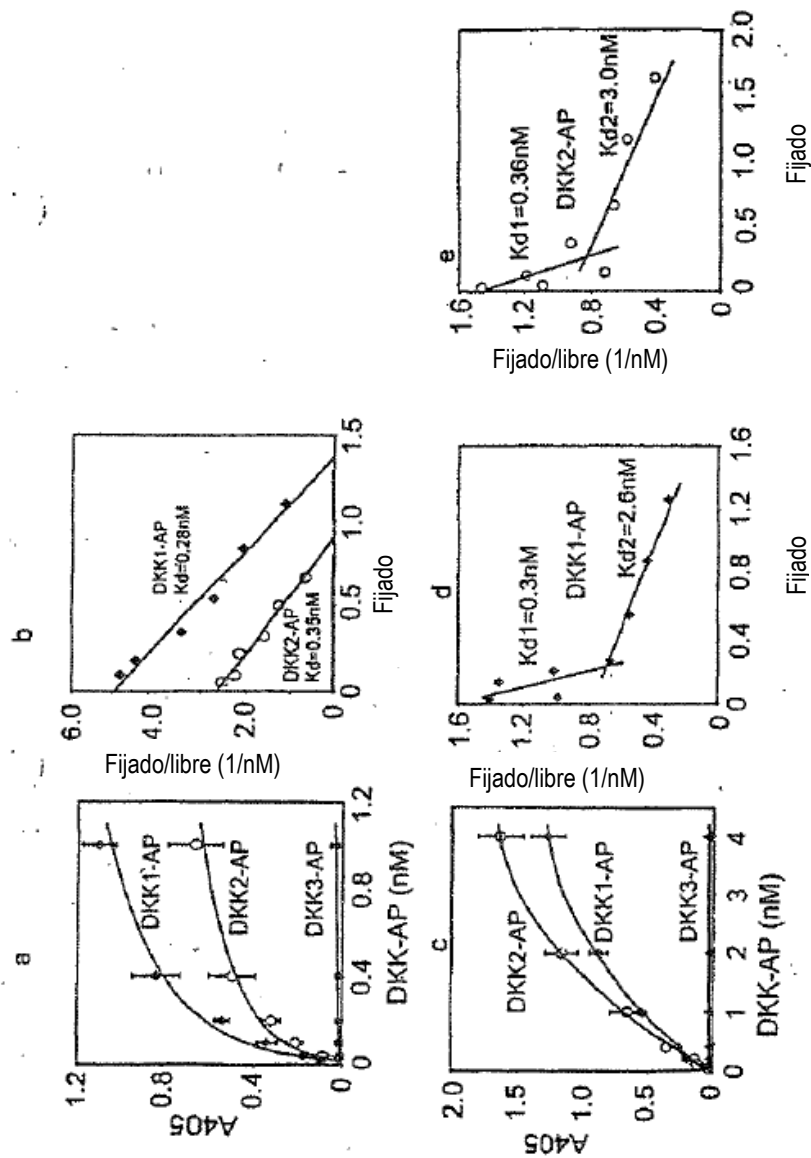


Fig. 3

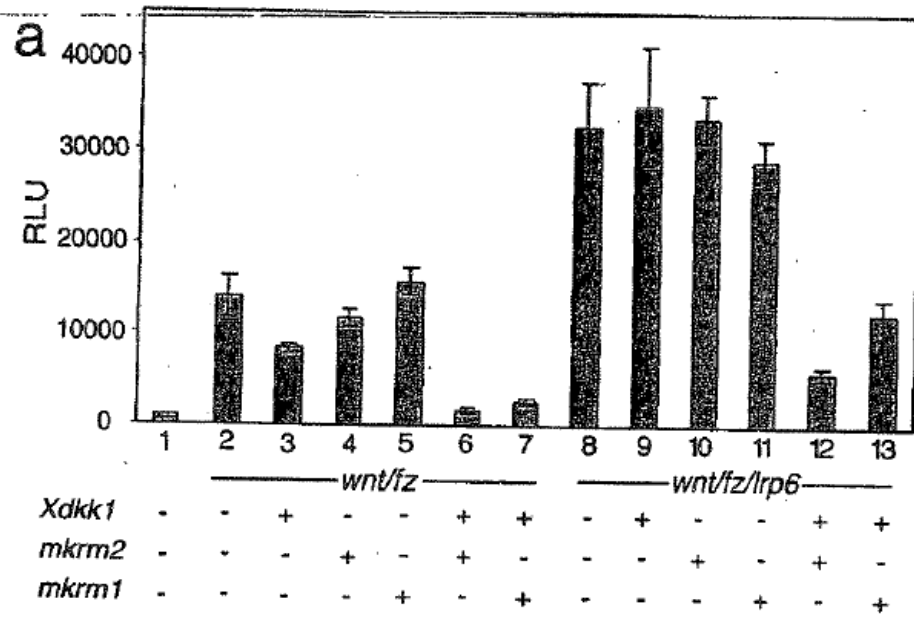


Fig. 4

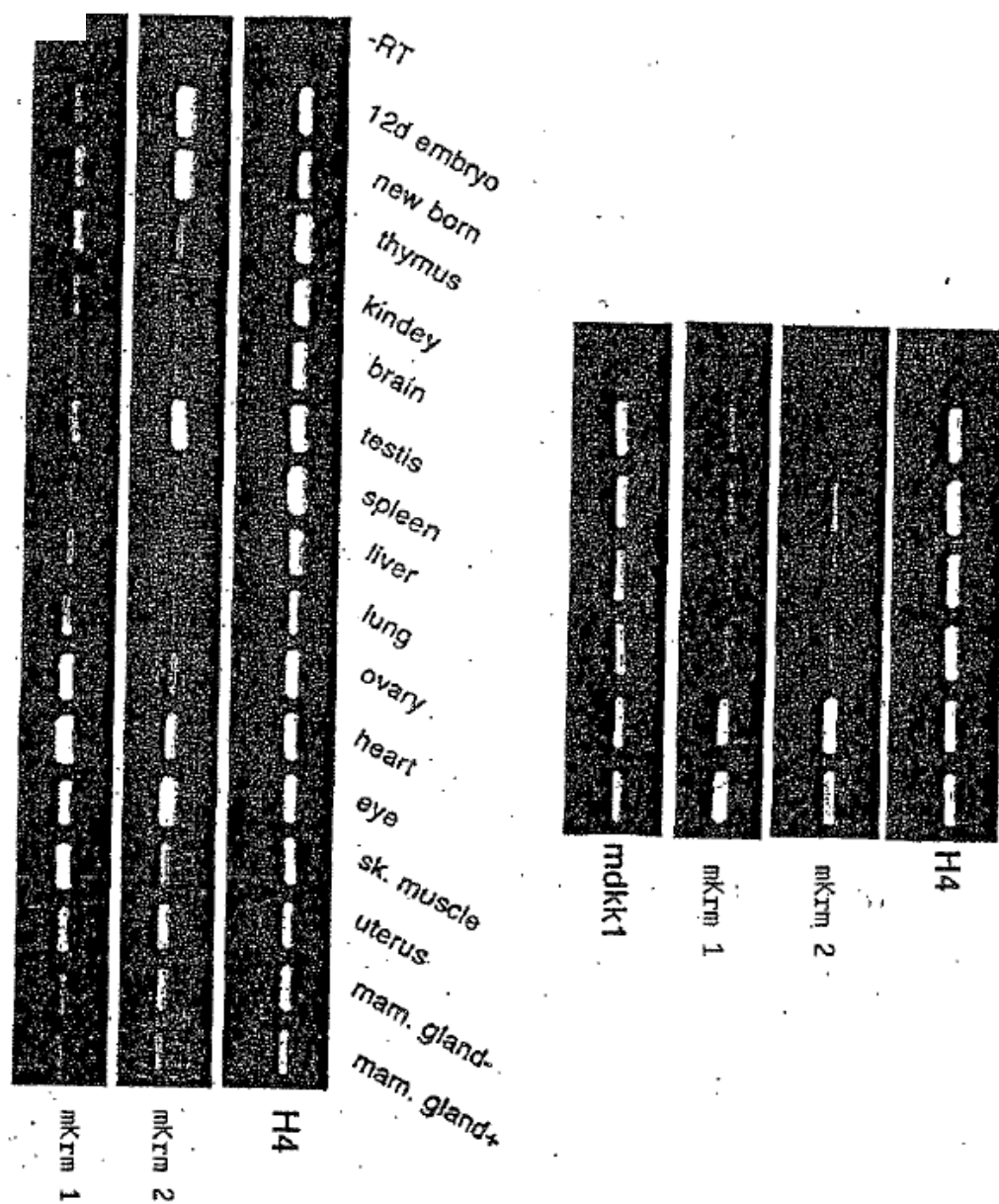


Fig. 5