

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 935**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10000199 .9**
96 Fecha de presentación: **12.10.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **2180053**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2010**

54 Título: **Polipéptidos WISP y sus aplicaciones terapéuticas**

30 Prioridad:
16.10.2000 US 241222 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2012

73 Titular/es:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:
Desnoyer, Luc;
Filvaroff, Ellen H. y
Pennica, Diane

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

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).

ES 2 381 935 T3

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos WISP y sus aplicaciones terapéuticas

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere en general a procedimientos para usar polipéptidos WISP en el tratamiento de trastornos cartilaginosos degenerativos y diversas dolencias inmunes relacionadas.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] El factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) es un factor de crecimiento inducido en los fibroblastos por muchos factores, entre los que se incluyen TGF- β , y es esencial para la capacidad de TGF- β de inducir el crecimiento independiente del anclaje (AIG), una propiedad de las células transformadas. El CTGF se descubrió en un intento de identificar el tipo de dímeros del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en los medios de crecimiento de las células endoteliales cultivadas, y está inmunológica y biológicamente relacionado con el PDGF. Véase la Patente de los Estados Unidos N° 5.408.040. El CTGF también es mitógeno y quimiotáctico para las células, y de aquí que se crea que los factores de crecimiento de esta familia tienen un papel en el desarrollo, crecimiento, y reparación normales del tejido humano.

[0003] Se han aislado, clonado, secuenciado y caracterizado siete proteínas relacionadas con el CTGF, incluyendo el ortólogo del pollo para Cyr61, CEF10, CTGF humano, de ratón, y de *Xenopus laevis*, y Nov humano y de *Xenopus laevis* como perteneciente a la familia del gen CCN. Oemar y Luescher, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 17: 1483-1489 (1997). Se ha encontrado que el gen que codifica Cyr61 promueve la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la vascularización. Babic y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 6355-6360 (1998). El gen nov se expresa en el riñón esencialmente en la etapa embrionaria, y se han detectado alteraciones de la expresión de nov, con respecto al riñón normal en nefroblastomas de aves y tumores de Wilm humanos. Martinerie y col., Oncogene, 9: 2729-2732 (1994). Wtl regula en defecto la expresión de nov humano, cuya regulación en defecto puede representar un elemento clave en la nefrogénesis normal y tumoral. Martinerie y col., Oncogene, 12: 1479-1492 (1996). Se ha propuesto recientemente que los genes CTGF, nov, y *cyr61*, que codifican las proteínas secretadas que contienen secuencias conservadas y motivos IGFBP en sus términos N y se unen a los IGF con baja afinidad la mayoría de miembros de la superfamilia IGFBP, junto con mac25/IGFBP-7 (Yamanaka y col., J. Biol. Chem., 272: 30729-30734 (1997)) y las IGFBP 1-6 de elevada afinidad. Los CTGF según esta propuesta se designarían IGFBP-8. Kim y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 12981-12986 (1997).

[0004] Los diferentes miembros de la familia CCN interactúan con diversas macromoléculas solubles o asociadas a matriz en glicoconjugados sulfatados concretos (Holt y col., J. Biol. Chem., 265: 2852-2855 (1990)). Se usó esta interacción para purificar Cyr61 y CTGF mediante cromatografía de afinidad sobre heparina-agarosa (Frazier y col., J. Invest. Dermatol., 107: 404-411 (1996); Kireeva y col., Mol. Cell. Biol., 16: 1326-1334 (1996)). Se secretó Cyr61 y se asoció con la matriz extracelular y la superficie celular debido a su afinidad por el heparán sulfato (Yang y col., Cell. Growth Diff., 2: 351-357 (1991)).

[0005] Recientemente, se encontró una proteína en ratones designada como ELM1 que se expresaba en células con baja metástasis. Hashimoto y col., J. Exp. Med., 187: 289-296 (1998). El gen *elm1*, un homólogo de ratón de WISP-1 dado a conocer a continuación, es otro miembro del CTGF, Cyr61/cef10, y la familia del gen expresado en exceso en neuroblastoma y suprime el crecimiento tumoral *in vivo* y la metástasis de las células K-1735 de melanoma de murino. Otro artículo reciente sobre rCop-1, el ortólogo de rata de WISP-2 descrito a continuación, describe la pérdida de la expresión de este gen después de la transformación celular. Zhang y col., Mol. Cell. Biol., 18: 6131-6141 (1998).

[0006] Los miembros de la familia CCN (con la excepción de *nov*) son genes sensibles al crecimiento temprano inmediato que se piensa que regulan la proliferación celular, la diferenciación, la embriogénesis, y la cicatrización de heridas. La homología de secuencias entre miembros de la familia del gen CCN es bastante elevada, sin embargo, las funciones de estas proteínas *in vitro* oscilan desde estimuladoras del crecimiento (*es decir*, CTGF humano) a inhibidoras del crecimiento (*es decir*, nov de pollo y posiblemente también hCTGF). Además algunas moléculas homólogas a CTGF están indicadas para ser útiles en la prevención de la desmoplasia, la formación de estroma de tejido conectivo en exceso fuertemente celular asociada con algunos cánceres, y las lesiones fibróticas asociadas con diversos trastornos de la piel tales como escleroderma, fascitis eosinófila queloide, fascitis nodular y contractura de Dupuytren. Además, se ha demostrado recientemente la expresión de CTGF en el estroma fibroso de los tumores de mama, sugiriendo la formación de un estroma canceroso que implica la inducción de factores de crecimiento fibroproliferativos similares como la cicatrización de heridas. El CTGF humano se expresa también a niveles muy elevados en lesiones ateroscleróticas avanzadas, pero no en arterias normales, sugiriendo que esto puede jugar un papel en la aterosclerosis. Oemar y Luescher, más arriba.

[0007] Los Wnt están codificados por una amplia familia de genes cuyos miembros se han encontrado en lombrices intestinales, insectos, peces cartilaginosos, y vertebrados. Holland y col., Dev. Suppl., 125-133 (1994). Se piensa que los Wnt funcionan en una variedad de procesos de desarrollo y fisiológicos ya que muchas especies diversas han conservado múltiples genes *Wnt*. McMahon, Trends Genet., 8: 236-242 (1992); Nusse y Varmus, Cell, 69: 1073-1087 (1992). Los genes Wnt codifican glicoproteínas secretadas que se piensa que funcionan como señales paracrinas y autocrinas activas en algunos tipos primitivos de células. McMahon, *más arriba* (1992); Nusse and Varmus, *más arriba* (1992). La familia del factor de crecimiento Wnt incluye más de diez genes identificados en el ratón (*Wnt-1*, -2, -3A, -3B, -4, -5A, -5B, -6, -7A, -7B, -8A, -8B, -10B, -11, -12, y -13) (véanse, *por ejemplo*, Gavin y col., Genes Dev., 4: 2319-2332 (1990); Lee y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 2268-2272 (1995); Christiansen y col., Mech. Dev., 51: 341-350 (1995)) y al menos nueve genes identificados en el ser humano (*Wnt-1*, -2, -3, -5A, -7A, -7B, -8B, -10B, y -11) mediante clonación del ADNc. Véase, *por ejemplo*, Vant Veer y col., Mol. Cell. Biol., 4: 2532-2534 (1984).

[0008] El protooncogén *Wnt-1* (*int-1*) fue identificado originalmente a partir de tumores de mama inducidos por el virus del tumor de mama de ratón (MMTV) debido a una inserción de la secuencia de ADN vírico. Nusse y Varmus, Cell, 31: 99-109 (1982). En ratones adultos, el nivel de expresión del ARNm de *Wnt-1* se detectó solo en el testículo durante las últimas etapas de desarrollo del esperma. La proteína Wnt-1 tiene aproximadamente 42 kDa y contiene una región hidrófoba aminoterminal, que puede funcionar como una secuencia señal para la secreción (Nusse and Varmus, *más arriba*, 1992). Se detectó la expresión de *Wnt-2/irp* en tejidos fetales y adultos de ratón y su distribución no se solapa con el modelo de expresión de Wnt-1. Wnt-3 ha sido asociado con la tumorigénesis mamaria en ratones. Se ha detectado la expresión de *Wnt-3* en embriones de ratón en los tubos neurales y en los primordios de las extremidades. Se han detectado transcritos de *Wnt-5a* en el desarrollo de las extremidades anteriores y posteriores en los 9,5 a 14,5 días y los niveles más elevados se concentraron en el ectodermo apical de la punta distal de las extremidades. Nusse and Varmus, *más arriba* (1992). Recientemente, se describió un factor de crecimiento Wnt, denominado Wnt-x, (documentos WO95/17416) junto con la detección de la expresión de *Wnt-x* en tejidos óseos y en células derivadas de huesos. Se describió también el papel de Wnt-x en el mantenimiento de los osteoblastos maduros y el uso del factor de crecimiento Wnt-x como agente terapéutico o en el desarrollo de otros agentes terapéuticos para tratar las enfermedades relacionadas con los huesos.

[0009] Los Wnt pueden jugar un papel en la señalización celular local. Los estudios bioquímicos han demostrado que mucha de la proteína Wnt secretada se puede encontrar asociada con la superficie celular o la matriz extracelular más bien que difundirse libremente en el medio. Papkoff y Schryver, Mol. Cell. Biol., 10: 2723-2730 (1990); Bradley y Brown, EMBO J., 9: 1569-1575 (1990).

[0010] Los estudios de las mutaciones en los genes *Wnt* han indicado un papel de los *Wnt* en el control del crecimiento y el modelado tisular. En *Drosophila*, *wingless* (*wg*) codifica un gen relacionado con *Wnt* (Rijsewicz y col., Cell, 50: 649-657 (1987)) y las mutaciones de *wg* alteran el modelo del ectodermo embrionario, la neurogénesis y la extensión del disco imaginal. Morata y Lawrence, Dev. Biol., 56: 227-240 (1977); Baker, Dev. Biol., 125: 96-108 (1988); Klingensmith y Nusse, Dev. Biol., 166: 396-414 (1994). En *Caenorhabditis elegans*, *lin-44* codifica un Wnt homólogo que se requiere para las divisiones celulares asimétricas. Herman y Horvitz, Development, 120: 1035-1047 (1994). Las mutaciones activadoras en ratones han demostrado que los Wnt son esenciales para el desarrollo del cerebro (McMahon y Bradley, Cell, 62: 1073-1085 (1990); Thomas y Cappechi, Nature, 346: 847-850 (1990)), y la extensión de los primordios embrionarios desde el riñón (Stark y col., Nature, 372: 679-683 (1994)), el primordio de la cola (Takada y col., Genes Dev., 8: 174-189 (1994)), y los primordios de las extremidades. Parr y McMahon, Nature, 374: 350-353 (1995). La expresión en exceso de los *Wnt* en las glándulas mamarias puede dar como resultado una hiperplasia mamaria (McMahon, *más arriba* (1992); Nusse y Varmus, *más arriba* (1992)), y desarrollo alveolar precoz. Bradbury y col., Dev. Biol., 170: 553-563 (1995).

[0011] Wnt-5a y Wnt-5b se expresan en el mesodermo posterior y lateral y el mesodermo extraembrionario de los embriones de murino en los días 7-8. Gavin y col., *más arriba* (1990). Estos dominios embrionarios contribuyen con la región AGM y los tejidos del saco vitelino a partir de los cuales se derivan precursores hematopoyéticos y HSC multipotentes. Dzierzak y Medvinsky, Trends Genet., 11: 359-366 (1995); Zon y col., en Gluckman y Coulombel, ed., Colloque, INSERM, 235: 17-22 (1995), presentado en el Joint International Workshop on Foetal and Neonatal Hematopoiesis and Mechanism of Bone Marrow Failure, París Francia, 3-6 de abril de 1995; Kanatsu y Nishikawa, Development, 122: 823-830 (1996). Wnt-5a, Wnt-10b, y se han detectado otros *Wnt* en primordios de extremidades, que indican posibles papeles en el desarrollo y el modelado del microambiente temprano del hueso tal como se muestra para Wnt-7b. Gavin y col., *más arriba* (1990); Christiansen y col., Mech. Devel., 51: 341-350 (1995); Parr y McMahon, *más arriba* (1995).

[0012] La ruta Wnt/Wg de transducción de la señal juega un importante papel en el desarrollo biológico del organismo y se ha implicado en algunos cánceres humanos. Esta ruta incluye también el gen supresor del tumor, APC. Las mutaciones en el gen APC están asociadas con el desarrollo de formas esporádicas y heredadas del cáncer colorrectal humano. La señal Wnt/Wg conduce a la acumulación de beta-catenina/Armadiño en la célula, dando como resultado la formación de un complejo de transcripción bipartito consistente en beta-catenina y un

miembro del factor de unión potenciador linfoide/factor de linfocitos T (LEF/TFC) de la familia del factor de transcripción de la secuencia de HMG. Este complejo se transloca en el núcleo cuando puede activar la expresión de los genes en la dirección 3' de la señal Wnt/wg, tales como los genes *engrailed* y *Ultrabithorax* en *Drosophila*.

5 [0013] Para una revisión sobre Wnt, véase Cadigan y Nusse, *Genes Dev.*, 11: 3286-3305 (1997).

[0014] Pennica y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:14717-14722 (1998) describen la clonación y caracterización de dos genes *WISP-1* y *WISP-2*, que están regulados en exceso en la línea de células epiteliales de mama C57MG transformada por Wnt-1, y un tercer gen relacionado, *WISP-3*. Pennica y col. Informan que estos genes *WISP* pueden estar en la dirección 3' de la señalización de Wnt-1 y los niveles anormales de la expresión de *WISP* en el 10 cáncer de colon pueden jugar un papel en la tumorigénesis del colon. Se ha identificado recientemente *WISP-1* como un gen regulado por la β -catenina y la caracterización de su actividad oncogénica demostró que *WISP-1* puede contribuir a la tumorigénesis mediada por β -catenina (Xu y col., *Gene & Develop.*, 14:585-595 (2000)). La expresión en exceso de *WISP-1* en células normales de riñón de rata (NRK-49F) indujo la transformación 15 morfológica, aceleró el crecimiento celular y aumento la densidad de la saturación. Además, estas células forman fácilmente tumores cuando se inyectan en ratones sin pelo, lo cual sugiere que *WISP-1* puede jugar algún papel en la tumorigénesis (Xu y col., más arriba 2000).

[0015] Hurvitz y col., *Nature Genetics*, 23: 94-97 (1999) describen un estudio que implica *WISP3* en el que se 20 encontraron nueve mutaciones diferentes de *WISP3* en individuos no relacionados que estaban asociadas con el trastorno esquelético autosómico recesivo, displasia pseudorreumatoide progresiva (PPD). Hurvitz y col., observaron la expresión de *WISP3* mediante la RT-PCR en sinoviocitos humanos, condriocitos del cartílago articular, y células progenitoras mesenquimales derivadas de médula ósea.

[0016] La solicitud PCT WO98/21236 publicada el 22 de mayo de 1998 da a conocer un gen 3 del factor de 25 crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF-3) que codifica un miembro de 26 KD de la superfamilia del factor de crecimiento. El documento WO98/21236 da a conocer que la secuencia de aminoácidos de CTGF-3 se dedujo de un clon de ADNc osteoblástico humano, y este CTGF-3 se expresó en múltiples tejidos de tipo ovario, testículos, 30 corazón, pulmón, músculo esquelético, médula adrenal, corteza adrenal, timo, próstata, intestino delgado y colon.

[0017] Algunos investigadores han documentado cambios en la composición de proteoglicano en neoplasmas. Especialmente, una producción marcada de proteoglicano de condroitina sulfato es un fenómeno bien reconocido en una variedad de tumores malignos. Además, la expresión de decorina, un dermatán sulfato que contiene 35 proteoglicano, ha demostrado estar bien correlacionada con la neoplasia en el carcinoma humano (Adany y col., *J. Biol. Chem.*, 265: 11389-11396 (1990); Hunzlemann y col., *J. Invest. Dermatol.*, 104: 509-513 (1995)). Recientemente, se ha demostrado que decorina suprime el crecimiento de algunos carcinomas (Santra 1997). Aunque la función de la decorina en el desarrollo tumorigénico no se entiende completamente, se ha propuesto que la expresión de la decorina en el estroma peritumoral puede reflejar una respuesta regional de las células 40 hospedadoras del tejido conector a las células neoplásicas invasoras (Stander y col., *Gene Therapy*, 5: 1187-1194 (1999)).

[0018] Para una revisión reciente de diversos miembros de la familia del factor de crecimiento del tejido 45 conectivo/enriquecidos en cisteína 61/expresados en exceso en nefroblastoma (CNN), y sus respectivas propiedades y actividades, véase Brigstock, *Endocrine Reviews*, 20: 189-206 (1999).

[0019] Los trastornos cartilaginosos degenerativos describen ampliamente una serie de enfermedades 50 caracterizadas por la degeneración de anomalías metabólicas de los tejidos conectivos que se pueden manifestar mediante dolor, rigidez y limitación del movimiento de las partes corporales afectadas. El origen de estos trastornos puede ser, por ejemplo, patológico o como resultado de trauma o lesión.

[0020] La osteoartritis (OA), conocida también como osteoartrosis o enfermedad degenerativa de las 55 articulaciones, es normalmente el resultado de una serie de procesos degenerativos localizados que afectan a la estructura articular y dan como resultado dolor y una función disminuida. La OA está acompañada a menudo por un componente inflamatorio localizado que puede acelerar la destrucción de la articulación. La OA está caracterizada por la perturbación de la superficie de articulación lisa del cartílago, con pérdida temprana de proteoglicanos (PG) y colágenos, seguido por la formación de hendiduras y fibrilación, y en última instancia por la pérdida completa del grosor del cartílago. Los síntomas de la OA incluyen sensación de dolor localizado en las articulaciones afectadas, 60 especialmente después del uso. Con la progresión de la enfermedad, los síntomas pueden progresar hasta una sensación continua de dolor, malestar localizado y alteraciones estéticas tales como deformidad de la articulación afectada.

[0021] En contraste con la naturaleza localizada de la OA, la artritis reumatoide (RA) es una enfermedad 65 inflamatoria sistémica que comienza igualmente en el sinovio, los tejidos que rodean el espacio articular. La RA es una enfermedad autoinmune crónica caracterizada por una sinovitis simétrica de la articulación y afecta

normalmente a las articulaciones diartrodiales pequeñas y grandes, conduciendo a su progresiva destrucción. A medida que progresa la enfermedad, los síntomas de la RA pueden incluir también fiebre, pérdida de peso, adelgazamiento de la piel, implicación multiorgánica, escleritis, úlceras córneas, formación de nódulos subcutáneos o subperiosteales y muerte prematura. Aunque la(s) causa(s) u orígenes de la RA y o la OA son claramente diferentes, las citocinas y las enzimas implicadas en la destrucción del cartílago parecen ser similares.

[0022] Se cree que los factores de crecimiento peptídicos son importantes reguladores del crecimiento del cartílago y del comportamiento de las células del cartílago (condriocitos) (*es decir*, la diferenciación, migración, división, y síntesis o rotura de la matriz) F. S. Chen y col., Am J. Orthop. 26: 396-406 (1997). Los factores de crecimiento que se han propuesto previamente para estimular la reparación del cartílago incluyen el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), Osborn, J. Orthop. Res. 7: 35-42 (1989); Florini y Roberts, J. Gerontol. 35: 23-30 (1980); factor básico de crecimiento de los fibroblastos (bFGF), Toolan y col., J. Biomech. Mat. Res. 41: 244-50 (1998); Sah y col., Arch. Biochem. Biophys. 308: 137-47 (1994); proteína morfogenética ósea (BMP), Sato y Urist, Clin. Orthop. Relat. Res. 183: 180-87 (1984); Chin y col., Arthritis Rheum. 34: 314-24 (1991) y factor beta de transformación del crecimiento (TGF-beta), Hill y Logan, Prog. Growth Fac. Res. 4: 45-68 (1992); Guerne y col., J. Cell Physiol. 158: 476-84 (1994); Van der Kraan y col., Ann. Rheum. Dis. 51: 643-47 (1992).

[0023] El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) estimula la síntesis de la matriz y la proliferación celular en el cultivo, K. Osborn, J. Orthop. Res. 7: 35-42 (1989), y la insuficiencia de IGF-1 puede tener un papel etiológico en el desarrollo de la osteoartritis. R.D. Coutts, y col., Instructional Course Lect. 47: 487-94, Amer. Acad. Orthop. Surg. Rosemont, IL (1997). Algunos estudios indican que las concentraciones de IGF-1 en suero son inferiores en los pacientes osteoartíticos que en los grupos del control, mientras que otros estudios no han encontrado diferencias. No obstante, los niveles de IGF-1 en suero y la sensibilidad de los condriocitos a IGF-1 disminuyen con la edad. J.R. Florini y S.B. Roberts, J. Gerontol. 35: 23-30 (1980). De esta manera, la disminución de la biodisponibilidad de IGF-1 así como la disminución de la sensibilidad de los condriocitos a IGF-1 pueden contribuir a la homeostasis del cartílago y conducir a la degeneración con el avance de la edad.

[0024] Se ha propuesto a IGF-1 para el tratamiento de prevención de la osteoartritis. La administración intraarticular de IGF-1 en combinación con pentosan polisulfato de sodio (un inhibidor de la actividad catabólica de los condriocitos) produjo una mejora de la apariencia histológica, y niveles casi normales de enzimas degradativas (metaloproteinasas y colagenasas neutras), inhibidores tisulares de la metaloproteinasas y la matriz de colágeno. R.A. Rogachefsky, y col., Ann. NY Acad. Sci. 732: 889-95 (1994). Se ha descrito el uso de IGF-1 ya sea solo o como un adyuvante con otros factores de crecimiento para estimular la regeneración del cartílago en los documentos WO 91/19510, WO 92/13565, US 5.444.047, y EP 434.652,

[0025] Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) son miembros de la amplia familia de factores del crecimiento del factor beta de transformación del crecimiento (TGF-A). Los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que BMP induce la diferenciación de las células mesenquimales en condriocitos. K. Sato y M. Urist, Clin. Orthop. Relat. Res. 183: 180-87 (1984). Además, el factor de crecimiento del esqueleto y los factores de crecimiento derivados de cartílago tienen efectos sinérgicos con BMP, ya que la combinación de estos factores de crecimiento con BMP y la hormona del crecimiento inician la diferenciación de las células mesenquimales. La posterior proliferación de las células diferenciadas está estimulada por otros factores. D.J. Hill & A Logan, Prog. Growth Fac. Res. 4: 45-68 (1992).

[0026] El factor beta de transformación del crecimiento (TGF-B) está producido por osteoblastos, condriocitos, plaquetas, linfocitos activados, y otras células. R.D. Coutts et al., *más arriba*. TGF- β puede tener propiedades estimuladoras e inhibitoras sobre la síntesis de la matriz y la proliferación celular dependiendo de la célula diana, la dosificación, y las condiciones del cultivo celular. P. Guerne y col., J. Cell Physiol. 158: 476-84 (1994); H. Van Beuningen y col., Ann. Rheum. Dis. 52: 185-91 (1993); P. Van der Kraan y col., Ann. Rheum. Dis. 51: 643-47 (1992). Además, como con IGF-1, la sensibilidad de TGF- β disminuye con la edad. P. Guerne y col., J. Cell Physiol. 158: 476-84 (1994). Sin embargo, TGF- β es un estimulador más potente de la proliferación de condriocitos que los otros factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), bFGF, e IGF-1 (Guerne y col., *más arriba*), y puede estimular la producción de proteoglicano por los condriocitos. TGF- β regula también en defecto los efectos de las citocinas que estimulan el catabolismo de los condriocitos Van der Kraan y col., *más arriba*. *In vivo*, TGF- β induce la proliferación y la diferenciación de las células mesenquimales en condriocitos y potencia la reparación de los defectos parciales de grosor en el cartílago articular de conejo. E.B. Hunziker y L. Rosenberg, Trans. Orthopaed. Res. Soc. 19: 236 (1994).

[0027] Aunque algunos investigadores se han centrado en el uso de algunos factores de crecimiento para reparar el tejido del cartílago o los condriocitos, otros se han fijado en la inhibición de la actividad de las moléculas que inducen la destrucción del cartílago y/o inhiben la síntesis de la matriz. Una de dichas moléculas es la citocina IL-1 alfa, que tiene efectos perjudiciales sobre algunos tejidos dentro de la articulación, que incluyen la generación de inflamación sinovial y la regulación en exceso de las metaloproteinasas de matriz y la expresión de las prostaglandinas V. Baragi, y col., J. Clin. Invest. 96: 2454-60 (1995); V.M. Baragi y col., Osteoarthritis Cartilage 5:

275-82 (1997); C.H. Evans y col., J. Keukoc. Biol. 64: 55-61 (1998); C.H Evans y P.D. Robbins, J. Rheumatol. 24: 2061-63 (1997); R. Kang y col., Biochem. Soc. Trans. 25: 533-37 (1997); R. Kang y col., Osteoarthritis Cartilage 5: 139-43 (1997). Un medio de antagonizar IL-1 alfa es mediante tratamiento con antagonistas solubles del receptor de IL-1 (IL-1ra), una proteína que se produce naturalmente que evita que IL-1 se una con su receptor, inhibiendo por tanto los efectos directos e indirectos de IL-1 sobre el cartílago. En mamíferos solo una proteasa, denominada interleucina 1 beta-convertasa (ICE), puede generar específicamente IL-1 alfa activa madura. Se ha demostrado que la inhibición de ICE bloquea la producción de IL-1 alfa y puede retrasar la degeneración artrítica (revisado por Martel-Pelletier J. y col. Front. Biosci. 4: d694-703). El antagonista soluble del receptor de IL-1 (IL-1ra), una proteína que se produce naturalmente que puede inhibir los efectos de IL-1 evitando la interacción de IL-1 con los condriocitos, se ha demostrado que es eficaz en los modelos animales de artritis y se está ensayando actualmente en seres humanos para su capacidad de evitar la incidencia o la progresión de la artritis.

[0028] Se cree que la degradación de la matriz del cartílago es debida a la escisión de las moléculas de la matriz (proteoglicanos y colágenos) por las proteasas (revisado en Woessner JF Jr., "Proteases of the extracellular matrix", en Mow, V., Ratcliffe, A. (eds): Structure and Function of Articular Cartilage. Boca Raton, FL, CRC Press, 1994 y Smith R.L., Front. In Biosci. 4: d704-712. Aunque las enzimas clave implicadas en la rotura de la matriz no se han identificado todavía claramente, las metaloproteinasas de matriz (MMP) y las "agrecanasas" parecen jugar papeles claves en la destrucción de la articulación. Además, pueden estar implicados miembros de la familia de las serina y cisteína proteinasas (por ejemplo, las catepsinas y el activador del plasminógeno tipo urocinasa o el activador del plasminógeno tisular (uPA y tPA)). La plasmina, el activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA) y el activador del plasminógeno tisular (tPA) pueden jugar un importante papel en la ruta de activación de las metaloproteinasas. Las evidencias relacionan el grupo estrechamente relacionado de la catepsina B, L y S con la rotura de la matriz, y estas catepsinas están algunas veces aumentadas en la OA. Muchas citocinas, que incluyen IL-1, TNF-alfa y LIF inducen la expresión de las MMP en los condriocitos. La inducción de las MMP puede estar antagonizada por TGF- β e IL-4 y potenciada, al menos en conejos, por FGF y PDGF. Tal como se muestra en los estudios animales, los inhibidores de estas proteasas (MMP y agrecanasas) pueden al menos proteger parcialmente el tejido de la articulación del daño *in vivo*.

[0029] El óxido nítrico (NO) puede jugar también un papel sustancial en la destrucción del cartílago. Ashok y col., Curr. Opin. Rheum. 10: 263-268 (1998). A diferencia de cartílago normal que no produce NO a no ser que se estimule con citocinas tales como IL-1, el cartílago obtenido de articulaciones osteoarthriticas produce grandes cantidades de óxido nítrico durante 3 días en el cultivo a pesar de la ausencia de estímulos añadidos. Además, la inhibición de la producción de NO ha demostrado evitar la destrucción del cartílago y la muerte de los condriocitos mediadas por IL-1 así como la progresión de la osteoartritis en modelos animales.

Resumen de la invención

[0030] Los solicitantes han encontrado de manera sorprendente que los polipéptidos WISP tienen actividades útiles, tales como la capacidad de estimular o potenciar la diferenciación o la proliferación de condriocitos, y de esta manera, los polipéptidos WISP pueden ser útiles para el tratamiento, la reparación o la protección del cartílago, incluyendo el cartílago dañado como resultado de un trastorno y/o lesión cartilaginosa.

[0031] En una realización, la presente invención se refiere a un polipéptido WISP para uso en un procedimiento para el tratamiento de cartílago dañado como resultado de un trastorno cartilaginoso que comprende poner en contacto dicho cartílago con una cantidad eficaz de un polipéptido WISP tal como se define en las reivindicaciones. Los polipéptidos WISP para uso en la invención incluyen polipéptidos WISP-3 y sus variantes, descritos adicionalmente a continuación. Opcionalmente, el cartílago es cartílago articular, y la cantidad de polipéptido WISP empleada es una cantidad terapéuticamente eficaz. El trastorno cartilaginoso es osteoartritis o artritis reumatoide. Los procedimientos se pueden llevar a cabo *in vivo*, tal como mediante la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido WISP al mamífero, o *ex vivo*, poniendo en contacto dicho tejido del cartílago con una cantidad eficaz del polipéptido WISP en cultivo y a continuación trasplantando el tejido del cartílago tratado en el mamífero. Además, los procedimientos se pueden llevar a cabo empleando el polipéptido WISP solo como agente terapéutico, o en combinación con una cantidad eficaz de un agente cartilaginoso u otra técnica terapéutica. Por ejemplo, se puede emplear el polipéptido WISP en combinación con cualquier técnica quirúrgica normalizada del cartílago. Se puede administrar el polipéptido WISP antes, después y/o de manera simultánea con la técnica quirúrgica normalizada del cartílago.

[0032] En una realización adicional, la presente invención se refiere a un polipéptido WISP para uso en un procedimiento para el tratamiento del cartílago dañado por lesión o la prevención del daño inicial o continuado que comprende poner en contacto dicho cartílago con una cantidad eficaz de un polipéptido WISP tal como se define en las reivindicaciones. Más específicamente, la lesión tratada es una microlesión o golpe contundente, una fractura condrial, una fractura osteocondrial, o una lesión de tendones, meniscos o ligamentos. En un aspecto específico, la lesión puede ser el resultado de una tensión mecánica excesiva u otra inestabilidad biomecánica resultante de lesiones deportivas u obesidad. Alternativamente, la presente invención se refiere a un polipéptido WISP para uso

en un procedimiento de tratamiento o facilitación de la reparación de fracturas óseas que comprende poner en contacto la región de la lesión ósea con una cantidad eficaz de un polipéptido WISP de acuerdo con las reivindicaciones.

5 **[0033]** La invención se refiere a un procedimiento para potenciar, estimular o promover la diferenciación de los condriocitos o células precursoras de condriocitos poniendo en contacto los condriocitos o células precursoras de condriocitos con una cantidad eficaz de un polipéptido WISP-3.

10 **[0034]** En otra realización, la presente invención se refiere a un kit o artículo de fabricación, que comprende el polipéptido WISP y un vehículo, excipiente y/o estabilizante (por ejemplo, un tampón) en un envase adecuado tal como se define en las reivindicaciones. El kit o artículo contiene instrucciones para usar el polipéptido WISP para tratar el cartílago dañado o prevenir el daño inicial o continuado al cartílago como resultado de un trastorno cartilaginoso, o para usar el polipéptido WISP para tratar un trastorno cartilaginoso.

15 **[0035]** Las realizaciones más particulares de la presente invención incluyen un polipéptido WISP para uso en los procedimientos de tratamiento de células o tejido cartilaginoso de mamíferos, que comprenden poner en contacto las células o el tejido cartilaginoso dañado de mamíferos procedente de un tejido cartilaginoso degenerativo (o dañado a partir de una lesión) con una cantidad eficaz de polipéptido WISP, en el que dicho polipéptido WISP es un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en:

- 20 i) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 34 a 372 de la SEQ ID NO: 9;
 j) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 1 a 372 de la SEQ ID NO: 9;
 k) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 16 a 354 de la SEQ ID NO: 8;
 l) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 1 a 354 de la SEQ ID NO: 8;
 25 m) un polipéptido WISP-3 que tiene al menos un 90 % de identidad con el polipéptido de i), j), k) o l); y

un fragmento biológicamente activo del polipéptido de i), j), k) o l) tal como se define en las reivindicaciones.

30 **[0036]** Cuando el polipéptido WISP-3 tiene al menos un 90 % de identidad con el polipéptido de i), j), k) o l), dicho polipéptido WISP-3 estimula la proliferación o diferenciación de condriocitos. Alternativamente, cuando el polipéptido WISP-3 es un fragmento biológicamente activo del polipéptido WISP-3 de i), j), k) o l), dicho fragmento biológicamente activo estimula la proliferación o diferenciación de condriocitos. Los polipéptidos WISP a los que se hace referencia anteriormente se pueden unir a una o más moléculas de polietilenglicol. Opcionalmente, los polipéptidos WISP se pueden unir a un epítipo etiqueta o molécula de inmunoglobulina. En los procedimientos, el cartílago puede ser un cartílago articular, y el trastorno cartilaginoso degenerativo puede ser artritis reumatoide u osteoartritis.

Breve descripción de los dibujos

40 **[0037]** Las Figuras 1A-1G muestran la unión de WISP-1 a diferentes líneas celulares. Las células se sembraron en placas y se cultivaron durante la noche. El día siguiente, se bloquearon los sitios de unión no específica y las células se incubaron con 1 nM de mWISP-1-IgG (1A y 1B) o sin mWISP-1-IgG (1C) durante 1 hora. Se lavaron las células, se fijaron y se detectó la unión de WISP-1-IgG mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG humana y el procedimiento de amplificación indirecta del sustrato con tiramida seguido con estreptavidina conjugada con FITC. En 1A, se agrupan las líneas celulares a las cuales se une mWISP-1-IgG. La imagen representa la señal fluorescente típica que se encuentra sobre una superficie de células NRK tras la unión con mWISP-1-IgG. En 1B, se agrupan las líneas celulares a las cuales no se une mWISP-1-IgG. La imagen representa la señal fluorescente típica que se encuentra sobre la superficie de células RAG tras la unión con mWISP-1-IgG. La imagen en 1C representa la señal fluorescente típica que se encuentra sobre la superficie de células NRK cuando se omitió mWISP-1-IgG del procedimiento de unión. Se llevaron portas montados con secciones de tumor de colon humano a temperatura ambiente y se lavaron, se saturaron y se incubaron durante 1 hora en HBS-C/BSA al 3 % y WISP-1-Fc 1 nM (1D y 1E). En paralelo, se llevó a cabo la detección inmunofluorescente de la vimentina sobre secciones adyacentes tal como se describe en el Ejemplo 1 (1F y 1G).

55 **[0038]** Las Figuras 2A-2B muestran la unión de mtdISP-1-IgG a medios acondicionados con fibroblastos de piel humana. Se prepararon medios acondicionados exentos de suero con fibroblastos de piel humana tal como se describe en la sección "Purificación de Factores de Unión de WISP-1". Se revistieron cincuenta microlitros de medios acondicionados por duplicado en pocillos de microvaloración. Los sitios de unión no específica se saturaron mediante incubación con HBS-C que contenía BSA al 3 % y los pocillos se incubaron durante 2 horas con mWISP-1-IgG. Se lavaron los pocillos y se incubaron durante 1 hora con Fc' dirigido contra IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante. Después de 6 lavados con HBS-C que contenía BSA al 0,3 %, se visualizó la señal usando sustrato cromógeno de peroxidasa de rábano picante. Se detuvo la reacción con ácido fosfórico 1 M y se midió la DO a 450 nm. 2A muestra la unión de mWISP-1-IgG 1 nM a pocillos revestidos con diluciones en serie de medios acondicionados; 2B muestra la unión de diluciones en serie de mWISP-1-IgG a los pocillos revestidos con

0,5 µl de medios acondicionados con fibroblastos de piel humana.

[0039] Las Figuras 3A-3B muestran la unión de mWISP-1-IgG a un factor sensible a la condroitinasa B de medios acondicionados con fibroblastos de piel humana. En 3A, cincuenta microlitros de medios acondicionados se revistieron por duplicado en pocillos de microvaloración y los sitios de unión no específica se saturaron mediante incubación con HBS-C que contenía BSA al 3 %. Se incubó WISP-1-IgG uno nanomolar durante 2 horas en ausencia o presencia de NaCl 1M, EDTA 100 mM o Tween-20 al 0,05 %. Se lavaron los pocillos y se incubaron durante 1 hora con Fc' dirigido contra IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante. Después de 6 lavados con HBS-C que contenía BSA al 0,3 %, se visualizó la señal usando sustrato cromógeno de peroxidasa de rábano picante. Se detuvo la reacción con ácido fosfórico 1 M y se midió la DO a 450 nm. En 3B, se añadieron 50 µl de HBS-C que contenía 0,5 U/ml de condroitinasa ABC (Ch ABC), 0,5 U/ml de condroitinasa AC II (Ch AC II), 0,5 U/ml de condroitinasa B (Ch B), 0,5 U/ml de condroitinasa C (Ch C), 0,5 U/ml de condroitin-4-sulfatasa (Ch-4-Sulf), 0,5 U/ml de condroitin-6-sulfatasa (Ch-6-Sulf), 0,5 U/ml de heparinasa (Hep), 0,5 U/ml de hialuronidasa (Hyal), 0,5 U/ml de neuraminidasa (Neuram) o 100 pg/ml de proteinasa K (Prot K9 a los pocillos revestidos y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Los pocillos se lavaron extensamente los sitios de unión no específica se saturaron y se incubó mWISP-1-IgG 1 nM durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron y se midió la unión de WISP-1-IgG.

[0040] Las Figuras 4A-4B muestran la purificación de los factores de unión de WISP-1 procedentes de medios acondicionados con fibroblastos de piel humana. En 4A, se recogieron fibroblastos de piel humana procedentes de medios acondicionados exentos de suero después de tres días de cultivo se concentraron, se transfirieron a un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM pH 7,4 y NaCl 300 mM, y se aplicaron en una columna de cromatografía de intercambio aniónico de Q-Sefarosa. Se lavó la columna y las proteínas retenidas se desorbieron con un aumento de la concentración de NaCl. Se analizó la presencia de un factor de unión de WISP-1 en cada fracción usando un ensayo de unión en fase sólida. En 4B, se incubó la fracción 15 (indicada por una * en la Fig. 4A) a 37 °C durante 2 horas en presencia (+) o ausencia (-) de 0,1 U de condroitinasa ABC. Se separaron las muestras mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y se tiñeron los geles con plata. Las bandas indicadas se identificaron mediante espectroscopia de masas.

[0041] Las Figuras 5A-5B muestran la unión de WISP-1 a decorina y biglicano. En 5A, se revistieron placas de microvaloración con diluciones en serie de decorina (círculos rellenos) o biglicano (círculos vacíos). Los sitios de unión no específica se saturaron y se incubó mWISP-1-IgG 0,25 nM durante 2 horas. Los pocillos se lavaron y se incubaron con Fc' dirigido contra IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (2 µg/ml) durante 1 hora. Después de 6 lavados con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %, se desarrolló una señal mediante la incubación de un sustrato cromógeno. Se detuvo el desarrollo del color mediante la adición de ácido fosfórico 1 M y se midió la D.O. a 450 nm. En 5B, cincuenta microlitros de medios acondicionados con fibroblastos de piel humana se revistieron en pocillos de placas de microvaloración. Los sitios de unión no específica se saturaron y se incubó WISP-1-IgG 25 nM en presencia de diversas concentraciones de decorina (círculos rellenos) o biglicano (círculos vacíos) durante 2 horas. Se evaluó la unión de mWISP-1-IgG tal como se describe en 5A.

[0042] La Figura 6 muestra la unión de mNISP-1-IgG a glicosaminoglicanos. Se prepararon medios acondicionados exentos de suero de fibroblastos de piel humana tal como se describe a continuación en los Ejemplos. Cincuenta µl de medios acondicionados se revistieron en pocillos de microplacas durante la noche a 4 °C, los sitios de unión no específica se saturaron y se incubaron los pocillos durante 2 horas a temperatura ambiente con WISP-1-IgG 0,5 nM en presencia de diversas concentraciones de diferentes glicosaminoglicanos. Se lavaron los pocillos, se desarrolló una señal usando un sustrato cromógeno y se midió la D.O a 450 nm. Condroitin sulfato A (círculos rellenos); dermatán sulfato (círculos vacíos), condroitin sulfato C (triángulos rellenos); condroitin sulfato D (triángulos vacíos); condroitin sulfato E (cuadrados rellenos); heparina (X); heparán sulfato (cuadrados vacíos).

[0043] Las Figuras 7A-7I muestran que dermatán sulfato compite por la unión de WISP-1 a los fibroblastos de piel humana. Se sembraron fibroblastos de piel humana en placas. Los sitios de unión no específica se saturaron y se incubó WISP-1-IgG 1 nM durante 1 hora a temperatura ambiente en ausencia (7A) o presencia (7B) de 50 µg/ml de condroitin sulfato A ("CSA"), dermatán sulfato ("DS"); (7C), condroitin sulfato C ("CS C"), (7D), condroitin sulfato D ("CS D"); (7E), condroitin sulfato E ("CS E") (7F); heparina ("Hep") (7G) o heparán sulfato ("HS") (7H). Se lavaron las células y se fijaron y se detectó la unión de WISP-1-IgG mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG humana y el procedimiento indirecto de amplificación del sustrato con tiramida finalizado con estreptavidina conjugada con FITC. Se midió la intensidad de fluorescencia relativa de las imágenes digitales adquiridas mediante el análisis morfométrico (7I).

[0044] Las Figuras 8A-8G muestran que la unión de WISP-1 a los fibroblastos de piel humana se eliminó mediante la digestión de la superficie celular con condroitinasa B. Se incubaron fibroblastos de piel humana durante 2 horas a 37 °C en ausencia (8A), o presencia de 0,1 U de condroitinasa ABC (Ch ABC); (8B), condroitinasa B ("Ch B", (8C), condroitinasa C ("Ch C"): (D), heparinasa ("Hep") (8E). Se lavaron las células, los sitios de unión no específica se saturaron y se incubó WISP-1-IgG 1 nM durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 lavados, se fijaron

las células y se detectó la unión de WISP-1-IgG mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG humana y el procedimiento indirecto de amplificación del sustrato con tiramida finalizado con estreptavidina conjugada con FITC. La Fig. 8F representa un control negativo en el que se usaron células sin digerir pero se omitió mWISP-1-IgG del procedimiento de unión. Se midió la intensidad de la fluorescencia relativa de las imágenes digitales adquiridas mediante el análisis morfométrico (8G).

[0045] Las Figuras 9A-9D muestran que la decorina y el biglicano compiten por la unión de WISP-1 a los fibroblastos de piel humana. Se sembraron fibroblastos de piel humana en placas y se saturaron los sitios de unión no específica. Se incubó mWISP-1-IgG a una concentración de 1 ng/ml durante 1 hora a temperatura ambiente en presencia de 1 mg/ml de decorina (9A) o biglicano (9B), o en ausencia de competidores añadidos (9C). Se lavaron las células y se fijaron y se detectó la unión de WISP-1-IgG mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG humana y el procedimiento indirecto de amplificación del sustrato con tiramida finalizado con estreptavidina conjugada con FITC. Se midió la intensidad de la fluorescencia relativa de las imágenes digitales adquiridas mediante el análisis morfométrico (9D).

[0046] La Figura 10 muestra la adhesión de diferentes mutantes de células CHO a WISP-1. Se capturaron las células en PBS que contenía EDTA 2 mM y a continuación se lavaron y se volvieron a suspender en Ham-F12/LGDMEM (50:50) exento de suero que contenía BSA al 1 %. Se añadió la suspensión celular a pocillos de microvaloración revestidos con WISP-1 y se incubó a 37 °C durante 2 horas. Se lavaron los pocillos 3X con PBS, se retiró el sobrenadante y se midió el número de células adheridas usando CyQUANT de Molecular Probes. Se usó la adhesión de células CHO-K1 a pocillos de microvaloración revestidos con WISP-1 como 100 % y se corrigieron todos los valores para la adhesión no específica a pocillos de microvaloración revestidos con BSA.

[0047] La Figura 11 muestra la adhesión de fibroblastos de piel humana a WISP-1. Se capturaron las células en PBS que contenía EDTA 15 mM y a continuación se lavaron y se volvieron a suspender en Ham-F12/LGDMEM (50:50) exento de suero que contenía BSA al 1 %. Se añadió la suspensión celular a pocillos de microvaloración en ausencia o presencia de 100 µg/ml de dermatán sulfato (es decir, condroitin sulfato B) o heparina. Después de 2 horas a 37 °C, se lavaron los pocillos 3X con PBS, se retiró el sobrenadante y se midió el número de células adheridas, mediante la tinción del violeta cristal. Se corrigieron todos los valores para la adhesión no específica a las placas de microvaloración revestidas con BSA.

[0048] La Figura 12 muestra los resultados de un ensayo de diferenciación de condriocitos.

[0049] La Figura 13 muestra los resultados de un ensayo de tinción del colágeno II.

[0050] La Figura 14 muestra los resultados de un ensayo de rotura de la matriz del cartílago. Los datos ilustrados muestran que WISP-3 disminuye la rotura de la matriz del cartílago. Se trataron explantes de cartílago articular solo con medios (-) o con 150 ng/ml de WISP-3 (WISP3-), o en medios con IL-1 alfa a solo 1 ng/ml (+) o IL-1 alfa más WISP-3 (WISP3 +) durante 3 días. Se determinó la rotura de la matriz del cartílago midiendo la cantidad de proteoglicanos en los medios usando el ensayo DMMB.

[0051] Las Figuras 15A-15B muestran que WISP-1 inhibe la rotura de la matriz del cartílago y la producción de óxido nítrico. Se trataron explantes de cartílago articular solo con medios (-) o con WISP-1 1,1 nM (WISP1-), o en medios con IL-1 alfa a solo 1 ng/ml o IL-1 alfa con WISP-1 (WISP1 +) durante 3 días. En la Fig. 15A, se determinó la rotura de la matriz del cartílago midiendo la cantidad de proteoglicanos en los medios usando el ensayo DMMB. En la Fig. 15B, se determinó la producción de óxido nítrico (NO) midiendo la cantidad de NO en los medios usando la reacción de Griess.

[0052] La Figura 16 muestra el fenotipo esquelético de ratones transgénicos que expresan en exceso WISP-2. Se muestran secciones histológicas del fémur de ratones silvestres (panel derecho) o transgénicos (panel izquierdo) de 14 semanas de edad que expresan en exceso WISP-2 en su músculo esquelético. Señalar la expansión de las zonas de cartílago hialino, concretamente la placa de crecimiento y el cartílago articular, en ratones transgénicos con respecto a los ratones silvestres. Además, áreas de la matriz del cartílago parecen estar presentes en el hueso cortical de los ratones transgénicos, pero no en el de los ratones silvestres.

[0053] La Figura 17 muestra las secuencias de aminoácidos de WISP-1-IgG humano (SEQ ID NO: 1); WISP-1-IgG de ratón (SEQ ID NO: 2); WISP-1 humano "natural" (SEQ ID NO: 3); WISP-1 de ratón "silvestre" (SEQ ID NO: 4); y la etiqueta de IgG humana (SEQ ID NO: 5).

[0054] La Figura 18 muestra las secuencias de aminoácidos de WISP-3-IgG (SEQ ID NO: 6); WISP-3-IgG "alternativa" (SEQ ID NO: 7); WISP-3 (SEQ ID NO: 8); y WISP-3-"long 5' de corte y empalme" (SEQ ID NO: 9).

[0055] La Figura 19 muestra la secuencia de aminoácidos de WISP-2 humano (SEQ ID NO: 10)

Descripción detallada de la invención**I. Definiciones**

[0056] El término "polipéptido WISP" se refiere a la familia de proteínas WISP humana y de ratón naturales y a las variantes descritas en la presente memoria descriptiva cuyos genes están inducidos al menos por Wnt-1. Este término incluye WISP-1, WISP-2, y WISP-3 y sus variantes. Dichas proteínas WISP-1, WISP-2, y WISP-3 se describen adicionalmente a continuación en la solicitud PCT WO99/21998 publicada el 6 de mayo de 1999 y en Pennica y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 95: 14717-14722 (1998).

[0057] Los términos "polipéptido WISP-1" "homólogo de WISP-1" y sus variantes gramaticales, tal como se usan en la presente memoria descriptiva, abarcan la proteína WISP-1 de secuencia natural y las variantes (que se definen adicionalmente en la presente memoria descriptiva). El polipéptido WISP-1 puede aislarse de una variedad de fuentes, tales como de tipos de tejidos humanos o de otra fuente, o prepararse mediante procedimientos recombinantes o sintéticos, o mediante cualquier combinación de estas y similares técnicas.

[0058] Los términos "polipéptido WISP-2", "homólogo de WISP-2", "PRO261", y "polipéptido PRO261" y sus variantes gramaticales, tal como se usan en la presente memoria descriptiva, abarcan la proteína WISP-2 de secuencia natural y las variantes (que se definen adicionalmente en la presente memoria descriptiva). El polipéptido WISP-2 puede aislarse de una variedad de fuentes, tales como de tipos de tejidos humanos o de otra fuente, o prepararse mediante procedimientos recombinantes o sintéticos, o mediante cualquier combinación de estas y similares técnicas.

[0059] Los términos "polipéptido WISP-3", "homólogo de WISP-3", y sus variantes gramaticales, tal como se usan en la presente memoria descriptiva, abarcan la proteína WISP-3 de secuencia natural y las variantes (que se definen adicionalmente en la presente memoria descriptiva). El polipéptido WISP-3 puede aislarse de una variedad de fuentes, tales como de tipos de tejidos humanos o de otra fuente, o prepararse mediante procedimientos recombinantes o sintéticos, o mediante cualquier combinación de estas y similares técnicas.

[0060] Un "polipéptido WISP-1 de secuencia natural" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido WISP-1 derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos WISP-1 de secuencia natural pueden aislarse de la naturaleza o se pueden producir por medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido WISP-1 de secuencia natural" abarca específicamente las formas truncadas o secretadas que se producen naturalmente de un polipéptido WISP-1 dado a conocer en la presente memoria descriptiva, las formas variantes que se producen naturalmente (por ejemplo, las formas cortadas y empalmadas alternativamente o las variantes de corte y empalme), y las variantes alélicas que se producen naturalmente de un polipéptido WISP-1. El polipéptido WISP-1 de secuencia natural puede ser un polipéptido WISP-1 humano de secuencia natural de longitud completa que comprende los aminoácidos 23 a 367 de la SEQ ID NO: 3 en la presente memoria descriptiva (proporcionada también anteriormente en las Figuras 3A y 3B (SEQ ID NO: 3) que se muestra en el documento WO99/21998 publicado el 6 de mayo de 1999) o los aminoácidos 1 a 367 de la SEQ ID NO: 3 en la presente memoria descriptiva (proporcionada anteriormente en las Figuras 3A y 3B (SEQ ID NO: 4) que se muestra en el documento WO/21998) respectivamente, con o sin una metionina N terminal. Opcionalmente, el polipéptido WISP-1 humano comprende la secuencia contigua de los aminoácidos 23 a 367 o los aminoácidos 1 a 367 de la SEQ ID NO: 3 en la presente memoria descriptiva. Opcionalmente, el polipéptido WISP-1 humano está codificado por una secuencia de polinucleótidos que tiene la secuencia de nucleótidos codificante como en el n° de depósito 209533 de la ATCC.

[0061] El polipéptido WISP-1 de secuencia natural puede ser el polipéptido WISP-1 humano de secuencia natural de longitud completa o maduro que comprende los aminoácidos 23 a 367 o 1 a 367 de la SEQ ID NO: 3 en la presente memoria descriptiva en la que el resto de valina en la posición 184 o el resto de alanina en la posición 202 tiene/ha sido cambiado por un resto de isoleucina o serina, respectivamente, con o sin una metionina N terminal. El polipéptido WISP-1 de secuencia natural puede ser el polipéptido WISP-1 humano de secuencia natural de longitud completa o madura que comprende los aminoácidos 23 a 367 o 1 a 367 de la SEQ ID NO: 3 en la presente memoria descriptiva en la que el resto de valina en la posición 184 y el resto de alanina en la posición 202 tiene/ha sido cambiado por un resto de isoleucina o serina, respectivamente, con o sin una metionina N terminal. El polipéptido WISP-1 de secuencia natural puede ser un polipéptido WISP-1 de ratón de secuencia natural de longitud completa que comprende los aminoácidos 23 a 367 de la SEQ ID NO: 4 en la presente memoria descriptiva (proporcionada anteriormente en la Figura 1 (SEQ ID NO: 11) que se muestra en el documento WO99/21998) o los aminoácidos 1 a 367 de la SEQ ID NO: 4 en la presente memoria descriptiva (proporcionada anteriormente en la Figura 1 (SEQ ID NO: 12) que se muestra en el documento WO99/21998), respectivamente, con o sin una metionina N terminal.

[0062] El polipéptido WISP-1 de secuencia natural puede ser uno que esté codificado por una secuencia de nucleótidos que comprenda una de las variantes de corte y empalme de WISP-1 u otra secuencia natural, incluyendo las SEQ ID NOS: 23, 24, 25, 26, 27, 28, o 29 que se muestran en el documento WO99/21998, con o sin

una metionina N-terminal.

[0063] Un "polipéptido WISP-2 de secuencia natural" o un "polipéptido PRO261 de secuencia natural" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido WISP-2 derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos WISP-2 de secuencia natural pueden aislarse del maduro o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido WISP-2 de secuencia natural" abarca específicamente las formas truncadas o secretadas que se producen naturalmente de un polipéptido WISP-2 dado a conocer en la presente memoria descriptiva, las formas variantes que se producen naturalmente (por ejemplo, las formas cortadas y empalmadas o las variantes de corte y empalme alternativamente), y las variantes alélicas de un polipéptido WISP-2 que se producen naturalmente. El polipéptido WISP-2 de secuencia natural puede ser un polipéptido WISP-2 humano de secuencia natural de longitud completa que comprende los aminoácidos 1-24 hasta 250 de la SEQ ID NO: 10 en la presente memoria descriptiva (proporcionada anteriormente en la Figura 4 (SEQ ID NOS: 15, 16, y 56-77) que se muestra en el documento WO99/21998, que incluye los aminoácidos 24 a 250 y los aminoácidos 1 a 250 de la SEQ ID NO: 10 en la presente memoria descriptiva, con o sin una metionina N terminal. Opcionalmente, el polipéptido WISP-2 humano comprende la secuencia contigua de los aminoácidos 24 a 250 o los aminoácidos 1 a 250 de la SEQ ID NO: 10 en la presente memoria descriptiva. Opcionalmente, el polipéptido WISP-2 humano está codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene la secuencia de nucleótidos codificante como en el n° de depósito 209391 de la ATCC. El polipéptido WISP-2 de secuencia natural puede ser un polipéptido WISP-2 de secuencia natural maduro o de longitud completa que comprende los aminoácidos 1-24 hasta 251 de la Figura 2 (SEQ ID NOS: 19, 20, y 78-99) que se muestran en el documento WO99/21998 con o sin una metionina N-terminal

[0064] Un "polipéptido WISP-3 de secuencia natural" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido WISP-3 derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos WISP-3 de secuencia natural se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir por medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido WISP-3 de secuencia natural" abarca específicamente las formas truncadas u otras que se producen naturalmente de un polipéptido WISP-3 dado a conocer en la presente memoria descriptiva, las formas variantes que se producen naturalmente (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas o variantes de corte y empalme alternativamente), y las variantes alélicas que se producen naturalmente de un polipéptido WISP-3. En una realización de la invención, el polipéptido WISP-3 de secuencia natural es un polipéptido WISP-3 humano de secuencia natural, maduro o de longitud completa que comprende los aminoácidos 34 a 372 de la SEQ ID NO: 9 en la presente memoria descriptiva (proporcionada anteriormente en las Figuras 6A y 6B (SEQ ID NO: 32) del documento WO99/21998) o los aminoácidos 1 a 372 de la SEQ ID NO: 9 en la presente memoria descriptiva (proporcionada anteriormente en las Figuras 6A y 6B (SEQ ID NO: 33) que se muestra en el documento WO99/21998), respectivamente, con o sin una metionina N terminal. En otra realización de la invención, el polipéptido WISP-3 de secuencia natural es un polipéptido WISP-3 humano de secuencia natural, maduro o de longitud completa que comprende los aminoácidos 16 a 354 de la SEQ ID NO: 8 en la presente memoria descriptiva (proporcionada anteriormente en las Figuras 7A y 7B (SEQ ID NO: 36) que se muestra en el documento 99/21998) o los aminoácidos 1 a 354 de la SEQ ID NO: 8 en la presente memoria descriptiva (proporcionada anteriormente en las Figuras 7A y 7B (SEQ ID NO: 37) que se muestra en el documento WO99/21998), respectivamente, con o sin una metionina N terminal. Opcionalmente, el polipéptido WISP-3 humano comprende la secuencia contigua de los aminoácidos 34 a 372 o los aminoácidos 1 a 372 de la SEQ ID NO: 9 en la presente memoria descriptiva. Opcionalmente, el polipéptido WISP-3 humano comprende la secuencia contigua de los aminoácidos 16 a 354 o 1 a 354 de la SEQ ID NO: 8 en la presente memoria descriptiva. Opcionalmente, el polipéptido WISP-3 humano está codificado por una secuencia de polinucleótidos que tiene la secuencia de nucleótidos codificante como en el n° de depósito 209707 de la ATCC.

[0065] El término "variante de WISP-1" significa un polipéptido WISP-1 activo tal como se define a continuación que tiene al menos aproximadamente un 80 %, preferiblemente al menos un 85 %, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 %, lo más preferible al menos aproximadamente un 95 % de identidad de la secuencia de aminoácidos con WISP-1 maduro humano que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de los aminoácidos 23 a 367 de la SEQ ID NO: 3, y/o con el WISP-1 de longitud completa humano que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de los aminoácidos 1 a 367 de la SEQ ID NO: 3, y/o con el WISP-1 maduro de ratón que tiene la secuencia de aminoácidos deducida que se muestra en la Fig. 1 (SEQ ID NO: 11) que se muestra en el documento WO99/21998 y/o con el WISP-2 de longitud completa de ratón que tiene la secuencia de aminoácidos deducida que se muestra en la Fig. 1 /SEQ ID NO: 12) del documento WO99/21998. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, los polipéptidos WISP-1 en los que se añaden uno o más restos de aminoácidos a, o se eliminan del (es decir, los fragmentos), término N o C de las secuencias de longitud completa o madura de la SEQ ID NO: 3, incluyendo las variantes de otras especies, pero excluye un polipéptido WISP-1 de secuencia natural.

[0066] El término "variante de WISP-2" o "variante de PRO261" significa un polipéptido WISP-2 activo tal como se define a continuación que tiene al menos aproximadamente un 80 %, preferiblemente al menos aproximadamente un 85 %, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 %, lo más preferible al menos aproximadamente un 95 % de identidad de la secuencia de aminoácidos con el WISP-2 maduro humano que tiene la presunta secuencia de aminoácidos deducida de los aminoácidos 24 a 250 de la SEQ ID NO: 10, y/o con el WISP-2 de longitud completa

humano que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de los aminoácidos 1 a 250 de la SEQ ID NO: 10, y/o con el WISP-2 maduro de ratón que tiene la presunta secuencia de aminoácidos deducida que se muestra en la Fig. 2 (SEQ ID NO: 19) del documento WO99/21998, y/o con el WISP-2 de longitud completa de ratón que tiene la secuencia de aminoácidos deducida que se muestra en la Fig. 2 (SEQ ID NO: 20) del documento WO99/21998. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, los polipéptidos WISP-2 en los que se añaden uno o más restos de aminoácidos a, o se eliminan del (es decir, los fragmentos) término Nor C de las secuencias de longitud completa y la presunta madura de la SEQ ID NO: 10, que incluye variantes de otras especies, pero excluye un polipéptido WISP-2 de secuencia natural.

[0067] El término “variante de WISP-3” significa un polipéptido WISP-3 activo tal como se define a continuación que tiene al menos aproximadamente un 80 %, preferiblemente al menos aproximadamente un 85 %, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 %, lo más preferible al menos aproximadamente un 95 % de identidad de la secuencia de aminoácidos con el WISP-3 maduro humano que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de los aminoácidos 34 a 372 de la SEQ ID NO: 9, y/o con el WISP-3 de longitud completa humano que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de los aminoácidos 1 a 372 de la SEQ ID NO: 9, y/o con el WISP-3 maduro humano que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de los aminoácidos 16 a 354 de la SEQ ID NO: 8, o con el WISP-3 de longitud completa humano que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de los aminoácidos 1 a 354 de la SEQ ID NO: 8. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, los polipéptidos WISP-3 en los que se añaden uno o más restos de aminoácidos a, o se eliminan del (es decir, los fragmentos), término N o C de las secuencias de longitud completa o madura de la SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 8, que incluye las variantes de otras especies, pero excluye un polipéptido WISP-3 de secuencia natural.

[0068] “Porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias del polipéptido WISP identificadas en la presente memoria descriptiva se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los restos de aminoácidos en dichas secuencias WISP identificadas en la presente memoria descriptiva, tras alinear las secuencias e introducir los huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de la secuencia. La alineación a fines de la determinación del porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de diversas formas que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo los algoritmos necesarios para conseguir la máxima alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para los fines de la presente memoria descriptiva, sin embargo, el % de los valores de identidad de la secuencia de aminoácidos se obtienen usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. Genentech, Inc., autorizó el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 y el código fuente ha sido completado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, en el que se registró con el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debe compilarse para el uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4. 0D. digital. El programa ALIGN-2 configura todos los parámetros de comparación de secuencias y no varían.

[0069] “Condiciones de rigor” son aquellas que (1) emplean baja fuerza iónica y elevada temperatura para el lavado, cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/ dodecil sulfato de sodio al 0,1 %; (2) emplean durante la hibridación un agente de desnaturalización, tal como formamida, formamida al 50 % (vol/vol) con albúmina de suero bovino al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C; (3) emplea formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1 %, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1 %, y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en 0,2 x SSC y SDS al 0,1 %, o (4) emplea un tampón de sulfato de dextrano al 10 %, 2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio), y formamida al 50 % a 55 °C, seguido por un lavado con elevado rigor consistente en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55 °C.

[0070] “Condiciones moderadamente rigurosas” se describen en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), e incluyen el uso de una disolución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica, y porcentaje de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es una condición tal como incubación durante la noche a 37 °C en una disolución que comprende: formamida al 20 %, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cizallado desnaturalizado, seguido por el lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50 °C. El técnico experto reconocerá como ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc., según sea necesario para acomodar factores tal como la longitud de la sonda y similares.

[0071] “Aislado”, cuando se usa para describir los diversos polipéptidos dados a conocer en la presente memoria

descriptiva, significa un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían normalmente con los usos diagnóstico o terapéutico del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En las realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa de giratoria, o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del WISP no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

[0072] El término “secuencias control” se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación unida de manera operable en un organismo hospedador concreto. Las secuencias control que son adecuadas para los procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

[0073] El ácido nucleico se “une de manera operable” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretora se une de manera operable al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador se une de manera operable a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma se une de manera operable a una secuencia de codificación si se sitúa de tal manera que facilita la traducción. Generalmente, “unido de manera operable” significa que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas, y, en el caso de una líder secretora, contigua y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen porqué ser contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligadura en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan oligonucleótidos sintéticos adaptadores o enlazadores de acuerdo con la práctica convencional.

[0074] Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que son útiles para la administración de un fármaco (tal como los polipéptidos WISP y las variantes de WISP dadas a conocer en la presente memoria descriptiva) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

[0075] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “inmuno adhesina” designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es diferente de la del sitio de reconocimiento del antígeno y el sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es “heteróloga”), y una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. La parte de la adhesina de una molécula de inmuno adhesina es normalmente una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmuno adhesina se puede obtener de cualquier anticuerpo de inmunoglobulina, tal como subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (que incluyen IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

[0076] “Activo” o “actividad” en el contexto de los polipéptidos WISP o variantes de WISP de la invención se refiere a la(s) forma(s) de proteínas de la invención que retienen las actividades biológica y/o inmunológica de un polipéptido WISP natural o que se produce naturalmente, en el que la actividad “biológica” se refiere a una función biológica (tanto inhibidora como estimuladora) producida por un polipéptido WISP natural o que se produce naturalmente diferente de la capacidad para servir como antígeno en la producción de un anticuerpo frente a un epítipo antigénico poseído por un polipéptido natural o que se produce naturalmente de la invención. Similarmente, una actividad “inmunológica” se refiere a la capacidad para servir como un antígeno en la producción de un anticuerpo frente a un epítipo antigénico poseído por un polipéptido natural o que se produce naturalmente de la invención.

[0077] “Actividad biológica” en el contexto de un polipéptido WISP o variante de WISP en la presente memoria descriptiva se usa para referirse a la capacidad de dichas moléculas de promover la regeneración de y/o evitar la destrucción del cartílago o de potenciar o promover la diferenciación o la proliferación de condriocitos (es decir, la diferenciación de una célula precursora en un condriocito maduro). Opcionalmente, el cartílago es cartílago articular y la regeneración y/o la destrucción del cartílago está asociada con una lesión o un trastorno cartilaginoso degenerativo. Por ejemplo, se puede cuantificar dicha actividad biológica mediante la inhibición de la liberación del proteoglicano (PG) del cartílago articular, el aumento en la síntesis de PG en el cartílago articular, la inhibición de la producción de NO, etc.

[0078] El término “trastorno cartilaginoso” se refiere generalmente a una enfermedad manifestada por síntomas de dolor, rigidez y/o limitación del movimiento de las partes corporales afectadas. Incluido dentro del alcance de “trastorno cartilaginoso” está el “trastorno cartilaginoso degenerativo” – un trastorno caracterizado, al menos en parte, por la degeneración o desarreglo metabólico de los tejidos conectivos del cuerpo, que incluyen no solo las articulaciones o las estructuras relacionadas, incluyendo los músculos, bolsas (membrana sinovial), tendones y tejido fibroso, pero también la placa de crecimiento. En una realización, el término incluye “trastorno del cartílago articular”, que está caracterizado por la perturbación de la superficie lisa del cartílago articular y la degradación de la matriz del cartílago. Las patologías adicionales incluyen la producción de óxido nítrico, y la inhibición o la reducción de la síntesis de la matriz.

[0079] Incluidas dentro del alcance del “trastorno del cartílago articular” están la osteoartritis (OA) y la artritis reumatoide (RA). La OA está caracterizada por la destrucción asimétrica localizada de la proporción del cartílago con alargamientos óseos palpables en los márgenes de las articulaciones. La OA afecta normalmente a las articulaciones interfalangeales de las manos, la primera articulación carpometacarpal, las caderas, las rodillas, la espina dorsal, y algunas articulaciones de la parte media del pie, aunque las grandes articulaciones, tales como los tobillos, los codos y los hombros tienden a separarse. La OA puede estar asociada con enfermedades metabólicas tales como hemocromatosis y alcaptonuria, desarrollo de anomalías tales como desarrollo de displasia de las caderas (dislocación congénita de las caderas), discrepancias en la longitud de las extremidades, que incluyen trauma y artritis inflamatoria tales como gota, artritis séptica, artritis neuropática. La OA puede también desarrollarse tras inestabilidad biomecánica extendida, tal como la resultante de lesiones deportivas u obesidad.

[0080] La artritis reumatoide (RA) es un trastorno autoinmune sistémico crónico caracterizado por sinovitis simétrica de la articulación y afecta normalmente por igual a las articulaciones diartroides pequeñas y grandes. A medida que la RA progresa, los síntomas pueden incluir fiebre, pérdida de peso, adelgazamiento de la piel, implicación multiorgánica, escleritis, úlceras córneas, la formación de nódulos subcutáneos o subperiosteales e incluso muerte prematura. Los síntomas de la RA aparecen a menudo durante la juventud y pueden incluir vasculitis, atrofia de la piel y el músculo, nódulos subcutáneos, linfadenopatía, leucopenia y anemia crónica.

[0081] Además, el término “trastorno cartilaginoso degenerativo” puede incluir lupus sistémico eritematoso y gota, amiloidosis o síndrome de Felty. Adicionalmente, el término cubre la degradación y la destrucción del cartílago asociadas con la artritis psoriática, la osteoartritis, inflamación aguda (por ejemplo, artritis por Yersinia, artritis por pirofosfato, artritis gotosa (artritis úrica), artritis séptica), artritis asociada con trauma, colitis ulcerosa (por ejemplo, enfermedad de Crohn), esclerosis múltiple, diabetes (por ejemplo, dependiente de insulina y no dependiente de insulina), obesidad, artritis de células gigantes y síndrome de Sjögren.

[0082] Los ejemplos de otras enfermedades inmunes e inflamatorias, al menos alguna de las cuales puede ser tratable mediante los procedimientos de la invención incluyen, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (escleroderma), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria nocturna paroxismica), trombocitopenia autoinmune (púrpura idiopática trombocitopénica, trombocitopenia inmunomediada), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica) enfermedades inflamatorias autoinmunes (por ejemplo, encefalomiелitis alérgica, esclerosis múltiple, diabetes mellitus insulino dependiente, uveoretinitis autoinmune, tirototoxicosis, escleroderma, lupus sistémico eritematoso, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enteritis regional, ileitis distal, enteritis granulomatosa, ileitis regional, ileitis terminal) enfermedad tiroidea autoinmune, anemia perniciosa) y rechazo al aloinjerto, diabetes mellitus, enfermedad renal inmunomediada (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepato biliares tales como hepatitis infecciosas (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y colangitis esclerosante, enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), enteropatía sensible a gluten, y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o inmunomediadas que incluyen enfermedades bullosas de la piel, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón tales como neumonías eosinófilas, fibrosis pulmonar idiopática, pneumonitis hipersensible, enfermedades asociadas a trasplante que incluyen rechazo al injerto y enfermedad injerto frente a hospedador. Enfermedades infecciosas que incluyen enfermedades víricas tales como SIDA (infección por VIH), hepatitis A, B, C, D, y E, herpes, etc., infecciones bacterianas, infecciones fúngicas, infecciones protozoarias, infecciones parasitarias, y virus sincitial respiratorio, virus de la inmunodeficiencia humana, etc) y trastornos alérgicos, tales como hipersensibilidad anafiláctica, asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, conjuntivitis vernal, eczema, urticaria y alergias alimentarias, etc.

[0083] “Tratamiento” es una intervención llevada a cabo con la intención de evitar el desarrollo o alterar la patología de un trastorno. De acuerdo con esto, “tratamiento” se refiere al tratamiento terapéutico y a las medidas

profilácticas o preventivas, en las que el objeto es evitar o retrasar (disminuyendo) la dolencia o el trastorno patológico diana. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen los que ya presentan el trastorno así como aquellos en los que se va a evitar el trastorno. En el tratamiento de un trastorno cartilaginoso degenerativo, un agente terapéutico puede disminuir o aumentar directamente la magnitud de la respuesta de un componente patológico del trastorno, o volver la enfermedad más susceptible al tratamiento por otros agentes terapéuticos, *por ejemplo*, antibióticos, antifúngicos, agentes antiinflamatorios, agentes quimioterapéuticos, etc.

[0084] El término “cantidad eficaz” es la concentración mínima de polipéptido WISP que produce, o induce o da como resultado tanto una mejora detectable como la reparación del cartílago dañado o una protección medible de la destrucción continuada o inducida del cartílago en una muestra aislada de matriz del cartílago (*por ejemplo*, retención de proteoglicanos en la matriz, inhibición de la liberación de proteoglicano de la matriz, estimulación de la síntesis de proteoglicano). Además, una “cantidad terapéuticamente eficaz es la concentración mínima (cantidad) de polipéptido WISP administrada a un mamífero que sería eficaz atenuando al menos un síntoma patológico (*por ejemplo*, produciendo, induciendo o dando como resultado una protección medible de la destrucción continuada o inicial del cartílago, mejora en el intervalo del movimiento, reducción del dolor, etc) que se produce como resultado de lesión o un trastorno cartilaginoso degenerativo.

[0085] “Agente cartilaginoso” puede ser un factor de crecimiento, citocina, molécula pequeña, anticuerpo, elemento de ARN o ADN, virus, partícula, péptido, o agente químico que tenga un efecto beneficioso en el cartílago, incluyendo factores de crecimiento peptídicos, antagonistas del catabolismo y factores osteo, sinoviales o antiinflamatorios. Alternativamente, “agente cartilaginoso” puede ser un factor de crecimiento peptídico – tal como cualquiera de los factores de crecimiento del fibroblasto (por ejemplo, FGF-1, FGF-2,... FGF-21, etc.), de IGF (I y II) TGF- β (1-3), BMP (1-7), o miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico tales como EGF, HB-EGF, TGF-B – que potenciaría la respuesta reparativa intrínseca del cartílago, por ejemplo, alterando la proliferación, diferenciación, migración, adhesión o producción de la matriz por los condriocitos. Alternativamente, un “agente cartilaginoso” puede ser un factor que antagoniza el catabolismo del cartílago (por ejemplo, el antagonista del receptor IL-1 (IL-1ra), inhibidores NO, inhibidores de la IL-beta convertasa (ICR), factores que inhiben la actividad de IL-6, IL-8, LIF, IFN-gamma, o la actividad de TNF-alfa, tetraciclinas y sus variantes, inhibidores de la apoptosis, inhibidores de las MMP, inhibidores de las agregasas, inhibidores de la serina y cisteína proteinasas tales como catépsinas y urocinasa o inhibidor del plasminógeno tisular (uPA y tPA). Alternativamente todavía, el agente cartilaginoso incluye factores que actúan indirectamente sobre el cartílago afectando el hueso subyacente (es decir, osteofactores, por ejemplo, bifosfonatos u osteoprotegerina) o el sinovio que los rodea (es decir, factores sinoviales) o factores antiinflamatorios (por ejemplo, anti-TNF-alfa (que incluye anticuerpos dirigidos contra TNF-alfa tales como Remicade®, así como inmunoadhesinas receptoras de TNF tales como Enbrel®, IL-1ra, IL-4, IL-10, IL-13, NSAID). Para una revisión de los ejemplos de agentes cartilaginosos, véanse por favor Martel-Pelletier y col., Front. Biosci. 4: d694-703 (1999); Hering, T.M., Front. Biosci. 4: d743-761 (1999).

[0086] Administración “crónica” se refiere a la administración del(de los) factor(es) en un modo continuo en oposición a un modo agudo, con el fin de mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo alargado de tiempo. Administración “intermitente” es el tratamiento que no se lleva a cabo consecutivamente sin perturbación, sino que más bien es cíclico en la naturaleza.

[0087] “Mamífero”, para los fines del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo los seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, deportes, o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, ganado, cerdos, hámsters, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

[0088] Administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (concurrente) y la administración consecutiva en cualquier orden.

[0089] “Vehículos” tal como se usa en la presente memoria descriptiva incluye vehículos, excipientes, o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero que se está exponiendo a los mismos en las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución acuosa a pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos), proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes azucarados tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS®, ácido hialurónico (HA).

II: Procedimientos y composiciones de la invención

[0090] De acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva, se pueden emplear

diversos polipéptidos WISP para el tratamiento de trastornos cartilaginosos degenerativos así como de otras diversas dolencias inmunes e inmunorelacionadas. Dichos polipéptidos WISP incluyen los polipéptidos denominados en el presente documento como WISP-1, WISP-2, y WISP-3 y sus variantes (así como sus proteínas de fusión tales como las formas etiquetadas con epítomos o sus construcciones de fusión con Ig). Los polipéptidos WISP pueden usarse *in vivo* así como *ex vivo*. Opcionalmente, los polipéptidos WISP se usan en la forma de composiciones farmacéuticas, descritas en detalle adicionalmente a continuación.

[0091] Los trastornos cartilaginosos degenerativos contemplados por la invención incluyen la artritis reumatoide (RA). La RA es una enfermedad degenerativa sistémica autoinmune que puede producir perturbaciones simétricas en el sinovio de las articulaciones diartrodiales grandes y pequeñas. A medida que la enfermedad progresa, los síntomas de la RA pueden incluir fiebre, pérdida de peso, adelgazamiento de la piel, implicación multiorgánica, escleritis, úlceras de la córnea, formación de nódulos subcutáneos o subperiosteales y muerte prematura. Los síntomas de la RA aparecen normalmente durante la juventud, las manifestaciones extraarticulares pueden afectar cualquier sistema orgánico, y la destrucción de la articulación es simétrica y se produce igualmente en las articulaciones grandes y pequeñas. Los síntomas extraarticulares pueden incluir vasculitis, atrofia de la piel y del músculo, nódulos subcutáneos, linfadenopatía, esplenomegalia, leucopenia, y anemia crónica. La RA tiende a ser heterogénea en la naturaleza con una expresión variable de la enfermedad y se asocia con la formación del factor reumatoide en suero en el 90 % de pacientes alguna vez durante el curso de la enfermedad. Los pacientes de RA tienen también normalmente un sistema inmune hiperactivo. La mayoría de personas con RA tienen una susceptibilidad genética asociada con un aumento de actividad de las moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor de tipo II sobre monocitos y macrófagos. Estas moléculas del complejo de histocompatibilidad están implicadas en la presentación del antígeno a los receptores que soportan los linfocitos T activados de estas moléculas de tipo II. La predisposición genética a la RA está apoyada por la prevalencia del subtipo Dw4, **Dw14** y Dw15 del antígeno DR del leucocito muy conservado.

[0092] La osteoartritis (OA) es otro trastorno cartilaginoso degenerativo que implica una enfermedad localizada que afecta al cartílago articular y al hueso y da como resultado dolor y una disminución de la función de la articulación. La OA puede clasificarse en dos tipos: primaria y secundaria. La OA primaria se refiere al espectro de enfermedades degenerativas de las articulaciones para las cuales no se ha determinado etiología subyacente. Normalmente, las articulaciones afectadas por la OA primaria son las articulaciones interfalangeales de las manos, las primeras articulaciones carpometacarpales, las caderas, las rodillas, la espina dorsal, y algunas articulaciones en la parte media del pie. Las grandes articulaciones tales como los tobillos, los codos y los hombros tienden a separarse en la OA primaria. En contraste, la OA secundaria se produce a menudo como resultado de una lesión o trauma definido. Se puede encontrar también la artritis secundaria en individuos con enfermedades metabólicas tales como hemocromatosis y alcaptonuria, desarrollo de anomalías tales como desarrollo de displasia de las caderas (dislocación congénita de las caderas) y discrepancias en la longitud de las extremidades, obesidad, artritis inflamatoria tal como artritis reumatoide o gota, artritis séptica, y artritis neuropática.

[0093] La degradación asociada con la OA aparece inicialmente como deshilachamiento y fibrilación de la superficie del cartílago articular a medida que se pierden los proteoglicanos de la matriz. Con el uso continuado de la articulación, los progresos de la fibrilación superficial, los defectos penetran en profundidad en el cartílago, y se pierden elementos del tejido cartilaginoso. Además, el hueso en el que subyace el cartílago (hueso subcondrial) pierde grosor, y, a medida que se pierde cartílago, el hueso llega a quedar ligeramente expuesto. Con la destrucción asimétrica del cartílago, se puede producir la desfiguración. Se forman a menudo nódulos óseos, denominados osteofitos, en la periferia de la superficie del cartílago y ocasionalmente crecen sobre las áreas erosionadas adyacentes. Si se permean las superficies de estas extensiones óseas, se puede producir la extensión vascular y producir la formación de tapones tisulares que contienen fibrocartílago.

[0094] Ya que el cartílago es avascular, el daño que se produce a la capa del cartílago pero que no penetra en el hueso subcondrial, deja el trabajo de reparación a los condrocitos residentes, que tienen poco potencial intrínseco para la replicación. Sin embargo, cuando el hueso subcondrial está penetrado, su suministro vascular permite que tenga lugar un proceso trifásico de reparación. El cartílago subóptimo que se sintetiza en respuesta a este tipo de daño, denominado en la presente memoria descriptiva "fibrocartílago" debido a su matriz fibrosa, tiene propiedades bioquímicas y mecánicas subóptimas, y de esta manera está sujeto a cizalladura y destrucción adicionales. En una articulación enferma o dañada, el aumento de la liberación de las metaloproteinasas (MMP) tal como las colagenasas, gelatinasas, estromalinas, agreganasas, y otras proteasas, conduce a un adelgazamiento y pérdida de cartílago adicionales. Los estudios *in vitro* han demostrado que las citocinas tales como IL-1 alfa, IL-1 beta, TNF-alfa, PDGF, GM-CSF, IFN-gamma, TGF-beta, LIF, IL-2 e IL-6, IL-8 pueden alterar la actividad de las células sinoviales similares a fibroblastos, macrófagos, linfocitos T, y/o osteoclastos, sugiriendo que estas citocinas pueden regular el recambio *in vivo* de la matriz del cartílago.

[0095] Las propiedades mecánicas del cartílago se determinan mediante su composición bioquímica. Aunque la arquitectura del colágeno contribuye a la resistencia a la tracción y a la rigidez del cartílago, la compresibilidad (o elasticidad) es debida a su componente de proteoglicano. En cartílago articular sano, predomina el colágeno de tipo

II (que comprende aproximadamente un 90-95 %), sin embargo, están también presentes cantidades más pequeñas de colágeno de los tipos V, VI, IX, y XI. Los proteoglicanos del cartílago (PG) incluyen PG agregadores hidrodinámicamente grandes, con glicosaminoglicanos sulfatados unidos covalentemente, así como PG no agregadores hidrodinámicamente más pequeños tales como decorina, biglicano y lumican.

[0096] Las lesiones del cartílago pueden clasificarse en tres categorías: (1) microlesión o trauma contundente, (2) fracturas condriales, y (3) fracturas osteocondriales.

[0097] La microlesión de los condriocitos y de la matriz del cartílago puede estar producida por un único impacto, mediante trauma contundente repetitivo, o con uso continuo de una articulación biomecánicamente inestable. Pueden replicarse los cambios metabólicos y biomecánicos tales como los que se encuentran en las etapas tempranas de la artritis degenerativa en modelos animales que implican la carga repetitiva del cartílago articular. Radin y col., Clin. Orthop. Relat. Res. 131: 288-93 (1978). Dichos experimentos junto con los distintos modelos de pérdida del cartílago que se encuentran en las articulaciones artríticas, acentúan el papel que juega la carga biomecánica en la pérdida de la homeostasis y la integridad del cartílago articular en la enfermedad. Radin y col., J Orthop Res. 2: 221-234 (1984); Radin y col., Semin Arthritis Rheum (suppl. 2) 21: 12-21 (1991); Wei y col., Acta Orthop Scand 69: 351-357 (1998). Aunque los condriocitos pueden inicialmente ser capaces de reponer la matriz del cartílago con proteoglicanos a una velocidad basal, el daño concurrente de la red de colágeno puede aumentar la tasa de pérdida y dar como resultado una degeneración irreversible. Buckwalter y col., J. Am. Acad. Orthop. Surg. 2: 192-201 (1994).

[0098] Las fracturas condriales están caracterizadas por la perturbación de la superficie articular sin violación de la placa subcondrial. Se produce la necrosis de los condriocitos en el sitio de la lesión, seguida por el aumento de la actividad mitótica y metabólica de los condriocitos sobrevivientes que bordean la lesión lo que conduce al revestimiento de las hendiduras de la superficie articular con tejido fibroso. El aumento en la actividad de los condriocitos es transitorio, y la respuesta de reparación da como resultado una cantidad y calidad insuficientes de nuevos componentes de la matriz.

[0099] Las fracturas osteocondriales, las más graves de los tres tipos de lesiones, son lesiones que cruzan el margen en la placa subcondrial subyacente. En este tipo de lesión, la presencia de vasculatura subcondrial estimula la respuesta en tres fases que se encuentra normalmente en los tejidos vasculares. (1) necrosis, (2) inflamación, y (3) reparación. Inicialmente la lesión se rellena con sangre y coágulos. El coágulo de fibrina resultante activa una respuesta inflamatoria y llega a vascularizar el tejido de reparación, y los diversos componentes celulares liberan factores de crecimiento y citocinas que incluyen el factor beta de transformación del crecimiento (TGF-beta), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), las proteínas morfogénicas óseas, y los factores I y II de crecimiento similares a insulina. Buckwalter y col., J. Am. Acad. Orthop. Surg. 2: 191-201 (1994).

[0100] La respuesta inicial de reparación asociada con las fracturas osteocondriales se caracteriza por el reclutamiento, la proliferación y la diferenciación de precursores en los condriocitos. Se depositan citoblastos mesenquimales en la red de fibrina que llega a ser eventualmente una zona fibrocartilaginosa. F. Shapiro y col., J. Bone Joint Surg. 75: 532-53 (1993); N. Mitchell y N. Shepard, J. Bone Joint Surg. 58: 230-33 (1976). Estos citoblastos, que se cree que provienen de la médula ósea subyacente más bien que de la superficie articular adyacente, se diferencian progresivamente en condriocitos. A las seis a ocho semanas después de la lesión, el tejido de reparación contiene células similares a condriocitos en una matriz de proteoglicanos y predominantemente de colágeno de tipo II, con algún colágeno de tipo I. T. Furukawa y col., J. Bone Joint Surg. 62: 79-89 (1980); J. Cheung y col., Arthritis Rheum. 23: 211-19 (1980); S.O. Hjertquist y R. Lemperg, Calc. Tissue Res. 8: 54-72 (1971). Sin embargo, esta matriz depositada de nuevo degenera, y el tejido condroide se sustituye por más tejido fibroso y fibrocartílago y un desplazamiento en la síntesis de colágeno del tipo II al tipo I. H.S. Cheung y col., J. Bone Joint Surg. 60: 1076-81 (1978); D. Hamerman, "Prospects for medical intervention in cartilage repair," Joint cartilage degradation: Basic and clinical aspects, Eds. Woessner JF y col., (1993); Shapiro y col., J. Bone Joint Surg. 75: 532-53 (1993); N. Mitchell y N. Shepard, J. Bone Joint Surg. 58: 230-33 (1976); S.O. Hjertquist y R. Lemperg, Calc. Tissue Res. 8: 54-72 (1971). Los cambios degenerativos tempranos incluyen la fibrilación superficial, el agotamiento de los proteoglicanos, la clonación y muerte de los condriocitos, y la fisuración vertical desde las capas superficiales a las profundas. Un año después de la lesión, el tejido de reparación es una mezcla de fibrocartílago y cartílago hialino, con una cantidad sustancial de colágeno de tipo I, que no se encuentra en cantidades apreciables en el cartílago articular normal. T. Furukawa, y col., J. Bone Joint Surg. 62: 79-89 (1980).

[0101] Aunque la inflamación no parece ser el suceso iniciador en la osteoartritis, la inflamación se produce en las articulaciones osteoartíticas. Las células inflamatorias (es decir, monocitos, macrófagos, y neutrófilos) que invaden el revestimiento sinovial tras la lesión y durante la inflamación producen metaloproteinasas así como citocinas catabólicas que pueden contribuir a la liberación adicional de enzimas degradativas. Aunque la inflamación y la destrucción de la articulación no muestran una perfecta correlación en los modelos animales de artritis, agentes tales como IL-4, IL-10 e IL-13 que inhiben la inflamación disminuyen también la patología del cartílago y el hueso en animales artríticos (revisado en Martel-Pelletier J. y col. Front. Biosci. 4: d694-703). La aplicación de agentes que

inhiben las citocinas inflamatorias puede retrasar la progresión de la OA contrarrestando la sinovitis localizada que se produce en pacientes de OA.

[0102] La OA implica no solo la degeneración del cartílago articular que conduce a la eburnación del hueso, sino también a la extensa remodelación del hueso subcondrial que da como resultado a así denominada esclerosis de este tejido. Estos cambios óseos están acompañados a menudo por la formación de quistes subcondriales como resultado de la resorción focal. Los agentes que inhiben la resorción del hueso, es decir, la osteoprotogerina o los bifosfonatos han mostrado prometedores resultados en un modelo animal de artritis. Kong y col. Nature 402: 304-308 (1999).

[0103] En el lupus sistémico eritematoso, el mediador central de la enfermedad es la producción de anticuerpos autorreactivos para autoproteínas/autotejidos y la posterior generación de inflamación inmunomediada. Estos anticuerpos median tanto directa como indirectamente la lesión del tejido. Aunque los linfocitos T no han demostrado estar directamente implicados en el daño tisular, se requieren linfocitos T para el desarrollo de anticuerpos autorreactivos. La génesis de la enfermedad es de esta manera dependiente de los linfocitos T. Múltiples órganos y sistemas están clínicamente afectados incluyendo riñón, pulmón, sistema musculoesquelético, sistema mucocutáneo, ojos, sistema nervioso central, sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal, médula ósea y sangre.

[0104] La artritis crónica juvenil es una enfermedad inflamatoria idiopática crónica que comienza a menudo antes de los 16 años y que tiene algunas similitudes con la RA: Algunos pacientes que tienen factor reumatoide positivo se clasifican como artritis reumatoide juvenil. La enfermedad está subclasificada en tres categorías principales: pauciarticular, poliarticular, y sistémica. La artritis puede ser grave y conduce a la anquilosis de la articulación y al crecimiento retardado. Otras manifestaciones pueden incluir uveítis anterior crónica y amiloidosis sistémica.

[0105] Las espondiloartropatías son un grupo de trastornos con algunas características clínicas comunes y la asociación común con la expresión del producto génico HLA-B27. Los trastornos incluyen: espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter (artritis reactiva), artritis asociada con enfermedad inflamatoria del intestino, espondilitis asociada con psoriasis, inicio juvenil de la espondiloartropatía y espondiloartropatía indiferenciada. Las características distintivas incluyen sacroileítis con o sin espondilitis; artritis asimétrica inflamatoria, asociación con HLA-B27 (un alelo serológicamente definido del locus HLA-B de la MHC del tipo I), inflamación ocular, y ausencia de autoanticuerpos asociados con otra enfermedad reumatoide. La célula a la que se implica más como clave para la inducción de la enfermedad es el linfocito T CD8 + , una célula que dirige el antígeno presentado por las moléculas MHC de tipo I. Las células T CD8 + pueden reaccionar frente al aleloHLA-B27 de la MHC de tipo I como si este fuera un péptido extraño expresado por las moléculas MHC de tipo I. Se ha teorizado que un epítipo de HLA-B27 puede imitar un epítipo bacteriano u otro antigénico microbiano e inducir de esta manera una respuesta de los linfocitos T CD8 + .

[0106] Los polipéptidos WISP empleados en la invención se pueden preparar mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo técnicas de expresión recombinante. Los expertos en la materia conocen bien la tecnología de expresión recombinante, y se describen materiales y procedimientos opcionales en la solicitud PCT, WO99/21998. Opcionalmente, los polipéptidos WISP se expresaban usando células hospedadoras tales como células CHO, células *E. coli* o levaduras. Los polipéptidos WISP pueden comprender polipéptidos de longitud completa (definidos en la presente memoria descriptiva), o sus formas variantes, así como otras formas modificadas de los polipéptidos WISP (tales como mediante fusión o unión a una inmunoglobulina, epítipo etiqueta, cremallera de leucina u otro polímero no proteináceo).

[0107] Se contemplan moléculas de inmunoadhesina para uso en los procedimientos de la presente memoria descriptiva. Las inmunoadhesinas WISP pueden comprender diversas formas de WISP, tales como el polipéptido de longitud completa así como sus formas variantes o fragmentos. En una realización, la molécula puede comprender una fusión del WISP con una inmunoglobulina o una región concreta de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la inmunoadhesina, dicha fusión podría ser en la región Fc de una molécula de IgG. Para la producción de las fusiones de inmunoglobulinas, véanse también la Patente de los Estados Unidos N° 5.428.130 otorgada el 27 de junio de 1995 y Chamow y col., TIBTECH, 14: 52-60 (1996).

[0108] En otra realización, el polipéptido WISP puede estar modificado covalentemente mediante la unión del polipéptido a una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), propilenglicol, o polioxialquilenos, de la manera que se muestra en las Patentes de los Estados Unidos N°s 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. Dichas formas pegiladas del polipéptido WISP se pueden preparar usando las técnicas conocidas en la materia.

[0109] Las formas de cremallera de leucina de estas moléculas están contempladas también por la invención. "cremallera de leucina" es un término en la técnica usado para referirse a una secuencia rica en leucina que potencia, promueve, o impulsa la dimerización o la trimerización de su compañero de fusión (por ejemplo, la secuencia o molécula a la cual se fusiona o se une la cremallera de leucina. Se han descrito en la técnica diversos polipéptidos de cremallera de leucina. Véanse, por ejemplo, Landschulz y col., Science, 240: 1759 (1988); Patente

de los Estados Unidos 5.716.805; documento WO 94/10308; Hoppe y col., FEBS Letters, 344: 1991 (1994); Maniatis y col., Nature, 341: 24 (1989). Los expertos en la materia apreciarán que se puede fusionar una secuencia de cremallera de leucina en cualquiera del extremo 5' o 3' del polipéptido WISP.

[0110] Los polipéptidos WISP de la presente invención pueden estar también modificados de manera que formen moléculas quiméricas mediante fusión del polipéptido receptor con otro, polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos. Preferiblemente dicho polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos es uno que actúa para oligomerizar la molécula quimérica. En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido WISP con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al cual se puede unir selectivamente un anticuerpo dirigido contra la etiqueta. El epítipo etiqueta se coloca generalmente en el término amino o carboxilo del polipéptido. La presencia de dicha forma de epítipo etiquetado del polipéptido WISP se puede detectar usando un anticuerpo dirigido contra el polipéptido etiqueta. También, con la condición de que el epítipo etiqueta permita al polipéptido WISP purificarse fácilmente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo dirigido contra la etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se una al epítipo etiqueta. Se conocen bien en la técnica diversos polipéptidos etiquetas y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta flu HA y su anticuerpo 12CA5 [Field y col., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la anterior [Evan y col., Molecular and Cellular Biology, 2: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de la glicoproteína D (gD) del virus del Herpes Simple y su anticuerpo [Paborsky y col., Protein Engineering, 3(6) : 547-553 (1990)]. Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido Flag [Hopp y col., BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido del epítipo KT3 [Martin y col., Science, 255: 192-194 (1992)]; un péptido del epítipo de α -tubulina [Skinner y col., J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; y el péptido etiqueta de la proteína 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)].

[0111] Las formulaciones de los polipéptidos WISP empleables con la invención se pueden preparar mezclando el polipéptido WISP que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. [1980]). Dichas formulaciones pueden estar en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes, o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, dextrinas, o hialuronano; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína), y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG).

[0112] Los polipéptidos WISP pueden prepararse también atrapando en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente. Dichas preparaciones se pueden administrar en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición (o sucesivas), Osol A. Ed. (1980).

[0113] Cuando se desea la administración en liberación continua o liberación ampliada de los polipéptidos WISP en una formulación con características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que requiera la administración de dichos polipéptidos, se contempla la microencapsulación. Se ha llevado a cabo de manera satisfactoria la microencapsulación de proteínas recombinantes para la liberación continua. Véanse, por ejemplo, Johnson y col., Nat. Med. 2: 795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther. 27: 1221-1223 (1993); Hora y col., Bio/Technology 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems" en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds., (Plenum Press: Nueva York, 1995), pp. 439-462; documentos WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399 y Patente de los Estados Unidos N° 5.654.010.

[0114] Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación continua incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la molécula activan con matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación continua incluyen uno o más polianhídridos (por ejemplo, documento U.S.P. 4.891.225; 4.767.628), poliésteres tales como poliglicólidos, poliláctidos y poliláctido-co-glicólidos (por ejemplo, documento U.S.P. 3.773.919; U.S.P. 4.767.628; U.S.P. 4.530.840; Kulkarni y col., Arch. Surg. 93: 839 (1966)), poliaminoácidos tales como polilisina, polímeros y copolímeros de óxido de polietileno, acrilatos de óxido de polietileno, poliácridatos, etileno-acetato de vinilo,

poliamidas, poliuretanos, poliortoésteres, poliacetilnitrilos, polifosfacenos, e hidrogeles de poliéster (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilatos), o poli(vinilalcohol)), celulosa, acetatos de celulosa sustituidos por acilo, poliuretanos no degradables, poliestirenos, cloruro de polivinilo, fluoruro de polivinilo, poli(vinilimidazol), poliolefinas clorosulfonadas, óxido de polietileno, copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante 100 días, algunos hidrogeles liberan proteínas durante periodos más cortos de tiempo. Los polímeros no biodegradables adicionales que se pueden emplear son polietileno, polivinilpirrolidona, vinilacetato de etileno, polietilenglicol, acetato butirato de celulosa y acetato propionato de celulosa.

[0115] Alternativamente, las formulaciones de liberación continua pueden estar compuestas de materiales biológicos degradables. Los polímeros biodegradables son formulaciones de fármacos atractivos debido a su biocompatibilidad, alta responsabilidad por la degradación específica, y facilidad de incorporar el fármaco activo en la matriz biológica. Por ejemplo, el ácido hialurónico (HA) puede reticularse y usarse como vehículo hinchable de administración polimérica de materiales biológicos. Documento U.S.P. 4.957.744; Valle y col., Polym. Mater. Sci. Eng. 62: 731-735 (1991). Se ha preparado también un polímero HA injertado con polietilenglicol como una matriz de administración mejorada que redujo la fuga no deseada del fármaco y la desnaturalización asociada con el almacenamiento a largo plazo en condiciones fisiológicas. Kazuteru, M., J. Controlled Release 59: 77-86 (1999). Los polímeros biodegradables adicionales que se pueden usar son poli(caprolactona), polianhídridos, poliaminoácidos, poliortoésteres, policianoacrilatos, poli(fosfazinas), poli(fosfodiésteres), poliesteramidas, polidioxanonas, poliacetales, poliacetales, policarbonatos, poliortocarbonatos, poliuretanos degradables y no tóxicos, polihidroxiilbutiratos, polihidroxi valeratos, oxalatos de polialquileño, succinatos de polialquileño, ácido poli(málico), quitina y quitosán.

[0116] Alternativamente, se pueden usar hidrogeles biodegradables como vehículos de administración de liberación controlada de materiales y fármacos biológicos. Mediante la elección apropiada de macrómeros, se pueden producir membranas con un intervalo de permeabilidad, tamaños de poro y velocidades de degradación adecuados para una amplia variedad de biomoléculas.

[0117] Alternativamente, los sistemas de administración de liberación continua de materiales y fármacos biológicos pueden estar compuestos de dispersiones. Las dispersiones pueden clasificarse adicionalmente ya sea como suspensiones o como emulsiones. En el contexto de los vehículos de administración de materiales biológicos, las suspensiones son una mezcla de partículas sólidas muy pequeñas que están dispersas (más o menos uniformemente) en un medio líquido. Las partículas sólidas de una suspensión pueden variar de tamaño desde unos pocos nanómetros a cientos de micrómetros, e incluyen microesferas, microcápsulas y nanoesferas. Las emulsiones, por otra parte, son una mezcla de dos o más líquidos inmiscibles que se mantienen en suspensión mediante pequeñas cantidades de emulsificantes. Los emulsificantes forman una película interfacial entre los líquidos inmiscibles y se conocen también como tensioactivos o detergentes. Las formulaciones de emulsión pueden ser de aceite en agua (aceite/agua) en las que el agua es una fase continua mientras que el aceite o la grasa está dispersa, así como de agua en aceite (agua/aceite), en la que el aceite está en una fase continua mientras que el agua está dispersa. Un ejemplo de una formulación de liberación continua adecuada se da a conocer en el documento WO 97/25563. Adicionalmente, las emulsiones para el uso con los materiales biológicos incluyen múltiples emulsiones, microemulsiones, microgotículas y liposomas. Las microgotículas son vesículas fosfolipídicas unilamelares que consisten en una capa esférica de lípidos con una fase oleosa en el interior. Por ejemplo, documentos U.S.P. 4.622.219 y U.S.P. 4.725.442. Los liposomas son vesículas fosfolipídicas preparadas mezclando lípidos polares insolubles en agua con una disolución acuosa.

[0118] Alternativamente, las formulaciones de liberación continua de los polipéptidos WISP se pueden desarrollar usando ácido poli-láctico-coglicólico (PLGA), un polímero que presenta un fuerte grado de biocompatibilidad y un amplio intervalo de propiedades biodegradables. Los productos de degradación del PLGA, los ácidos láctico y glicólico, se aclaran rápidamente del cuerpo humano. Además, se puede ajustar la degradabilidad de este polímero de meses a años dependiendo de su peso molecular y de la composición. Para información adicional véase Lewis, "Controlled Release of Bioactive Agents from Lactide/Glycolide polymer," en Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems M. Chasin y R. Langeer, editores (Marcel Dekker: Nueva York, 1990), pp. 1-41.

[0119] Los polipéptidos encapsulados o polipéptidos en una formulación de liberación extendida se pueden impartir formulando el polipéptido con unas "sales metálicas polivalentes solubles en agua" que no sean tóxicas a la concentración y temperatura de liberación. Los "metales polivalentes" a modo de ejemplo incluyen los siguientes cationes: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} , Al^{2+} y Al^{3+} . Los aniones a modo de ejemplo que forman las sales solubles en agua con los anteriores cationes metálicos polivalentes incluyen los formados por ácidos inorgánicos y/o ácidos orgánicos. Dichas sales solubles en agua tienen solubilidad en agua (a 20 °C) de al menos aproximadamente 20 mg/ml, alternativamente 100 mg/ml, alternativamente 200 mg/ml.

[0120] Los ácidos inorgánicos adecuados que se pueden usar para formar las "sales metálicas polivalentes solubles en agua" incluyen ácido clorhídrico, sulfúrico, nítrico, tiocianico y fosfórico. Los ácidos orgánicos adecuados que se pueden usar incluyen ácidos carboxílicos alifáticos y ácidos aromáticos. Los ácidos alifáticos comprendidos dentro de esta definición pueden definirse como ácidos carboxílicos C₂₋₉ saturados o insaturados (por ejemplo, ácidos alifáticos mono, di y tricarboxílicos). Las sales metálicas polivalentes solubles en agua comúnmente empleadas que se pueden usar para ayudar a estabilizar los polipéptidos encapsulados de esta invención incluyen, por ejemplo: (1) las sales metálicas de ácidos inorgánicos de haluros (por ejemplo, cloruro de cinc, cloruro de calcio), sulfatos, nitratos, fosfatos y tiocianatos; (2) las sales metálicas de ácidos carboxílicos alifáticos acetato de calcio, acetato de cinc, propionato de calcio, glicolato de cinc, lactato de calcio, lactato de cinc y tartrato de cinc; y (3) las sales metálicas de ácidos carboxílicos aromáticos de benzoatos (por ejemplo, benzoato de cinc) y salicilatos.

[0121] A fines de que las formulaciones se usen para la administración *in vivo*, deben ser estériles. La formulación puede volverse fácilmente estéril mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y la reconstitución. Las composiciones terapéuticas de la presente memoria descriptiva se colocan generalmente en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de disolución intravenosa que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

[0122] Para el tratamiento del mamífero *in vivo*, la ruta de administración está de acuerdo con los procedimientos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por rutas intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intralesional o intraarticular, administración, por medio de liberación continua o liberación extendida. Opcionalmente, el compuesto o formulación activa se inyecta directa o localmente en la región cartilaginosa o unión articular afectada. El tratamiento contemplado por la invención puede tomar la forma de terapia génica.

[0123] Las dosificaciones y las concentraciones de fármaco deseadas de las composiciones farmacéuticas empleables con la presente invención pueden variar dependiendo del uso concreto imaginado. La determinación de la dosificación o ruta de administración apropiada está dentro de los conocimientos del médico especialista normalmente experto. Los experimentos animales pueden proporcionar directrices fiables para la determinación de las dosis eficaces para la terapia humana. Se puede llevar a cabo el escalado interespecies de dosis eficaces siguiendo los principios que se determinan en Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" in *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi y col., Eds., Pergamon Press, Nueva York 1989, pp. 42-96.

[0124] Cuando se emplea la administración *in vivo* de polipéptidos WISP, las cantidades normales de dosificación pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal del mamífero o más por día, preferiblemente aproximadamente 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día dependiendo de la ruta de administración. Se proporcionan en la bibliografía directrices para las dosificaciones y procedimientos de administración concretos; véanse, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos N^{os} 4.657.760; 5.206.344 o 5.225.212. Se anticipa que diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes tratamientos y diferentes trastornos, y que la administración prevista para tratar un órgano o tejido específico, puede necesitar la administración de una manera diferente de la de otro órgano o tejido.

[0125] Las formulaciones utilizadas en la presente memoria descriptiva pueden contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación concreta que se está tratando, preferiblemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. El polipéptido WISP se puede administrar en combinación con un agente citotóxico, citocina o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes en las combinaciones y cantidades que son eficaces para el fin previsto. Puede ser deseable también administrar anticuerpos contra otra enfermedad inmune asociada o antígenos asociados a tumores, tales como anticuerpos que se unan a CD20, CD11a, CD 40, CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, o al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Alternativamente, o además, se pueden administrar simultáneamente al paciente dos o más anticuerpos que se unen al mismo o a dos o más antígenos diferentes dados a conocer en la presente memoria descriptiva. Algunas veces, puede ser beneficioso administrar también una o más citocinas al paciente. En una realización, los polipéptidos de la invención se administran simultáneamente con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento se puede administrar en primer lugar, seguido por un polipéptido WISP de la invención. Se pueden administrar aún otros agentes en combinación con el polipéptido WISP, tales como agentes similares a decorina o biglicano. Se contempla también la administración simultánea o la administración secuencial.

[0126] Se puede administrar también el presente procedimiento en combinación con cualquier técnica quirúrgica normalizada del cartílago. Las técnicas quirúrgicas normalizadas son procedimientos quirúrgicos que se emplean comúnmente para manipulaciones terapéuticas del cartílago, incluyendo: afeitado del cartílago, condroplastia por abrasión, reparación con laser, desbridamiento, condroplastia, microfractura con o sin penetración ósea subcondrial, mosaicoplastia, aloinjertos de células del cartílago, aloinjertos de citoblastos, injertos de cartílago costal, estimulación química, estimulación eléctrica, autoinjertos pericondriales, autoinjertos periosteales, manguitos periosteales, autoinjertos o aloinjertos de concha (osteoarticulares), o osteotomía. Estas técnicas se describen y

discuten en mayor detalle en Frenkel y col., Front. Bioscience 4: d671-685 (1999).

[0127] En una realización preferida, los polipéptidos WISP se usan en combinación con cirugía de microfractura. Se conocen en la materia las técnicas de cirugía de microfractura y generalmente conllevan taladrado quirúrgico en la cavidad de la médula ósea del mamífero. Se forman a continuación coágulos de fibrina, que rellenan el defecto en el cuerpo del mamífero. Posteriormente, se forma fibrocartílago.

[0128] Se contempla que se pueden emplear polipéptidos WISP para tratar células del cartílago o condriocitos *ex vivo*. Dicho tratamiento *ex vivo* puede ser útil en el trasplante y particularmente, el trasplante autólogo. Por ejemplo, el tratamiento de células o tejido(s) que contienen dichas células del cartílago o condriocitos con el polipéptido WISP, y opcionalmente, con una o más de otras terapias, tal como se ha descrito anteriormente, se puede emplear para regenerar el tejido del cartílago de inducir la diferenciación de las células condriocíticas precursoras antes del trasplante en un mamífero receptor.

[0129] Las células o tejido(s) que contienen células del cartílago o condriocitos se obtienen en primer lugar de un mamífero donante. Las células o tejido(s) se pueden obtener quirúrgicamente y de manera preferible, se obtienen asépticamente. Las células o tejido(s) se tratan a continuación con el polipéptido WISP, y opcionalmente, con una o más de otras terapias, tales como las descritas anteriormente.

[0130] Las células o tejido(s) tratados se pueden a continuación infundir o trasplantar en un mamífero receptor. El mamífero receptor puede ser el mismo individuo que el mamífero donante o puede ser otro mamífero heterólogo.

[0131] El progreso o la efectividad de las terapias descritas en la presente memoria descriptiva se pueden vigilar fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales conocidos por el médico especialista experto.

[0132] Se puede determinar la actividad o los efectos de los polipéptidos WISP descritos en la presente memoria descriptiva sobre el cartílago o los condriocitos sin experimentación innecesaria usando diversos ensayos *in vitro* o *in vivo*. Se describen a continuación, por medio de ejemplo, algunos de dichos ensayos.

[0133] En un ensayo, se puede probar el potencial sintético y profiláctico del polipéptido WISP sobre el cartílago intacto. A este fin, se midieron la síntesis y la rotura de proteoglicano (PG) y la liberación de óxido nítrico en explantes tratados de cartílago articular. Los proteoglicanos son el segundo componente más grande del material orgánico en el cartílago articular (Kuettner, K.E. y col., Articular Cartilage Biochemistry, Raven Press, Nueva York, USA (1986), p.456; Muir, H., Biochem. Soc. Tran. 11: 613-622 (1983); Hardingham, T.E., Biochem. Soc. Trans. 9: 489-497 (1981). Ya que los proteoglicanos ayudan a determinar las propiedades físicas y químicas del cartílago, la disminución de los PG del cartílago que se produce durante la degeneración de la articulación conduce a la pérdida de la rigidez y elasticidad compresivas, un aumento en la permeabilidad hidráulica, un aumento en el contenido de agua (hinchamiento), y cambios en la organización de otros componentes extracelulares tales como colágenos. De esta manera, la pérdida de PG es una etapa temprana en la progresión de los trastornos cartilaginosos degenerativos uno de los cuales perturba adicionalmente la estabilidad biomecánica y bioquímica de la articulación. Mow, V.C., & Ratcliffe, A. Biomaterials 13: 67-97 (1992). La rotura del proteoglicano, que se encuentra aumentado en las articulaciones enfermas, se puede medir cuantificando los OG liberados en los medios por los explantes de cartílago articular usando el ensayo DMMB colorimétrico. Farndale y Buttle, Biochem. Biophys. Acta 883: 173-177 (1985). Se utiliza la incorporación de ³⁵S-sulfato en los proteoglicanos para medir la síntesis de proteoglicano.

[0134] La evidencia que relaciona la interleucina-1 alfa, IL-1 beta, y las enfermedades cartilaginosas degenerativas es sustancial. Por ejemplo, se han encontrado elevados niveles de IL-1 alfa (Pelletier JP y col., "Cytokines and inflammation in cartilage degradation" en Osteoarthritic Edition of Rheumatic Disease Clinics of North America, Eds. RW Moskowitz, Filadelfia, W.D. Saunders Company, 1993, p. 545-568) y receptores de IL-1 (Martel-Pelletier y col., Arthritis Rheum. 35: 530-540 (1992) en las articulaciones enfermas, e IL-1 alfa induce la rotura de la matriz del cartílago e inhibe la síntesis de nuevas moléculas de la matriz. Baragi y col., J. Clin. Invest. 96: 2454-60 (1995); Baragi y col., Osteoarthritis Cartilage 5: 275-82 (1997); Evans y col., J. Leukoc. Biol. 64: 55-61 (1998); Evans y col., J. Rheumatol. 24: 2061-63 (1997); Kang y col., Biochem. Soc. Trans. 25: 533-37 (1997); Kang y col., Osteoarthritis Cartilage 5: 139-43 (1997). Debido a la asociación de IL-1 alfa con la enfermedad, se puede evaluar también el polipéptido WISP en presencia de IL-1 alfa. La capacidad del polipéptido WISP no solo tiene efectos positivos sobre el cartílago, sino que también contrarrestar los efectos catabólicos de IL-1 alfa es una fuerte evidencia del efecto protector presentado por el polipéptido WISP. Además, dicha actividad sugiere que el polipéptido WISP podría inhibir la degradación que se produce en condiciones artríticas, debido a que los sucesos catabólicos iniciados por IL-1 alfa son también inducidos por muchas otras citocinas y ya que el antagonismo de la actividad de IL-1 alfa ha demostrado reducir la progresión de la osteoartritis. Arend, W.P. y col., Ann. Rev. Immunol. 16: 27-55 (1998).

[0135] Las citocinas catabólicas tales como IL-1 pueden inducir la producción de óxido nítrico (NO) en el cartílago. Palmer, RMJ y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 193: 398-405 (1993). Se ha implicado también al NO en la destrucción de la articulación que se produce en condiciones artríticas. Ashok y col., Curr. Opin. Rheum. 10: 263-268

(1998). A diferencia del cartílago normal (sin enfermedad o sin lesión), el cartílago osteoartítico produjo significativas cantidades de óxido nítrico *ex vivo*, incluso en ausencia de estímulos añadidos tales como interleucina-1 o lipopolisacárido (LPS). Los modelos animales *in vivo* sugieren que la inhibición de la producción de óxido nítrico reducen la progresión de la artritis. Pelletier, JP y col., *Arthritis Rheum.* 7: 1275-86 (1998); van de Loo y col., *Arthritis Rheum.* 41: 634-46 (1998); Stichtenoeth, D.O. y Frolich J.C., *Br. J. Rheumatol.* 37: 246-57 (1998). El óxido nítrico *in vitro* ejerce efectos perjudiciales sobre la función de los condriocitos, incluyendo la inhibición del colágeno y la síntesis de proteoglicano, la inhibición de la adhesión a la matriz extracelular, y la potenciación de la muerte celular (apoptosis). Se encuentran mayores concentraciones de nitrito en el fluido sinovial de pacientes osteoartíticos que en el fluido de pacientes artríticos reumatoides. Renoux y col., *Osteoarthritis Cartilage* 4: 175-179 (1996). Además, los modelos animales sugieren que la inhibición de la producción de óxido nítrico reduce la progresión de la artritis. Pelletier, J.P. y col., *Arthritis Rheum.* 7: 1275-86 (1998); van de Loo y col., *Arthritis Rheum.* 41: 634-46 (1998); Stichtenoeth, D.O. y Frolich, J.C., *Br. J. Rheumatol.* 37: 246-57 (1998). Debido a que el NO también tiene efectos sobre otras células, la presencia de NO en el interior de la unión articular aumentaría la vasodilatación y la permeabilidad, potenciar la liberación de la citocina por los leucocitos, y estimular la actividad angiogénica. Ya que NO juega igualmente un papel en los componentes erosivos e inflamatorios de las enfermedades de las articulaciones, un factor que disminuye con la producción de óxido nítrico podría igualmente ser beneficioso para el tratamiento de los trastornos cartilaginosos degenerativos.

[0136] El ensayo para medir la producción de óxido nítrico se basa en el principio de que 2,3-diaminonaftaleno (DAN) reacciona con nitrito en condiciones ácidas para formar 1-(H)-naftotriazol, un producto fluorescente. Ya que NO se metaboliza rápidamente en nitrito (NO_2^{-1}) u nitrato (NO_3^{-1}), la detección del nitrito es un medio de detectar (aunque subestimando) el NO real producido por el cartílago.

[0137] Se puede examinar también la capacidad de un polipéptido WISP de potenciar, promover y mantener la viabilidad de los condriocitos en cultivos en ausencia de suero u otros factores de crecimiento. Los condriocitos articulares se preparan en primer lugar mediante la eliminación de la matriz extracelular y se cultivan en una monocapa, que se piensa que se aproxima las últimas etapas de los trastornos del cartílago cuando se ha agotado la matriz. El ensayo es un ensayo colorimétrico que mide la actividad metabólica de las células cultivadas basándose en la capacidad de las células viables de escindir la sal MTT de tetrazolio de color amarillo para formar cristales de formazán de color púrpura. Esta reacción de reducción celular implica los cofactores de nucleótidos de piridina NADH y NADPH. Berridge, M.V. & Tan, A.S., *Arch. Biochem. Biophys.* 303: 474 (1993). El producto solubilizado se cuantifica espectrofotométricamente en un lector ELISA.

[0138] Otro ensayo más examina los efectos de los polipéptidos WISP sobre la síntesis de proteoglicano en rótulas (rodillas) de ratones. Este ensayo usa cartílago intacto (incluyendo el hueso subyacente) y de esta manera prueba factores en condiciones que se aproximan al entorno *in vivo* del cartílago. Los compuestos se añaden bien a las rodillas *in vitro*, o se inyectan en las articulaciones de la rodilla *in vivo* antes del análisis de la síntesis del proteoglicano en las rótulas *ex vivo*. Como se ha demostrado anteriormente, las rótulas tratadas *in vivo* muestran distintos cambios en la síntesis de PG *ex vivo* (Van den Berg y col., *Rheum. Int.* 1: 165-9 (1982); Vershure, P.J. y col., *Ann. Heum. Dis.* 53: 455-460 (1994); y Van de Loo y col., *Arthrit. Rheum.* 38: 164-172 (1995). En este modelo, se puede usar la articulación contralateral de cada animal como control.

[0139] Se puede emplear un modelo de cobaya para medir los efectos de los polipéptidos WISP sobre la estimulación de la síntesis de PG y la inhibición de la liberación de PG en explantes de cartílagos articulares de un linaje de cobayas, Dunkin Hartley (DH), que desarrolla espontáneamente la osteoartritis en rodilla (OA). La mayor parte de otros modelos animales que producen que producen una rotura de la articulación progresivamente rápida se asemejan a la OA secundaria más que a la OA primaria que evoluciona lentamente. En contraste, las cobayas DH tienen cambios del tipo de la OA no inflamatoria progresivos que se producen lentamente de manera natural. Debido a que el modelo muy reproducible de rotura del cartílago en estas cobayas es similar al que se observa en el trastorno humano, la cobaya DH es un modelo animal bien aceptado de la osteoartritis. Young y col., "Osteoarthritis", *Spontaneous animal models of human disease* vol. 2, pp. 257-261, Acad. Press, Nueva York. (1979); Bendele y col., *Arthritis Rheum.* 34: 1180-1184; Bendele y col., *Arthritis Rheum.* 31: 561-565 (1988); Jimenez y col., *Laboratory Animal Sciences* 47 (6): 598-601 (1997); Wei y col., *Acta Orthop Scand* 69: 351-357 (1998)). Inicialmente, estos animales desarrollan una OA leve que es detectable por la presencia de cambios histológicos mínimos. Sin embargo, la enfermedad progresa, y en 16-18 meses de edad, se observa una degeneración del cartílago de moderada a grave. Como resultado, el efecto del polipéptido WISP sobre la matriz del cartílago de las cobayas DH durante la progresión de la enfermedad sería indicativo del efecto terapéutico del compuesto en el tratamiento de la OA en las diferentes etapas de destrucción de la articulación.

[0140] Los cambios metabólicos asociados con la diabetes mellitus (diabetes) pueden afectar a otros sistemas orgánicos y musculoesqueléticos del organismo afectado. Por ejemplo, en seres humanos, la incidencia de lesiones y trastornos musculoesqueléticos aumenta con el inicio de la diabetes, y la diabetes se considera un factor de riesgo para el desarrollo de la artritis.

[0141] Se puede inducir un síndrome similar a la diabetes en animales mediante la administración de Estreptozotocina (STZ). Portha B. y col., *Diabete Metab.* 15: 61-75 (1989). Eliminando las células pancreáticas que producen insulina, STZ disminuye la cantidad de insulina en suero en los animales tratados. La diabetes inducida por STZ está asociada con la atrofia y el contenido deprimido de colágeno de los tejidos conectivos que incluyen la piel, el hueso y el cartílago. Craig, R.G. y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1402: 250-260 (1998). En este ensayo se incuban las rótulas de los ratones tratados con STZ en presencia del polipéptido WISP y se analiza la síntesis de la matriz resultante. La capacidad del polipéptido WISP de aumentar o restaurar el nivel de la síntesis de PG al de los controles sin tratar es indicadora del potencial terapéutico.

[0142] Igualmente, tal como se ha descrito en la presente memoria descriptiva, se proporcionan kits y artículos de fabricación que contienen materiales útiles para el diagnóstico o el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una instrucción. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente mantiene una composición que es eficaz para el diagnóstico o el tratamiento del trastorno cartilaginoso degenerativo, y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o vial de disolución intravenosa que tenga un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición será normalmente un polipéptido WISP. La composición puede comprender alguno o múltiples ingredientes para el tratamiento de la artritis osteoartrítica, la artritis reumatoide o cualquier otro trastorno cartilaginoso degenerativo. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Alternativamente, la composición puede contener cualquiera de los vehículos, excipientes y/o estabilizantes mencionados en la presente memoria descriptiva. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas, y prospectos con instrucciones de uso.

[0143] Se ofrecen los siguientes ejemplos únicamente con fines ilustrativos, y no se pretende que limiten de ninguna manera el alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

[0144] Los reactivos comercialmente disponibles referidos en los ejemplos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a no ser que se indicara otra cosa. La fuente de aquellas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la memoria descriptiva por los números de acceso de la ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA. A no ser que se señale otra cosa, la presente invención usa procedimientos normalizados de tecnología de ADN recombinante, tales como los descritos anteriormente en la presente memoria descriptiva y en los siguientes libros de texto: Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press N.Y., 1989; Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y., 1989; Innis y col., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., N.Y., 1990; Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988; Gait, M.J., *Oligonucleotide Synthesis*, IRL Press, Oxford, 1984; R.I. Freshney, *Animal Cell Culture*, 1987; Coligan y col., *Current Protocols in Immunology*, 1991.

Ejemplo 1

[0145] En los ensayos descritos a continuación, se emplearon los siguientes procedimientos y materiales:

Materiales: Condroitina sulfato A procedente de tráquea bovina, condroitina sulfato C de cartílago de tiburón, hialuronidasa (EC 3.2.1.45) de testículos de bovino y condroitinasa AC II (EC 4.2.2.5) de *Artherobacter aurens* se adquirieron de Calbiochem (San Diego). Condroitina sulfato B, heparina y heparán sulfato de mucosa intestinal de porcino, decorina y biglicano de cartílago particular de bovino condroitinasa C, condroitinasa B y heparinasa I (EC 4.2.2.7) de *Flavobacterium hepanium* se obtuvieron de Sigma. Se adquirieron Condroitina sulfato D de cartílago de tiburón y condroitina sulfato E de cartílago de calamar de United States Biological (Swampscott, MA). Se adquirieron neuraminidasa (EC 3.2.2.18) de *Vibrio Cholera*, condroitinasa ABC (EC 4.2.2.4), proteasa libre de *Proteus vulgaris*, comprimidos completos del cóctel de inhibidores de la proteasa exento de EDTA y la fracción V del BSA ultraexento de ácidos grasos de Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN). Condroitin-4-sulfatasa (EC 3.1.6.9) y condroitin-6-sulfatasa (EC 3.1.6.10) de *Proteus vulgaris* eran de ICN Biomedicals (Aurora, OH). El fragmento Fc específico de cabra biotinilado y conjugado con peroxidasa de rábano picante dirigido contra la IgG humana y el anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG de oveja se adquirieron de Jackson ImmunoResearch (Costa Mesa, CA). La proteinasa K (EC 3.4.21.14) lista para el uso, el anticuerpo monoclonal dirigido contra vimentina y estreptavidina conjugada con rojo Texas (clon Vim 3B4) eran de Dako (Carpinteria, CA). Diacetato de 5-clorometilfluoresceína (5-CFDA) y Hoechst 33342 se adquirieron de Molecular Probes (Eugene, OR). El kit de amplificación indirecta Renaissance TSA era de serie de NEN Life Science Products (Boston, MA). Los medios de montaje Vectashield y el anticuerpo de caballo dirigido contra la IgG de ratón se obtuvieron de Vector (Burlingame, CA).

[0146] WISP-1 de murino de longitud completa (Pennica y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 95: 14717-14722 (1998); documento WO 99/21998) se clonó en un vector de expresión que codificaba la región Fc de la IgG1 humana en la dirección 3' de la secuencia del WISP tal como se ha descrito anteriormente para TNFR1 (Ashkenazi y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 10535-10539 (1991)). Se sintetizó la proteína de fusión recombinante resultante (WISP-1-Fc) en un sistema de expresión de baculovirus usando células Sf9 de insectos y se purificó hasta homogeneidad a partir de medio acondicionado exento de suero mediante cromatografía de afinidad en una columna Fast Flow de Sefarosa A (Pharmacia Biotech, Suecia). Se eliminaron mediante lavado las proteínas no adsorbidas con tampón fosfato de sodio 50 mM que contenía NaCl 1M. Se eluyó WISP-1-Fc con glicina 100 mM pH 2,5 y se neutralizó el pH con 0,1 volúmenes de Tris-HCl 3M pH 8. Tras la diálisis (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, 150 mM) se concentró la proteína purificada mediante ultrafiltración usando Centriprep-30 (Millipore Corp., Bedford, MA) y la pureza estimada mediante SDS-PAGE y tinción de plata. Los experimentos se repitieron al menos tres veces con tres lotes diferentes de proteína expresada y purificada en diferentes momentos y se obtuvieron resultados similares.

[0147] *Cultivo celular:* se obtuvieron células NRK (fibroblastos de riñón de rata normal), Hs 597.Sk (fibroblastos de piel normal humana), Hs 839.T (fibroblastos de melanoma de piel humano), Hs 908.Sk (fibroblastos de melanoma de piel humano), COLO 320DM (células de adenocarcinoma de colon humano), RAG (células de adenocarcinoma renal de ratón), 293 (células epiteliales de riñón humano), HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana), y WM-266-4 (células epiteliales de melanoma de piel humano) de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Se mantuvieron las células en Medio Eagles modificado por Dulbecco Bajo en Glucosa (Ham F-12 (1:1) suplementado con FBS al 10 % a 37 °C en CO₂ al 5 %.

[0148] *Unión celular:* Se plaquearon las células en placas de plástico de 8 pocillos y se mantuvieron durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Al día siguiente se lavaron las células con PBS y se bloquearon los pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente con BSA al 3 % en tampón HBS-C (Hepes 25 mM, pH 7,2, 150 NaCl, CaCl₂ 3 mM, MgSO₄ 3 mM, KCl 5 mM, cóctel completo de inhibidores de la proteasa) Cuando se indicó, se lavaron las células y se incubaron 2 horas a 37 °C con 0,1 U de diferentes liasas antes del bloqueo. (véase, Vacherot y col., J. Biol. Chem., 274: 7741-7747 (1999)). Se incubaron las células con mWISP-1-IgG 1 nM durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron y se incubaron con 0,2 µg/ml de Fc' biotinilado dirigido contra IgG humana en HBS-C/BSA al 3 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se amplificó la señal usando el kit indirecto TSA (NEN Dupont) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 30 minutos de incubación con estreptavidina conjugada con FITC 1:200 (DAKO), se montaron los portas usando Vectashield que contenía 1 µg/ml de Hoescht 33342 (Molecular Probes) y se visualizaron con un microscopio fluorescente Eclipse 800 de Nikon. Se adquirieron las imágenes usando una Cámara Refrigerada Photometrics 300 CCD. La medida de la intensidad de la fluorescencia de las células fue tal como se ha descrito anteriormente con modificaciones (Szurdoki y col., Anal. Biochem., 291: 219-228 (2001)). De manera breve, se adquirieron las imágenes de un mínimo de tres campos separados que contenían un promedio de 90 células y se almacenaron como archivos electrónicos. Se definió el umbral como la intensidad más baja del 1 % de los píxeles más brillantes en un control negativo ejecutado sin WISP-1-Fc. La señal de la fluorescencia para una población celular se definió como la intensidad del píxel sobre el umbral dividido por el número de células.

[0149] *Ensayo de unión en fase sólida:* Se diluyeron las proteínas en 50 µl (volumen total) de PBS, se aplicaron a pocillos de microvaloración de poliestireno y se incubaron a 4 °C durante la noche. Al día siguiente se lavaron los pocillos tres veces con 300 µl de HBS-c que contenía BSA al 0,3 % y los sitios de unión no específica se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 200 µl de HBS-C/BSA al 3 %. Se aspiró el tampón y se incubaron 50 µl de WISP-1-IgG 0,5 nM en HBS-C/BSA al 3 % durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos y se incubaron durante 1 hora con 50 µl de Fc' de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con 2 µg/ml de peroxidasa de rábano picante en HBS-C/3 %. Al final de la incubación, se lavaron los pocillos 6 veces con 200 µl de PBS que contenía Tween-20 al 0,05 % y se visualizó la señal usando 100 µl de sustrato TMB cromógeno de peroxidasa de rábano picante (KPL). Se detuvo la reacción con 100 µl de ácido fosfórico 1M y se midió la DO a 450 nm. Se determinó la unión no específica de WISP-1-Fc en incubaciones paralelas omitiendo el revestimiento del pocillo de microvaloración. No se generó señal cuando se omitió WISP-1-Fc.

[0150] *Purificación de los factores de unión de WISP-1:* Se sometieron a ciclado fibroblastos de piel humana entre medios de cultivo que contenían suero y exentos de suero cada 3 días. Los medios acondicionados exentos de suero se concentraron en un concentrador Centriprep-30 (Millipore, Bedford, MA). A continuación se cambió el tampón secuencialmente añadiendo Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 300 mM y se volvió a concentrar. El concentrado (150 pg proteína/ml) se congeló instantáneamente y se almacenó a -80 °C hasta que se usó. A continuación se descongelaron los medios acondicionados concentrados, se filtraron y se aplicaron en una columna de intercambio aniónico Mono Q equilibrada en Tris-HCl 20 mM pH 7,4 que contenía NaCl 300 mM. La columna se lavó y las proteínas adsorbidas se eluyeron usando un gradiente lineal de NaCl (300 mM – 2 M) en el mismo tampón. Se analizaron las fracciones de 500 µl para la actividad de la unión de WISP-1.

[0151] *Identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas:* Se combinaron las fracciones que contenían la actividad de unión de WISP-1, se desnaturalizaron, se redujeron y se aplicaron en un SDS-PAGE de

acrilamida con un gradiente de 4-15 % con o sin una incubación previa durante 2 horas a 37 °C con 0,1 U de condroitinasa ABC. Los geles se tiñeron con plata y las bandas de proteínas que demostraban un cambio de movilidad tras la digestión de la condroitinasa ABC se escindieron y se digirieron in situ con tripsina tal como se ha descrito anteriormente por Arnott y col., *Electrophoresis*, 19: 968-980 (1998). Se extrajeron los péptidos tripticos y se analizaron mediante cromatografía líquida en fase inversa microcapilar-espectrometría de masas. Las mezclas peptídicas se introdujeron en columnas capilares de sílice fusionada de 10 cm de longitud, 100 µm i.d., empaquetadas con perlas C18 de 5 µm (238MSB5; Vydac, Hesperia, CA) y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo directamente en la fuente de ionización por microelectropulverización de un espectrómetro de masas con trampa iónica (LCQ; Thermoquest, San Jose, CA). Se obtuvo un caudal de 500 nl/min mediante un divisor precolumna de 25 µl/min administrado por el HPLC (Ultra PlusII; Microtech Scientific, Sunnyvale, CA; Arnott y col., más arriba). La adquisición automatizada dependiente de los datos de los espectros de masas proporcionó la masa molecular (MS) y los datos de la secuencia (MS/MS) de los péptidos ya que se eluyeron de la columna. Se identificaron las proteínas mediante correlación de los datos de MS/MS con entradas en una base de datos no redundante de secuencias de proteínas usando el programa Sequest (Gatlin, C., Eng, J., Cross, S., Detter, J. y Yates III, *Analytical Chemistry*, 72: 757-763 (2000)). Se confirmaron las correspondencias de las proteínas mediante la interpretación manual de los espectros.

[0152] Inmunofluorescencia: Secciones de tumor de colon humano montadas en portas se llevaron a temperatura ambiente, se fijaron con etanol al 70 % durante 10 minutos y los sitios de unión no específica se saturaron con PBS/BSA al 3 % que contenía suero normal al 1,5 % durante 20 minutos. Se incubaron las secciones durante 1 hora con 0,125 microgramos/ml de anticuerpo dirigido contra vimentina, se lavaron con PBS y se incubaron adicionalmente durante 30 minutos con 2 microgramos/ml de anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG de ratón. Se amplificó la señal usando el kit indirecto TSA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de una incubación de 30 minutos con estreptavidina conjugado con rojo Texas 1:1000, se montaron los portas usando Vectashield que contenía 1 microgramo/ml de Hoechst 33342 y se visualizaron con un microscopio fluorescente Eclipse 800 de Nikon. Se adquirieron las imágenes usando una cámara refrigerada Photometrics 300 CCD. El control negativo ejecutado en ausencia del anticuerpo primario no reveló ninguna tinción fluorescente.

[0153] Se ejecutó la detección inmunofluorescente de la decorina en fibroblastos de piel humana usando un protocolo similar. Se plaquearon 8×10^3 células en placas y se cultivaron durante la noche. Al día siguiente se lavaron las células y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos con medio reciente que contenía 5 microgramos/ml de 5-CFDA. Tras el lavado, los sitios de unión no específica se saturaron con HBS-C/BSA al 3 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se incubaron las células durante 1 hora a temperatura ambiente con 1:4000 de anticuerpo de oveja dirigido contra decorina humana en HBS-C/BSA al 0,1 %. Se lavaron las células, se fijaron con paraformaldehído/PBS al 4 % durante 10 minutos, se lavaron y se incubaron adicionalmente durante 30 minutos con 2 microgramos/ml de anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG de oveja. Se amplificó la señal usando el kit indirecto TSA. Después de una incubación de 30 minutos con 1:1000 de estreptavidina conjugada con rojo Texas, se montaron los portas usando Vectashield que contenía 1 microgramo/ml de Hoechst 33342 y se visualizaron en un microscopio fluorescente Eclipse 800 de Nikon. Se adquirieron las imágenes usando una Cámara Refrigerada Photometrics 300 CCD. El control negativo ejecutado en ausencia de anticuerpo primario no revela ninguna tinción fluorescente.

[0154] Procedimientos analíticos: Se llevó a cabo la SDS-PAGE de acuerdo con Laemli, *Nature*, 227: 680-685 (1970) usando un aparato de electroforesis en gel en lámina vertical Mini-PROTEAN II de Bio-Rad. Se determinó la masa molecular aparente usando los patrones de peso molecular de amplio intervalo de Bio-Rad. Se determinó la proteína usando el reactivo colorante de la tinción de plata del ensayo de proteínas de Bio-Rad y un patrón de albúmina de suero bovino.

A. Unión de WISP-1 a diversas líneas celulares y secciones de tumor de colon humano

[0155] Se analizó la unión de un WISP-1 de ratón recombinante quimérico que soporta una etiqueta del fragmento Fc de la inmunoglobulina humana a diversas células en cultivo. Se sembraron las células en placas y se cultivaron durante la noche. Al siguiente día, los sitios de unión no específica se bloquearon y se incubaron las células con mWISP-1-IgG o sin mWISP-1-IgG 1 nM durante 1 hora. Se lavaron las células, se fijaron y se detectó la unión de WISP-1-IgG mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG humana y el procedimiento indirecto de amplificación del sustrato con tiramida seguido con estreptavidina conjugada con FITC.

[0156] Tal como se resume en la Figura 1, la unión de WISP-1 se observaría únicamente en la superficie de las líneas celulares fibroblásticas de rata o de origen humano tanto si fueran normales como si procedieran de melanoma de piel. Por otra parte, no se detectaría la señal fluorescente cuando se usaran células de adenocarcinoma renal de ratón, adenocarcinoma de colon humano, células epiteliales de riñón humano, células endoteliales de la vena umbilical humana, o células epiteliales de melanoma de piel humana. Como ejemplo, se ilustra la unión de WISP-1 a células RAG (figura 1B). No se detectaría la señal cuando se omitiera la adición de WISP-1 o cuando se usara un anticuerpo secundario biotinilado no relacionado (figura 1C).

[0157] Se evaluó la unión de WISP-1 a secciones de tumor de colon humano usando procedimientos in situ de unión de ligandos. Las secciones de tumor de colon humano montadas sobre portas se llevaron a temperatura ambiente y se incubaron inmediatamente durante 4 minutos en ácido acético 35 mM (pH 3,5) que contenía CaCl_2 3 mM, MgSO_4 3 mM, KCl 5 mM y NaCl 1 M. A continuación, los portas se lavaron en HBS-C (Hepes 25 mM, pH 7,2, 150 NaCl, CaCl_2 3 mM, MgSO_4 3 mM, KCl 5 mM, cóctel completo inhibidor de la proteasa) que contenía sacarosa 32 mM y los sitios de unión no específica se bloquearon durante 20 minutos en HBS-C que contenía BSA al 3 %, suero de cabra normal al 1,5 % y sacarosa 32 mM. Los sitios de unión que eran avidina y biotina se bloquearon usando el kit bloqueante de avidina/biotina de Vector (Burlingame, CA). Se incubaron los portas durante 1 hora en HBS-C/BSA al 3 % y WISP-1-Fc 1 nM, se lavaron tres veces durante 1 minuto cada vez con HBS-C/BSA al 1 % frío (4 °C) y se fijaron durante 10 minutos en PBS/paraformaldehído al 4 %. Los portas se incubaron con 0,2 microgramos/ml de Fc biotinilado específico de cabra dirigido contra IgG humana en HBS-C/BSA al 3 % durante 30 minutos, se lavaron y fijaron en PBS/paraformaldehído al 4 % durante 10 minutos. Se amplificó la señal usando el kit de amplificación indirecta TSA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se detuvo la reacción mediante tres lavados de 4 minutos en TBS/BSA al 0,1 %. Se incubaron los portas durante 30 minutos con FITC conjugado con estreptavidina (1:1000) en TBS/BSA al 0,1 % y se lavaron en TBS que contenía Tween-20 al 0,05 %. Se montaron las secciones usando el medio de montaje Vectashield que contenía 1 microgramo/ml de Hoechst 33342 y se visualizaron en un microscopio fluorescente Eclipse B00 de Nikon.

[0158] Aunque la tinción de vimentina reveló la presencia de células del mesénquima en el tumor y la mucosa normal (véanse las figuras 1F y 1G), la unión de WISP-1 in situ se restringió en el estroma peritumoral (figura 1D). No se encontró unión a las células epiteliales tumorales o a la mucosa normal (figura 1D y 1E).

B. WISP-1 se une a medios acondicionados con fibroblastos de piel humana

[0159] Para examinar si un factor de unión a WISP-1 se secretó o se desprendió desde la superficie de los fibroblastos de piel humana, se llevó a cabo un ensayo de unión en fase sólida. Se recogieron los medios acondicionados exentos de suero procedentes de fibroblastos de piel humana (preparados como se ha descrito anteriormente), se concentraron y se revistieron en placas de microvaloración durante la noche. Se revistieron cincuenta microlitros de medios acondicionados por duplicado en pocillos de microvaloración. Los sitios de unión no específica se saturaron mediante incubación con HBS-C que contenía BSA al 3 % y los pocillos se incubaron durante 2 horas con mWISP-1-IgG. Tras el bloqueo de los sitios de unión no específica, los pocillos se incubaron en primer lugar con WISP-1 y a continuación con anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante dirigido contra IgG humana. Los pocillos se lavaron y se incubaron durante 1 hora con Fc' conjugado con peroxidasa de rábano picante dirigido contra IgG humana. Después de 6 lavados con HBS-C que contenía BSA al 0,3 %, se visualizó la señal usando sustrato cromógeno de peroxidasa de rábano picante. Se detuvo la reacción con ácido fosfórico 1 M y se midió la DO a 450 nm. La Fig. 2A muestra la unión de diluciones en serie de mWISP-1-IgG a los pocillos revestidos con 0,5 μl de medios acondicionados con fibroblastos de piel humana. La unión fue proporcional a la cantidad de medios revestidos y a la concentración del WISP-1 añadido, indicando que los fibroblastos de piel humana producen factores solubles de unión a WISP-1.

[0160] Tal como se observa en la Figura 3A, la interacción entre WISP-1 y los medios acondicionados se eliminó en presencia de NaCl 1 M. La presencia de EDTA 100 mM disminuyó solo parcialmente la unión mientras que la presencia de Tween-20 al 0,05 % no tuvo efecto. Se concluyó que la unión de WISP-1 al material revestido fue independiente del catión y tuvo un componente iónico. A continuación se investigó la posibilidad de que el factor de unión fuera un proteoglicano tratando los pocillos revestidos con diversas liasas antes de evaluarse la unión de WISP-1. El tratamiento del material revestido con condroitinasa C, condroitin-6-sulfatasa, heparinasa o neuraminidasa no altera la unión de WISP-1 cuando se compara con el control (Fig. 3B). Sin embargo, la digestión con condroitinasa AC II o hialuronidasa disminuyó parcialmente la unión. En último extremo, el tratamiento con condroitinasa ABC, condroitinasa B, condroitin-4-sulfatasa o proteinasa K eliminó la unión de WISP-1 a los pocillos revestidos. La especificidad de la condroitinasa B y la condroitin-4-sulfatasa indica que los componentes del dermatán sulfato son esenciales para la unión de WISP-1. Además, la sensibilidad de la interacción a una proteinasa K indica que el factor de unión tiene un componente proteínico. Los resultados sugieren que WISP-1 se une al dermatán sulfato secretado que contiene proteoglicano.

[0161] Los tratamientos con condroitinasa ABC y condroitinasa B eliminaron completamente la unión, mientras que el tratamiento con condroitinasa C no tuvo efecto. La condroitinasa B escinde el dermatán sulfato en la unión del ácido beta - D - galactosamina - L - idurónico. La especificidad de esta enzima demuestra la necesidad de ácido idurónico para la unión de WISP-1. Los tratamientos con condroitinasa AC II o hialuronidasa redujeron solo parcialmente la unión. Esto indicaría que la cadena de glicosaminoglicano responsable de la interacción de WISP-1 consistió de un copolímero de dermatán sulfato, condroitina sulfato. Escindiendo los enlaces galactosamínicos susceptibles, aquellas enzimas habrían eliminado partes de la cadena de glicosaminoglicano que contenía los restos de ácido idurónico. El tratamiento con condroitin-4-sulfatasa eliminó completamente la unión mientras que la condroitin-6-sulfatasa no altera la interacción. Esto indica la necesidad de un grupo sulfato en la posición 4 de la N-acetilgalactosamina para la interacción. El tratamiento con heparinasa no tuvo efecto, indicando que la unión no

requiere el ácido idurónico para sulfatarse en la posición 2. El tratamiento con proteinasa K eliminó la unión sugiriendo que el glicosaminoglicano responsable de la interacción está unido a un núcleo de proteína que podría desprenderse de los pocillos mediante degradación proteolítica. En su conjunto, estos resultados apoyan la conclusión de que un motivo que contiene ácido idurónico de la cadena de glicosaminoglicano de un proteoglicano media en la unión de WISP-1 a medios acondicionados con fibroblastos de piel humana.

C. Purificación e identificación del factor de unión a WISP-1

[0162] Para purificar el factor responsable de la unión d WISP-1, se recogieron medios acondicionados exentos de suero de fibroblastos de piel humana después de tres días de cultivo, se concentraron, se transfirieron a un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM pH 7,4 y se aplicó NaCl 300 mM en una columna de cromatografía de intercambio aniónico de Q-Sefarosa. Se lavó la columna y las proteínas retenidas se desorbieron con una concentración creciente de NaCl. Se analizó la presencia de un factor de unión a WISP-1 en cada fracción usando un ensayo de unión en fase sólida, y los resultados se muestran en la Figura 4A. Además, la fracción 15 (indicada por una * en la Figura 4A) se incubó a 37 °C durante 2 horas en presencia (+) o ausencia (-) de 0,1 U de condroitinasa ABC. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y los geles se tiñeron con plata. Se identificaron las bandas indicadas mediante espectrometría de masas (Figura 4B).

[0163] Las bandas encontradas a 46, 60, y 70 kDa correspondían a la decorina mientras que la banda a 44 kDa se identificó como biglicano (la banda a 230 kDa pareció ser una mezcla de decorina y biglicano). Las bandas encontradas a los diferentes pesos moleculares correspondían probablemente a biglicano y decorina que contenían cadenas de glicosaminoglicano incompletamente digeridas que se generaron durante el tratamiento con condroitinasa ABC. Los resultados demuestran que WISP-1 se une a los dos dermatán sulfatos que contienen los proteoglicanos, biglicano y decorina.

D. WISP-1 se une a decorina y biglicano

[0164] Para demostrar la interacción directa de WISP-1 con decorina y biglicano, se llevó a cabo un ensayo de unión en fase sólida. La decorina y el biglicano se revistieron en pocillos de microvaloración durante la noche. Los sitios de unión no específica se saturaron y se incubó mWISP-1-IgG 0,25 nM durante 2 horas. Los pocillos se lavaron e incubaron con Rc' conjugado con peroxidasa de rábano picante dirigido contra IgG humana (2 µg/ml) durante 1 hora. Después de 6 lavados con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %, se desarrolló una señal mediante la incubación de un sustrato cromógeno. Se detuvo el desarrollo del color mediante la adición de ácido fosfórico 1 M y se midió la D.O. a 450 nm.

[0165] Tal como se ilustra en la Figura 5A, las curvas que corresponden a la unión de WISP-1 a la decorina y el biglicano son muy similares y son proporcionales a la cantidad de proteína revestida. De manera similar, se evaluó la capacidad de la decorina y el biglicano de inhibir la unión de WISP-1 a medios acondicionados revestidos con fibroblastos de piel humana.

[0166] Se revistieron cincuenta microlitros de medios acondicionados con fibroblastos de piel humana en pocillos de placas de microvaloración. Se saturaron los sitios de unión no específica y se incubó WISP-1-IgG 0,25 nM en presencia de diversas concentraciones de decorina (círculos rellenos) o biglicano (círculos vacíos) (Figura 5B) durante 2 horas. Se evaluó la unión de mWISP-1-IgG tal como se ha descrito anteriormente. Tal como se observa en la Figura 5B, se disminuyó gradualmente la unión de WISP-1 a los medios acondicionados con fibroblastos de piel humana en presencia de concentraciones crecientes de decorina y biglicano. La decorina y el biglicano proporcionan similares curvas de competición que muestran una inhibición del 50 % de la unión de WISP-1 a 70 µg/ml para decorina y 105 µg/ml para biglicano.

E. WISP-1 se une a glicosaminoglicano

[0167] Para comprender si la especificidad de la interacción de WISP-1 con el proteoglicano está limitada a dermatán sulfato, se evaluó la unión de WISP-1 a los medios acondicionados con fibroblastos de piel humana en presencia de diversos proteoglicanos. Se prepararon medios acondicionados exentos de suero de fibroblastos de piel humana tal como se ha descrito anteriormente. Cincuenta µl de medios acondicionados se revistieron en pocillos de microplacas durante la noche a 4 °C, se saturaron los sitios de unión no específica y se incubaron los pocillos durante 2 horas a temperatura ambiente con WISP-1-IgG 0,5 nM en presencia de diversas concentraciones de diferentes glicosaminoglicanos. Se lavaron los pocillos, se desarrolló una señal usando un sustrato cromógeno y se midió la D.O. a 450 nm. La Figura 6 muestra: Condroitina sulfato A (círculos rellenos); dermatán sulfato (círculos vacíos); condroitina sulfato C (triángulos rellenos); condroitina sulfato D (triángulos vacíos), condroitina sulfato E (cuadrados rellenos); heparina (X); heparán sulfato (cuadrados vacíos).

[0168] Tal como se muestra en la Figura 6, la unión de WISP-1 se redujo proporcionalmente en presencia de concentraciones crecientes de diversos proteoglicanos. La unión de WISP-1 alcanzó un 50 % de la unión máxima a

3 µg/ml de dermatán sulfato, 10,5 µg/ml de condroitina sulfato D o heparina, 30 µg/ml de condroitina sulfato E, 75 µg/ml de heparán sulfato, 105 µg/ml de condroitina sulfato A. La presencia de condroitina sulfato C no reduce la unión de WISP-1. Estos datos demuestran que la interacción de WISP-1 con glicosaminoglicano es suficiente para mediar en su unión a los medios acondicionados con fibroblastos de piel humana. Además esto indica que WISP-1 muestra una mayor especificidad por dermatán sulfato que cualquier otro glicosaminoglicano ensayado.

F. La unión de WISP-1 a fibroblastos de piel humana está inhibida por dermatán sulfato

[0169] Para dilucidar la importancia del dermatán sulfato que contiene proteoglicanos en la unión de WISP-1 a la superficie celular, se llevó a cabo un análisis de unión celular en presencia de diversos glicosaminoglicanos. Se sembraron fibroblastos de piel humana en placas. Se saturaron los sitios de unión no específica y se incubó WISP-1-IgG 1 nM durante 1 hora a temperatura ambiente en ausencia (Fig. 7A) o presencia de 50 µg/ml de condroitina sulfato A (Fig. 7B), dermatán sulfato (Fig. 7C), condroitina sulfato C (Fig. 7D), condroitina sulfato D (Fig. 7E), condroitina sulfato E (Fig. 7F), heparina (Fig. 7G) o heparán sulfato (Fig. 7H). Se lavaron las células y se fijaron y se detectó la unión de WISP-1-IgG mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG humana y el procedimiento indirecto de amplificación del sustrato con tiramida finalizado con estreptavidina conjugada con FITC.

[0170] En ausencia de cualquier glicosaminoglicano añadido, la unión de WISP-1 a la superficie celular da lugar a una tinción fluorescente fuerte. Condroitina sulfato C y condroitina sulfato D redujeron la unión de WISP-1 en aproximadamente un 20 % y un 46 %, respectivamente, mientras que la condroitina sulfato A, la condroitina sulfato E, el sulfato de heparina o la heparina disminuyeron la interacción en aproximadamente 60-70 % (figura 7I). Por otra parte, en presencia de 50 µg/ml de dermatán sulfato, se eliminó la unión de WISP-1 a la superficie de los fibroblastos de piel humana. En conjunto, estos resultados demuestran que WISP-1 tiene una mayor afinidad por dermatán sulfato y esta interacción puede ser responsable de la unión de WISP-1 a la superficie celular.

G. La unión de WISP-1 a fibroblastos de piel humana se eliminó mediante la digestión de la superficie celular con condroitinasa B

[0171] Aunque WISP-1 interactúa con los glicosaminoglicanos y los pequeños proteoglicanos que contienen dermatán sulfato, debe determinarse aún si interactúa con la superficie celular mediante el mismo tipo de interacciones. Para resolver esta posibilidad, se analizó la unión de WISP-1 a la superficie de fibroblastos de piel humana tratados con diferentes glicosamino liasas. Se incubaron los fibroblastos de piel humana durante 2 horas a 37 °C en ausencia (Fig. 8A), o presencia de 0,1 U de condroitinasa ABC (Fig. 8B), condroitinasa B (Fig. 8C), condroitinasa C (Fig. 8D), heparinasa (Fig. 8E), o en ausencia de mWISP-1 (Fig. 8F). Se lavaron las células, se saturaron los sitios de unión no específica y se incubó mWISP-1-IgG 1 nM durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 lavados, se fijaron las células y se detectó la unión de mWISP-1-IgG mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG humana y el procedimiento indirecto de amplificación del sustrato con tiramida finalizado con estreptavidina conjugada con FITC.

[0172] Tal como se muestra en la Figura 8A, la unión de WISP-1 a la superficie de los fibroblastos de piel humana sin tratar da lugar a una fuerte señal fluorescente. Cuando se trataron las células con condroitinasa ABC o condroitinasa B, disminuyó la unión de WISP-1 a un nivel comparable al control negativo en el que se omitió WISP-1 (Figura 8B, C y D respectivamente). Por otra parte, la unión de WISP-1 a las células tratadas con condroitinasa C o heparinasa no muestra ninguna modificación en el término de la distribución o la intensidad (Figura 8, panel E y F respectivamente). Estos resultados indican que la unión de WISP-1 a la superficie celular de los fibroblastos de piel humana está mediada por el dermatán sulfato que contiene proteoglicano.

H. Decorina y biglicano bloquean la unión de WISP-1 a los fibroblastos de piel humana

[0173] Se evaluó la unión de WISP-1 a los fibroblastos de piel humana en presencia o ausencia de decorina o biglicano en exceso. Se sembraron fibroblastos de piel humana en placas y se saturaron los sitios de unión no específica. Se incubó mWISP-1-IgG uno nanomolar durante 1 hora a temperatura ambiente en presencia de 1 mg/ml de decorina (Fig. 9A), biglicano (Fig. 9B), o en ausencia de competidores añadidos (Fig. 9C). Se lavaron las células y se fijaron, y se detectó la unión de WISP-1-IgG mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG humana y el procedimiento indirecto de amplificación del sustrato con tiramida finalizado con estreptavidina conjugada con FITC.

[0174] Tal como se muestra en la Figura 9, la presencia de decorina o biglicano bloquearon parcialmente la interacción de WISP-1 con los fibroblastos de piel humana. Aunque la inhibición es significativa (aproximadamente 88 % y 94 %), incluso a la más alta concentración ensayada (1 mg/ml) la unión no se eliminaría completamente. Esto se puede explicar por la capacidad que tienen la decorina y el biglicano de interactuar con el colágeno presente en la matriz extracelular de la célula.

[0175] Decorina y biglicano son miembros de una familia de pequeños proteoglicanos ricos en leucina presentes en la matriz extracelular de los tejidos conectivo. La forma secretada de la decorina consiste en un núcleo de proteína de 36. 319 Da (Krusius y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 83: 7683-7687 (1986)) y una única cadena de glicosaminoglicano de dermatán sulfato unido a una serina en la posición 4 (Scott, PG, Dermatan Sulfate Proteoglycans: Chemistry, Biology, Chemical Pathology, Portoland Press, Londres, Inglaterra, 1993). La forma secretada del biglicano consiste en un núcleo de proteína de 37.983 Da sustituido con dos cadenas de glicosaminoglicanos, una de dermatán sulfato y una de condroitina sulfato (Fisher et al., J. Biol. Chem., 264: 4571-4576 (1989)). Los núcleos de proteínas del biglicano y la decorina comparten aproximadamente un 55 % de identidad de aminoácidos. El peso molecular del núcleo de proteína de la decorina y el biglicano corresponde al peso molecular previsto de las dos bandas anteriormente referidas que tienen la movilidad electroforética más rápida después del tratamiento con la condroitinasa ABC. Las bandas migrantes más lentas corresponderían a la decorina y al biglicano que soportan cadenas de glicosaminoglicanos parcialmente digeridas.

[0176] Decorina se localiza simultáneamente con las fibrillas de fibronectina en la superficie de los fibroblastos de piel humana (Schmidt, G., Robenek, H., Harrach, B., Glossl, J., Nolte, V., Hormann, H., Richter, H. y Kresse, H., J. Cell. Biol, 104: 1683-1691 (1987)). Es posible que la interacción de WISP-1 con la superficie celular esté mediada por la decorina unida a la matriz extracelular. Usando la inmunofluorescencia, se confirmó la presencia de decorina en la superficie de los fibroblastos de piel humana en los anteriores ensayos. También, se demostró que la decorina y el biglicano disminuyeron significativamente la unión de WISP-1 a la superficie celular. La interacción de decorina y el biglicano con los fibroblastos de piel humana evitó probablemente la completa inhibición de la unión de WISP-1. En conjunto, aquellos resultados demostraron que la decorina puede actuar como sitio de unión de WISP-1 a la superficie celular.

[0177] Algunos proteoglicanos asociados con la membrana celular o la matriz extracelular demostraron contener ácido idurónico. En consecuencia, es posible que WISP-1 interactúe con el proteoglicano condroitina sulfato de heparán sulfato que presenta motivos de iduronato. También, el contenido de ácido idurónico de la cadena de glicosaminoglicano de diferentes proteoglicanos demostró que variaba su distribución tisular. Por ejemplo, decorina y biglicano de la piel contienen aproximadamente 80 % de ácido idurónico mientras que en el cartílago contienen solo un 40 % (Choi y col., J. Biol. Chem., 264: 2876-2884 (1989)). Las cadenas de glicosaminoglicano de biglicano y decorina del hueso y el cartílago nasal de bovino no contienen iduronato y tienen por tanto condroitina sulfato (Fisher y col., J. Biol. Chem. 262: 9702-9708 (1987); Heinegard y col., Biochem. J., 3: 2042-2051 (1981)). También, se ha informado que el tratamiento con TGF- β induce un 10 a un 15 % la disminución del contenido de ácido idurónico de las cadenas secundarias de decorina y biglicano (Malmström, A y col., Dermatan Sulfate Proteoglycans: Chemistry, Biology, Chemical Pathology, Portoland Press, Londres, Inglaterra, 1993). En consecuencia, es posible que la modificación en el nivel de contenido de ácido idurónico en la cadena de glicosaminoglicano de los proteoglicanos module la interacción de WISP-1.

[0178] Se sabe que biglicano y decorina interactúan con una variedad de proteínas de matriz extracelulares, citocinas y receptores superficiales celulares (para una revisión, véanse Hocking y col., Matrix Biol., 17: 1-19 (1998) y Iozzo, R.V. J. Biol. Chem. 274: 18843-18846 (1999). Decorina y biglicano interactúan con el factor- β de transformación del crecimiento (TGF- β), regulando negativamente su actividad biológica (Hildebrand y col., Biochem. J., 302: 527-534 (1994)). También, decorina demostró disminuir los niveles de ARNm y la síntesis de la proteína TGF- β in vitro (Stander y col., Gene Therapy, 5: 1187-1194 (1998)). Por otra parte, la expresión de la decorina está generalmente regulada en defecto por TGF- β en diversas células y organismos (Iozzo, Ann. Rev. Biochem., 67: 609-652 (1998)). La región promotora del gen de la decorina contiene un elemento regulado TGF- β -negativo. Este elemento regulado TGF- β -negativo se ha encontrado en algunos genes de proteasas regulado en defecto por TGF- β y funcionaría suprimiendo la expresión del gen de la decorina (Iozzo, Experientia, 49:447-455 (1993)). Además, la expresión de decorina se correlaciona bien con una propiedad maligna en el carcinoma humano (Adany y col., J. Biol. Chem., 265: 11389-11396 (1990); Hunzlemann y col., J. Invest. Dermatol., 104: 509-513 (1995)). Se ha encontrado que está deprimida en muchos tejidos tumorales (Iozzo, más arriba, 1993) y pérdida en algunas líneas celulares tumorales (Iozzo y col., FASEB J., 10:598-614 (1996)). Sin embargo, la expresión de la decorina está aumentada en el estroma tumoral (Adany y col., más arriba, 1991; Iozzo, más arriba, 1993, Brown y col., Clin. Cancer Res., 5: 1041-1056 (1999)). Decorina sería un potente regulador negativo del TGF- β liberado por el tumor para facilitar la carcinogénesis y la progresión del tumor. Ya que la decorina demostró suprimir directamente el crecimiento de algunos carcinomas mediante mecanismos dependientes e independientes de TGF- β , se ha propuesto que su expresión en el estroma peritumoral refleje una respuesta regional de las células hospedadoras del tejido conectivo a las células neoplásicas invasoras (Ständer y col., más arriba, 1999).

Ejemplo 2

Adhesión de células CHO a WISP-1 y otras proteínas ECM

[0179] Las siguientes líneas de células CHO (identificadas por el número de la ATCC) se mantuvieron en Ham-F12/LGDMEM (50:50) que contenía FBS al 10 %:

CHO-K1	(CCL-61)
CHO pgs A-745	(CRL-2242; NO sintetiza proteoglicano)
CHO pgs B-618	(CRL-2241; NO sintetiza proteoglicano)
CHO pgs D-677	(CRL-2244; NO sintetiza heparán sulfato)
5 CHO pgs E-606	(CRL-2246; Sintetiza un heparán sulfato pobre en sulfato)

Se revistieron placas Maxisorp con 50 µl de mWISP-1-IgG (5 µg/ml) o BSA al 3 % (Fracción V, ultraexenta de ácidos grasos; Boehringer Mannheim) en disolución en PBS a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, se aspiraron los contenidos de los pocillos y se bloquearon los pocillos con 200 µl de PBS/BSA al 3 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Se capturaron las células en PBS que contenía EDTA 2 mM y los aglomerados se desmenuzaron usando una pipeta y a continuación se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se lavaron las células dos veces con Ham-F12/LGDMEM exento de suero (50:50) que contenía BSA al 1 %.

[0180] Se volvieron a suspender las células a 25×10^5 células/ml en Ham-F12/LGDMEM exento de suero (50:50) que contenía BSA al 1 %. Se añadieron 50 µl de Ham-F12/LGDMEM (50:50) exento de suero/BSA al 1 % a cada pocillo seguido por 50 µl de suspensión celular. Se incubaron las placas 2 horas a 37 °C sin cubierta. Posteriormente, se lavaron los pocillos 3X con PBS y una vez que el sobrenadante estuvo completamente retirado, se almacenaron las placas a -70 °C.

[0181] Se descongelaron las placas y se añadió Molecular Probes CyQUANT (Molecular Probes). Se midió la fluorescencia a 480 nm – 520 nm.

[0182] En la Figura 10 se muestran los resultados.

[0183] Se usaron líneas mutantes de células CHO afectadas en su síntesis de glicosaminoglicano para verificar el papel del proteoglicano en la adhesión celular a WISP-1. Tal como se muestra en la figura 10, no se encontró que ninguna de las líneas de células CHO completamente deficientes para la síntesis de glicosaminoglicano (CHO pgs A and CHO pgs B) se adhiriera a WISP-1. Este resultado indica que la adhesión de células CHO a WISP-1 es totalmente dependiente de las cadenas secundarias de glicosaminoglicano del proteoglicano. Por otra parte, las líneas de células CHO que carecen de heparán sulfato (CHO pgs D) o que sintetizan un heparán sulfato pobre en sulfato mostraron una reducción del 40 % en la adhesión a WISP-1 en comparación con CHO-K1 que sintetiza un proteoglicano normal. Esto demuestra que el proteoglicano heparán sulfato de las células CHO es responsable solo en parte de la adhesión celular a WISP-1 y que esta sulfatación es necesaria para su actividad. En consecuencia, el proteoglicano dermatán sulfato que es la fracción restante del proteoglicano de CHO pgs D y CHO pgs E debe ser responsable de la mayor parte de la adhesión de las células CHO a WISP-1.

Ejemplo 3

Adhesión de los fibroblastos de piel humana a WISP-1 y otras proteínas ECM

[0184] Se mantuvieron fibroblastos de piel humana (ATCC; CRL 7356) en Ham-F12/LGDMEM (50:50) que contenía FBS al 10 %. Se revistieron placas Maxisorp con 50 µl de las proteínas (identificadas a continuación) en disolución en PBS a 4 °C durante la noche:

Colágeno I, Humano (2 µg/ml)	(Humano; BioDesign)
Colágeno II, Humano (2 µg/ml)	(Humano; BioDesign)
mWISP-1-IgG (2 µg/ml)	(véase el Ejemplo 1 anterior)
BSA al 3 %	(Fracción V, ultraexenta de ácidos grasos; Boehringer Mannheim)

Al día siguiente, se aspiró el contenido de los pocillos y se saturaron los pocillos con 200 µl de PBS/BSA al 3 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Se capturaron las células en PBS que contenía EDTA 15 mM, y los aglomerados se desmenuzaron usando una pipeta. Se filtró la suspensión celular sobre un filtro de 45 µm y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos.

[0185] Se retiró el sobrenadante y se lavaron las células dos veces con Ham-F12/LGDMEM exento de suero (50:50) que contenía BSA al 1 %. Se volvieron a suspender las células a 3×10^5 células/ml con Ham-F12/LGDMEM exento de suero (50:50) que contenía BSA al 1 %. A continuación se añadieron 50 µl de Ham-F12/LGDMEM exento de suero (50:50)/BSA al 1 %, junto con 100 µg/ml de Dermátán sulfato (condroitina sulfato B de mucosa intestinal de porcino; Sigma); 100 µg/ml de heparina (mucosa intestinal de porcino, Sigma) o sin adición. Se incubaron las placas durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 50 µl de suspensión celular a cada pocillo y se incubaron 2 horas a 37 °C sin cubiertas. Posteriormente, se lavaron los pocillos 3X con PBS. Se llevó a cabo la tinción con violeta cristal durante 30 minutos. A continuación se lavaron las placas en agua. Se midió la D.O. a 570 nm.

[0186] En la Figura 11 se muestran los resultados.

[0187] Los datos sugieren que aunque el valor es inferior que el de los controles positivos (adhesión a colágeno I y a colágeno II) los fibroblastos de piel humana se adhieren a los pocillos revestidos con WISP-1 (Figura 11). La presencia de 100 µg/ml de heparina o 100 µg/ml de dermatán sulfato redujo la adhesión celular a WISP-1 en un 30 % o un 70 % respectivamente. En similares condiciones, la adhesión celular al colágeno I y II no cambia significativamente. Los resultados indican que la adhesión de los fibroblastos de piel humana a WISP-1 está mediada a través de un mecanismo diferente que la adhesión al colágeno I y al colágeno II. Esto indica también que aunque el proteoglicano que contiene heparina puede participar en este fenómeno, la adhesión de los fibroblastos de piel humana a WISP-1 está mediada principalmente a través del proteoglicano dermatán sulfato.

Ejemplo 4

Ensayo de rediferenciación de condriocitos

[0188] Se llevó a cabo un experimento para determinar los efectos de diversas concentraciones de polipéptidos WISP-1 en la diferenciación de los condriocitos. Con el fin de cultivar condriocitos, se digirió el cartílago articular con enzimas que eliminan la matriz extracelular. De esta manera, el ambiente celular en este sistema de cultivo puede ser similar al encontrado en las últimas etapas de los trastornos del cartílago en las que se ha agotado la matriz y las células de los condriocitos tienden a revertir hacia un fenotipo "inmaduro".

[0189] Se diseccionaron asépticamente las articulaciones metacarpofalangeales de cerdos hembra de 4-6 meses de edad, y se retiró el cartílago articular teniendo cuidado de retirar una lámina a pulso con el fin de evitar el hueso subyacente. A continuación se digirieron estos fragmentos de cartílago en tripsina al 0,05 % en F12 de Ham exento de suero durante 25 minutos a 37 °C. El medio se drenó y se descartó, y se digirió el cartílago en collagenasa B al 0,3 % en medios F12 de Ham exentos de suero durante treinta minutos a 37 °C. El medio se drenó y se descartó, y se digirió el cartílago durante la noche en collagenasa B al 0,06 % en F12 de Ham + suero bovino fetal al 10 %. A continuación se filtraron las células a través de un filtro de nylon de 70 micrómetros y se sembraron en medio F12 de Ham sin suero. Las células aisladas se sembraron a 25.000 células/cm² en Ham F12 que contenía FBS al 10 % y 4 µg/ml de gentamicina. Los medios de cultivo se cambiaron cada tercer día y se volvieron a sembrar las células a 25.000 células/cm² cada cinco días. En el día 12, se sembraron las células en placas de 96 pocillos a 5.000 células/pocillo en 100 µl de los mismos medios sin suero y se añadieron 100 µl de WISP-1-IgG humano (véase la Figura 17) a un 1 % de dilución para dar un volumen final de 200 µl/pocillo. Después de 5 días a 37 °C se tomó una imagen de cada pocillo usando un microscopio invertido impulsado por etapas. Se determinó morfológicamente el estado de diferenciación usando el software Metamorph de Universal Imaging Corporation. En cada imagen, se seleccionaron las células redondeadas que correspondían a condriocitos rediferenciados de acuerdo con su tamaño y forma mientras que se eliminaron las células aplanadas que tenían un fenotipo desdiferenciado. Se calculó a continuación el área total cubierta por las células seleccionadas en una imagen y se comparó con un control positivo (condriocitos rediferenciados mediante Estaurosporina) y con un control negativo (células sin tratar).

[0190] El cálculo y la interpretación del resultado se llevaron a cabo como sigue:

Cálculo del resultado;

Y = Área de los condriocitos

Índice de rediferenciación = [(Y - Y_{control negativo}) / (Y_{control positivo} - Y_{control negativo})] * 100

Interpretaciones del resultado

El mayor índice de rediferenciación, el mejor de la molécula WISP promoverá que los condriocitos se diferencien.

Corte del resultado: Índice de rediferenciación > 40 → resultado positivo.

[0191] En la Fig. 12 se muestran los resultados.

Ejemplo 5

Ensayo de tinción del colágeno II

[0192] Colágeno II es un marcador preferido de condriocitos después que los condriocitos primarios de porcino están en cultivo durante 10 días para "desdiferenciarse" en células del mesénquima, las células tienden a perder su expresión del colágeno II. Se llevó a cabo el ensayo de diferenciación de los condriocitos tal como se ha descrito anteriormente en el que se trataron pocillos por triplicado para los controles (+) y (-) y por duplicado de cada una de

las siguientes proteínas durante 5 días:

Positivos	- Estaurosporina 5 nM (0,5 µl/50 ml) IGF-1 100 nM
Negativo	- solo medio
Ensayo -	WISP-1-His 100 nM WISP-2-His 100 nM WISP-3-His 100 nM

(Se prepararon construcciones del polipéptido WISP usando una etiqueta His N terminal unida a cada polipéptido WISP).

[0193] Después que se tomaran imágenes usando el microscopio invertido (tal como se ha descrito en el Ejemplo 4), se fijaron las células en alcohol etílico al 70 % durante 15 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se lavaron 3x con PBS. Se bloquearon las placas con PBS/BSA al 3 % durante 60 minutos a 200 µl/pocillo. Los pocillos tratados se trataron con anticuerpo de ratón dirigido contra Colágeno II (Neomarker-5 B2.5) en PBS/BSA al 3 % durante 1 hora a temperatura ambiente, realizando una dilución 1:2000. Se lavaron de nuevo las placas 3x con PBS/BSA al 0,1 %.

[0194] Tras el lavado, se incubaron las placas con 1:1000 de anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG de ratón de Laboratorios Vector en PBS/BSA al 0,1 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las placas 3X durante 2 minutos en PBS.

[0195] Se fijaron las células en paraformaldehído al 4 % en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se lavaron con TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8) + BSA al 0,3 %, 2X durante 3 minutos (500 µl/pocillo). A continuación, incubar con Dupont HRP-Estreptavidina 1:1000 en TBS + BSA al 1 % durante 30 minutos (100 µl/pocillo). Se siguió esto por lavados con TBS + BSA al 0,1 %, 3X durante 4 minutos (500 µl/pocillo). A continuación, incubar con tiramida biotinilada durante 10 minutos 1:50 en diluyente de amplificación (NEN Dupont) (100 µl/pocillo). Lavados con TBS + BSA al 0,1 %, 3X durante 4 minutos (500 µl/pocillo) seguido de incubación.

[0196] En la siguiente incubación, se añadió DAKO FITC-Estreptavidina 1:1000 en TBS en HBS-C + BSA al 1 % durante 30 minutos (100 µl/pocillo). A continuación, hubo un breve lavado en PBS. Finalmente, se añadió Hoescht en PBS 1:1000 (100 µl/pocillo), y a continuación se evaluó en un microscopio invertido.

[0197] En la Figura 13 se muestran los datos. Los controles positivos (Estaurosporina e IGF-1) tiñeron fuertemente el colágeno II mientras que el control negativo no muestra ninguna tinción. Las células tratadas con WISP-1 o WISP-2 o WISP-3 100 nM mostraron una fuerte tinción positiva del colágeno. Este dato indicó que las proteínas WISP promovían la rediferenciación de los condriocitos primarios de porcino en el cultivo.

Ejemplo 6

Ensayo de explante del cartilago articular

[0198] Se llevó a cabo un experimento para examinar el potencial sintético y profiláctico de los polipéptidos WISP en la renovación de la matriz del cartílago. Se determinó este potencial midiendo la síntesis y la rotura de la matriz (es decir, el proteoglicano), así como, la producción de óxido nítrico, en el cartílago articular. Se evaluaron estos parámetros en presencia y ausencia de interleucina-1 alfa. Los explantes de cartilago articular tienen algunas ventajas sobre las células primarias en el cultivo. En primer lugar, y quizá de forma más importante, las células en los explantes permanecen incluidas en la arquitectura del tejido producido *in vivo*. En segundo lugar, estos explantes son fenotípicamente estables durante algunas semanas *ex vivo*, durante cuyo tiempo son capaces de mantener la homeostasis del tejido. Finalmente, a diferencia de las células primarias, se pueden usar explantes para medir la rotura de la matriz. Para establecer los explantes de cartilago, se debe diseccionar y picar el cartilago articular, lo que da como resultado la perturbación de la red de colágeno y la liberación de proteoglicanos en los medios de cultivo. Este sistema imita de esta manera las condiciones degenerativas tales como la artritis en la que la matriz se agota progresivamente.

[0199] Se diseccionó asépticamente la articulación metacarpofalangeal de cerdos hembra de 4-6 meses de edad tal como se ha descrito anteriormente. El cartilago se picó, se lavó y se cultivó a granel durante al menos 24 horas a 37 °C y CO₂ al 5 % en medios de explantes, es decir, medios LG DMEM/F12 exentos de suero (SF) con BSA al 0,1 %, 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco), L-Glutamina 2 mM, piruvato de sodio 0,1 mM (Gibco), 20 µg/ml de Gentamicina (Gibco) y 1,25 mg/l de Anfotericina B. Se distribuyó en alícuotas el cartilago articular en tubos micrónicos (aproximadamente 55 mg por tubo) y se incubó durante al menos 24 horas en los medios anteriores. Se cosecharon los medios y se añadieron nuevos medios (solo o con polipéptidos WISP (construcciones de fusión de IgG) en diversos puntos temporales (0, 24, 48 y 72 horas).

[0200] Se cosecharon los medios en diversos puntos temporales y a continuación se ensayaron para el contenido de proteoglicano usando el ensayo colorimétrico del azul de 1,9-dimetilmetileno (DMMB) de Farndale y Buttle, Biochim. Biophys. Acta 883: 173-177 (1985) tal como se ha descrito anteriormente. Se usó la liberación de PG a las 0 horas como medida del valor inicial, y se descartó cualquier muestra con liberación de PG especialmente alta o baja antes del tratamiento con el polipéptido WISP-1. Para todos los tratamientos, los resultados representan el promedio de 5 muestras independientes.

[0201] A las 48 horas después del primer tratamiento, se añadió "S-sulfato a los explantes de cartílago a una concentración final de 10 μ Ci/ml junto con medios recientes (con o sin compuesto de ensayo). Después de 12-17 horas más de incubación a 37 °C, se retiraron los medios y se guardaron para el posterior análisis del PG y el óxido nítrico (NO). Los explantes de cartílago se lavaron dos veces con medios de explantes y se digirieron durante la noche a 50 °C en un volumen de reacción de 900 ml de EDTA 10 mM, fosfato de sodio 0,1 M y 1 mg/ml de proteinasa K (Gibco BRL). La reacción de digestión se mezcló (2:1) con cloruro de cetilpiridinio al 10 % o/v (Sigma) para precipitar los proteoglicanos y se centrifugó a 1000 x g durante 15 minutos. Se retiró el sobrenadante y se añadió ácido fórmico (500 ml, Sigma) para disolver los aglomerados. A continuación se transfirieron las muestras a viales que contenían 10 ml de fluido de centelleo (ICN) y se leyeron en un contador de centelleo.

[0202] Después de 72 horas, los explantes restantes de cartílago articular se digirieron tal como se ha descrito anteriormente y se ensayaron para el contenido de proteoglicano usando el ensayo colorimétrico DMMB (al que se hace referencia anteriormente)

[0203] Cuando los explantes de cartílago articular se trataron tanto con WISP-3 (Fig. 14) como con WISP-1 (Fig. 15A), disminuyó la rotura de la matriz del cartílago inducida de manera basal y por IL-1 alfa. Además, WISP-1 inhibió la producción de óxido nítrico inducida de manera basal y por IL-1 alfa (Fig. 15B).

[0204] Estos resultados muestran que los polipéptidos WISP pueden dar protección frente al catabolismo del cartílago. Dado el hecho de que se encuentran niveles elevados de óxido nítrico e IL-1 alfa en las articulaciones enfermas, la capacidad de los polipéptidos WISP de bloquear la actividad de IL-1 alfa y la producción de óxido nítrico sugiere que los polipéptidos WISP pueden disminuir la extensión de daño tisular en las articulaciones artríticas.

Ejemplo 7

Ratones transgénicos que expresan WISP-2

[0205] Para ensayar el efecto de los polipéptidos WISP *in vivo*, se crearon ratones transgénicos que expresaban en exceso WISP-2 en su músculo en virtud del promotor de la cadena ligera de miosina. Se prepararon los ratones transgénicos usando técnicas conocidas en la materia (Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Beddington y col., Cold Spring Harbor Press, 1994; Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press, Nueva York, 1994). Se examinaron los huesos de estos ratones a las 14 semanas de edad mediante histología normalizada. Tras el sacrificio de los animales, se fijaron los huesos en formalina tamponada al 4 % seguido por descalcificación en FormicaTM durante 4-8 horas. A continuación se procesaron las muestras para la inclusión en parafina y para la evaluación histológica. Se cortaron secciones escalonadas de 3 micrómetros de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

[0206] Tal como se muestra en la Figura 16, los compartimentos del cartílago hialino (es decir, la placa de crecimiento y el cartílago articular) parecen expandirse. Estos resultados son consistentes con los resultados presentados en los ejemplos anteriores que muestran la capacidad de los polipéptidos WISP de inducir la diferenciación celular del cartílago y de inhibir la rotura de la matriz del cartílago. De esta manera, los polipéptidos WISP pueden tener potentes efectos sobre el tejido del cartílago *in vivo*. El tratamiento de un individuo artrítico con un polipéptido que tiene dicha actividad, concretamente uno que aumente la cantidad de cartílago, puede evitar la discapacidad y la destrucción de la articulación que se puede producir en pacientes artríticos.

[0207] Los siguientes párrafos numerados (párrafs.) contienen afirmaciones adicionales de diversos aspectos de la presente invención;-

1. Un procedimiento de tratamiento de células o tejido de cartílago de mamífero, que comprende poner en contacto las células o el tejido dañado del cartílago de mamífero procedente de un trastorno cartilaginoso degenerativo con una cantidad eficaz de polipéptido WISP-1, polipéptido WISP-2 o polipéptido WISP-3.
2. El procedimiento de para 1 en el que dicho cartílago es cartílago articular.
3. El procedimiento de para 1 en el que el trastorno cartilaginoso degenerativo es artritis reumatoide u osteoartritis.
4. El procedimiento de para 3 en el que el trastorno cartilaginoso degenerativo es artritis reumatoide.

5. Un procedimiento de tratamiento de células o tejido de cartílago de mamífero, que comprende poner en contacto las células o el tejido dañado del cartílago de mamífero procedente de un trastorno cartilaginoso degenerativo con una cantidad eficaz de polipéptido WISP, en el que dicho polipéptido WISP es un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un polipéptido WISP-1 que comprende los aminoácidos 23 a 367 de la SEQ ID NO: 3;
- b) un polipéptido WISP-1 que comprende los aminoácidos 1 a 367 de la SEQ ID NO: 3;
- c) un polipéptido WISP-1 que tiene al menos un 90 % de identidad con el polipéptido de a) o b);
- d) un fragmento biológicamente activo del polipéptido de a) o b);
- e) un polipéptido WISP-2 que comprende los aminoácidos 24 a 250 de la SEQ ID NO: 10;
- f) un polipéptido WISP-2 que comprende los aminoácidos 1 a 250 de la SEQ ID NO: 10;
- g) un polipéptido WISP-2 que tiene al menos un 90 % de identidad con el polipéptido de e) o f);
- h) un fragmento biológicamente activo del polipéptido de e) o f);
- i) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 34 a 372 de la SEQ ID NO: 9;
- j) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 1 a 372 de la SEQ ID NO: 9;
- k) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 16 a 354 de la SEQ ID NO: 8;
- l) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 1 a 354 de la SEQ ID NO: 8;
- m) un polipéptido WISP-3 que tiene al menos un 90 % de identidad con el polipéptido de i), j), k) o l), y
- n) un fragmento biológicamente activo del polipéptido de i), j), k) o l).

6. El procedimiento de para 5 en el que dicho polipéptido WISP es un polipéptido seleccionado de:

- a) un polipéptido WISP-1 que comprende los aminoácidos 23 a 367 de la SEQ ID NO: 3;
- b) un polipéptido WISP-1 que comprende los aminoácidos 1 a 367 de la SEQ ID NO: 3;
- c) un polipéptido WISP-1 que tiene al menos un 90 % de identidad con el polipéptido de a) o b), en el que dicho polipéptido WISP-1 estimula la proliferación o la diferenciación de condriocitos; y
- d) un fragmento biológicamente activo del polipéptido WISP-1 de a) o b), en el que dicho fragmento biológicamente activo estimula la proliferación o la diferenciación de condriocitos.

7. El procedimiento de para 6 en el que dicho polipéptido WISP-1 comprende los aminoácidos 23 a 367 de la SEQ ID NO: 3.

8. El procedimiento de para 6 en el que dicho polipéptido WISP-1 está unido a una o más moléculas de polietilenglicol.

9. El procedimiento de para 6 en el que dicho polipéptido WISP-1 está unido a un epítipo etiqueta o a una molécula de inmunoglobulina.

10. El procedimiento de para 5 en el que dicho polipéptido WISP consiste en un polipéptido seleccionado entre:

- a) un polipéptido WISP-2 que comprende los aminoácidos 24 a 250 de la SEQ ID NO: 10;
- b) un polipéptido WISP-2 que comprende los aminoácidos 1 a 250 de la SEQ ID NO: 10;
- c) un polipéptido WISP-2 que tiene al menos un 90 % de identidad con el polipéptido de a) o b), en el que dicho polipéptido WISP-2 estimula la proliferación o la diferenciación de condriocitos; y
- d) un fragmento biológicamente activo del polipéptido WISP-2 de a) o b), en el que dicho fragmento biológicamente activo estimula la proliferación o la diferenciación de condriocitos.

11. El procedimiento de para 10 en el que dicho polipéptido WISP-2 comprende los aminoácidos 24 a 250 de la SEQ ID NO: 10.

12. El procedimiento de para 10 en el que dicho polipéptido WISP-2 está unido a una o más moléculas de polietilenglicol.

13. El procedimiento de para 10 en el que dicho polipéptido WISP-2 está unido a un epítipo etiqueta o a una molécula de inmunoglobulina.

14. El procedimiento de para 5 en el que dicho polipéptido WISP consiste en un polipéptido seleccionado entre:

- a) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 34 a 372 de la SEQ ID NO: 9;
- b) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 1 a 372 de la SEQ ID NO: 9;
- c) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 16 a 354 de la SEQ ID NO: 8;
- d) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 1 a 354 de la SEQ ID NO: 8;
- e) un polipéptido WISP-3 que tiene al menos un 90 % de identidad con el polipéptido de a), b), c) o d), en el que dicho polipéptido WISP-3 estimula la proliferación o la diferenciación de condriocitos, y

f) un fragmento biológicamente activo del polipéptido de a), b), c) o d), en el que dicho fragmento biológicamente activo estimula la proliferación o diferenciación de condriocitos.

15. El procedimiento de para 14 en el que dicho polipéptido WISP-3 comprende los aminoácidos 34 a 372 de la SEQ ID NO: 9.

16. El procedimiento de para 14 en el que dicho polipéptido WISP-3 comprende los aminoácidos 16 a 354 de la SEQ ID NO: 8.

17. El procedimiento de para 14 en el que dicho polipéptido WISP-3 está unido a una o más moléculas de polietilenglicol.

18. El procedimiento de para 14 en el que dicho polipéptido WISP-3 está unido a un epítipo etiqueta o a una molécula de inmunoglobulina.

19. El procedimiento de para 5 en el que dicho cartílago es cartílago articular.

20. El procedimiento de para 5 en el que el trastorno cartilaginoso degenerativo es artritis reumatoide u osteoartritis.

21. El procedimiento de para 20 en el que el trastorno cartilaginoso degenerativo es artritis reumatoide.

22. El procedimiento de para 5 en el que las células o el tejido de cartílago de mamífero se ponen en contacto con la cantidad eficaz del polipéptido WISP *in vivo*.

23. El procedimiento de para 5 en el que el polipéptido WISP está incluido en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

24. Un procedimiento de tratamiento de las células o el tejido de cartílago, que comprende poner en contacto las células o el tejido dañado de cartílago de mamífero de una lesión con una cantidad eficaz de polipéptido WISP, en el que dicho polipéptido WISP es un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en:

- a) un polipéptido WISP-1 que comprende los aminoácidos 23 a 367 de la SEQ ID NO: 3;
- b) un polipéptido WISP-1 que comprende los aminoácidos 1 a 367 de la SEQ ID NO: 3;
- c) un polipéptido WISP-1 que tiene al menos un 90 % de identidad con el polipéptido de a) o b);
- d) un fragmento biológicamente activo del polipéptido de a) o b);
- e) un polipéptido WISP-2 que comprende los aminoácidos 24 a 250 de la SEQ ID NO: 10;
- f) un polipéptido WISP-2 que comprende los aminoácidos 1 a 250 de la SEQ ID NO: 10;
- g) un polipéptido WISP-2 que tiene al menos un 90 % de identidad con el polipéptido de e) o f);
- h) un fragmento biológicamente activo del polipéptido de e) o f);
- i) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 34 a 372 de la SEQ ID NO: 9;
- j) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 1 a 372 de la SEQ ID NO: 9;
- k) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 16 a 354 de la SEQ ID NO: 8;
- l) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 1 a 354 de la SEQ ID NO: 8;
- m) un polipéptido WISP-3 que tiene al menos un 90 % de identidad con el polipéptido de i), j), k) o l); y
- n) un fragmento biológicamente activo del polipéptido de i), j), k) o l).

25. El procedimiento de para 24 en el que la lesión es una microlesión o un golpe contundente, una fractura condrial, una fractura osteocondrial o lesión de menisco, tendón o ligamento.

26. El procedimiento de para 24 en el que dicho polipéptido WISP se administra a un mamífero mediante inyección en dichas células o el tejido del cartílago o una articulación del mamífero.

27. El procedimiento de para 24 en el que dicho polipéptido WISP es un polipéptido seleccionado entre:

- a) un polipéptido WISP-1 que comprende los aminoácidos 23 a 367 de la SEQ ID NO: 3;
- b) un polipéptido WISP-1 que comprende los aminoácidos 1 a 367 de la SEQ ID NO: 3;
- c) un polipéptido WISP-1 que tiene al menos un 90 % de identidad con el polipéptido de a) o b), en el que dicho polipéptido WISP-1 estimula la proliferación o la diferenciación de condriocitos; y
- d) un fragmento biológicamente activo del polipéptido WISP-1 de a) o b), en el que dicho fragmento biológicamente activo estimula la proliferación o la diferenciación de condriocitos.

28. El procedimiento de para 27 en el que dicho polipéptido WISP-1 comprende los aminoácidos 23 a 367 de la SEQ ID NO: 3.

29. El procedimiento de para 27 en el que dicho polipéptido WISP-1 está unido a una o más moléculas de polietilenglicol.
- 5 30. El procedimiento de para 27 en el que dicho polipéptido WISP-1 está unido a un epítoto etiqueta o a una molécula de inmunoglobulina.
31. El procedimiento de para 24 en el que dicho polipéptido WISP consiste en un polipéptido seleccionado entre:
- 10 a) un polipéptido WISP-2 que comprende los aminoácidos 24 a 250 de la SEQ ID NO: 10;
 b) un polipéptido WISP-2 que comprende los aminoácidos 1 a 250 de la SEQ ID NO: 10;
 c) un polipéptido WISP-2 que tiene al menos un 90 % de identidad con el polipéptido de a) o b), en el que dicho polipéptido WISP-2 estimula la proliferación o la diferenciación de condriocitos; y
 d) un fragmento biológicamente activo del polipéptido WISP-2 de a) o b), en el que dicho fragmento biológicamente activo estimula la proliferación o diferenciación de condriocitos.
- 15 32. El procedimiento de para 31 en el que dicho polipéptido WISP-2 comprende los aminoácidos 24 a 250 de la SEQ ID NO: 10.
- 20 33. El procedimiento de para 31 en el que dicho polipéptido WISP-2 está unido a una o más moléculas de polietilenglicol.
34. el procedimiento de para 31 en el que dicho polipéptido WISP-2 está unido a un epítoto etiqueta o a una molécula de inmunoglobulina.
- 25 35. El procedimiento de para 24 en el que dicho polipéptido WISP consiste en un polipéptido seleccionado entre:
- a) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 34 a 372 de la SEQ ID NO: 9;
 b) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 1 a 372 de la SEQ ID NO: 9;
 c) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 16 a 354 de la SEQ ID NO: 8;
 30 d) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 1 a 354 de la SEQ ID NO: 8;
 e) un polipéptido WISP-3 que tiene al menos un 90 % de identidad con el polipéptido de a), b), c) o d), en el que dicho polipéptido WISP-3 estimula la proliferación o la diferenciación de condriocitos; y
 f) un fragmento biológicamente activo del polipéptido de a), b), c) o d), en el que dicho fragmento biológicamente activo estimula la proliferación o la diferenciación de condriocitos.
- 35 36. El procedimiento de para 35 en el que el polipéptido WISP-3 comprende los aminoácidos 34 a 372 de la SEQ ID NO: 9.
- 40 37. El procedimiento de para 35 en el que dicho polipéptido WISP-3 comprende los aminoácidos 16 a 354 de la SEQ ID NO: 8.
38. El procedimiento de para 35 en el que dicho polipéptido WISP-3 está unido a una o más moléculas de polietilenglicol.
- 45 39. El procedimiento de para 35 en el que dicho polipéptido WISP-3 está unido a un epítoto etiqueta o a una molécula de inmunoglobulina.
40. El procedimiento de para 24 en el que las células o el tejido de cartílago de mamífero se ponen en contacto con la cantidad eficaz del polipéptido WISP *in vivo*.
- 50 41. El procedimiento de para 40 en el que el polipéptido WISP está incluido en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55 42. Un artículo de fabricación que comprende (a) un recipiente que mantiene una composición que es eficaz para el diagnóstico o el tratamiento de un trastorno cartilaginoso, en el que la composición comprende una cantidad eficaz de polipéptido WISP, y (b) instrucciones para usar dicho polipéptido WISP para el diagnóstico o el tratamiento de un trastorno cartilaginoso.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0208]

5 < 110 > GENENTECH, INC.
 < 120 > Procedimientos de tratamiento que utilizan polipéptidos WISP
 < 130 > LCW/FP6663033
 < 140 > desconocido, presentado junto a la presente memoria descriptiva
 < 141 > 12-10-2001
 10 < 150 > 08001040.8
 < 151 > 12-10-2001
 < 150 > EP 01987803.2
 < 151 > 12-10-2001
 < 150 > PCT/US01/32124
 15 < 151 > 12-10-2001
 < 150 > US 60/241.222
 < 151 > 16-10-2000
 < 160 > 10
 < 170 > PatentIn versión 3.3
 20 < 210 > 1
 < 211 > 595
 < 212 > PRT
 < 213 > Homo sapiens
 < 400 > 1
 25

Met Arg Trp Phe Leu Pro Trp Thr Leu Ala Ala Val Thr Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Ser Thr Val Leu Ala Thr Ala Leu Ser Pro Ala Pro Thr Thr Met
 20 25 30

Asp Phe Thr Pro Ala Pro Leu Glu Asp Thr Ser Ser Arg Pro Gln Phe
 35 40 45

Cys Lys Trp Pro Cys Glu Cys Pro Pro Ser Pro Pro Arg Cys Pro Leu
 50 55 60

Gly Val Ser Leu Ile Thr Asp Gly Cys Glu Cys Cys Lys Met Cys Ala
 65 70 75 80

Gln Gln Leu Gly Asp Asn Cys Thr Glu Ala Ala Ile Cys Asp Pro His
 85 90 95

Arg Gly Leu Tyr Cys Asp Tyr Ser Gly Asp Arg Pro Arg Tyr Ala Ile
 100 105 110

Gly Val Cys Ala Gln Val Val Gly Val Gly Cys Val Leu Asp Gly Val
 115 120 125

Arg Tyr Asn Asn Gly Gln Ser Phe Gln Pro Asn Cys Lys Tyr Asn Cys
 130 135 140

Thr Cys Ile Asp Gly Ala Val Gly Cys Thr Pro Leu Cys Leu Arg Val
 145 150 155 160
 Arg Pro Pro Arg Leu Trp Cys Pro His Pro Arg Arg Val Ser Ile Pro
 165 170 175
 Gly His Cys Cys Glu Gln Trp Val Cys Glu Asp Asp Ala Lys Arg Pro
 180 185 190
 Arg Lys Thr Ala Pro Arg Asp Thr Gly Ala Phe Asp Ala Val Gly Glu
 195 200 205
 Val Glu Ala Trp His Arg Asn Cys Ile Ala Tyr Thr Ser Pro Trp Ser
 210 215 220
 Pro Cys Ser Thr Ser Cys Gly Leu Gly Val Ser Thr Arg Ile Ser Asn
 225 230 235 240
 Val Asn Ala Gln Cys Trp Pro Glu Gln Glu Ser Arg Leu Cys Asn Leu
 245 250 255
 Arg Pro Cys Asp Val Asp Ile His Thr Leu Ile Lys Ala Gly Lys Lys
 260 265 270
 Cys Leu Ala Val Tyr Gln Pro Glu Ala Ser Met Asn Phe Thr Leu Ala
 275 280 285
 Gly Cys Ile Ser Thr Arg Ser Tyr Gln Pro Lys Tyr Cys Gly Val Cys
 290 295 300
 Met Asp Asn Arg Cys Cys Ile Pro Tyr Lys Ser Lys Thr Ile Asp Val
 305 310 315 320
 Ser Phe Gln Cys Pro Asp Gly Leu Gly Phe Ser Arg Gln Val Leu Trp
 325 330 335
 Ile Asn Ala Cys Phe Cys Asn Leu Ser Cys Arg Asn Pro Asn Asp Ile
 340 345 350
 Phe Ala Asp Leu Glu Ser Tyr Pro Asp Phe Ser Glu Ile Ala Asn Pro
 355 360 365
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 370 375 380
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 385 390 395 400
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 405 410 415

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 420 425 430
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 435 440 445
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 450 455 460
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 465 470 475 480
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 485 490 495
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 500 505 510
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 515 520 525
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 530 535 540
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 545 550 555 560
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 565 570 575
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 580 585 590
 Pro Gly Lys
 595

< 210 > 2
 < 211 > 595
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus
 < 400 > 2

Met Arg Trp Leu Leu Pro Trp Thr Leu Ala Ala Val Ala Val Leu Arg
 1 5 10 15
 Val Gly Asn Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ser Pro Thr Pro Thr Thr Met
 20 25 30
 Thr Phe Thr Pro Ala Pro Leu Glu Glu Thr Thr Thr Arg Pro Glu Phe
 35 40 45

Cys Lys Trp Pro Cys Glu Cys Pro Gln Ser Pro Pro Arg Cys Pro Leu
 50 55 60
 Gly Val Ser Leu Ile Thr Asp Gly Cys Glu Cys Cys Lys Ile Cys Ala
 65 70 75 80
 Gln Gln Leu Gly Asp Asn Cys Thr Glu Ala Ala Ile Cys Asp Pro His
 85 90 95
 Arg Gly Leu Tyr Cys Asp Tyr Ser Gly Asp Arg Pro Arg Tyr Ala Ile
 100 105 110
 Gly Val Cys Ala Gln Val Val Gly Val Gly Cys Val Leu Asp Gly Val
 115 120 125
 Arg Tyr Thr Asn Gly Glu Ser Phe Gln Pro Asn Cys Arg Tyr Asn Cys
 130 135 140
 Thr Cys Ile Asp Gly Thr Val Gly Cys Thr Pro Leu Cys Leu Ser Pro
 145 150 155 160
 Arg Pro Pro Arg Leu Trp Cys Arg Gln Pro Arg His Val Arg Val Pro
 165 170 175
 Gly Gln Cys Cys Glu Gln Trp Val Cys Asp Asp Asp Ala Arg Arg Pro
 180 185 190
 Arg Gln Thr Ala Leu Leu Asp Thr Arg Ala Phe Ala Ala Ser Gly Ala
 195 200 205
 Val Glu Gln Arg Tyr Glu Asn Cys Ile Ala Tyr Thr Ser Pro Trp Ser
 210 215 220
 Pro Cys Ser Thr Thr Cys Gly Leu Gly Ile Ser Thr Arg Ile Ser Asn
 225 230 235 240
 Val Asn Ala Arg Cys Trp Pro Glu Gln Glu Ser Arg Leu Cys Asn Leu
 245 250 255
 Arg Pro Cys Asp Val Asp Ile Gln Leu His Ile Lys Ala Gly Lys Lys
 260 265 270
 Cys Leu Ala Val Tyr Gln Pro Glu Glu Ala Thr Asn Phe Thr Leu Ala
 275 280 285
 Gly Cys Val Ser Thr Arg Thr Tyr Arg Pro Lys Tyr Cys Gly Val Cys
 290 295 300
 Thr Asp Asn Arg Cys Cys Ile Pro Tyr Lys Ser Lys Thr Ile Ser Val
 305 310 315 320

Asp Phe Gln Cys Pro Glu Gly Pro Gly Phe Ser Arg Gln Val Leu Trp
 325 330 335
 Ile Asn Ala Cys Phe Cys Asn Leu Ser Cys Arg Asn Pro Asn Asp Ile
 340 345 350
 Phe Ala Asp Leu Glu Ser Tyr Pro Asp Phe Glu Glu Ile Ala Asn Pro
 355 360 365
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 370 375 380
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 385 390 395 400
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 405 410 415
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 420 425 430
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 435 440 445
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 450 455 460
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 465 470 475 480
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 485 490 495
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 500 505 510
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 515 520 525
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 530 535 540
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 545 550 555 560
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 565 570 575
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Ser
 580 585 590
 Pro Gly Lys
 595

< 210 > 3

< 211 > 367

< 212 > PRT
 < 213 > Homo sapiens
 < 400 > 3

Met Arg Trp Phe Leu Pro Trp Thr Leu Ala Ala Val Thr Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Ser Thr Val Leu Ala Thr Ala Leu Ser Pro Ala Pro Thr Thr Met
 20 25 30
 Asp Phe Thr Pro Ala Pro Leu Glu Asp Thr Ser Ser Arg Pro Gln Phe
 35 40 45
 Cys Lys Trp Pro Cys Glu Cys Pro Pro Ser Pro Pro Arg Cys Pro Leu
 50 55 60
 Gly Val Ser Leu Ile Thr Asp Gly Cys Glu Cys Cys Lys Met Cys Ala
 65 70 75 80
 Gln Gln Leu Gly Asp Asn Cys Thr Glu Ala Ala Ile Cys Asp Pro His
 85 90 95
 Arg Gly Leu Tyr Cys Asp Tyr Ser Gly Asp Arg Pro Arg Tyr Ala Ile
 100 105 110
 Gly Val Cys Ala Gln Val Val Gly Val Gly Cys Val Leu Asp Gly Val
 115 120 125
 Arg Tyr Asn Asn Gly Gln Ser Phe Gln Pro Asn Cys Lys Tyr Asn Cys
 130 135 140
 Thr Cys Ile Asp Gly Ala Val Gly Cys Thr Pro Leu Cys Leu Arg Val
 145 150 155 160
 Arg Pro Pro Arg Leu Trp Cys Pro His Pro Arg Arg Val Ser Ile Pro
 165 170 175
 Gly His Cys Cys Glu Gln Trp Val Cys Glu Asp Asp Ala Lys Arg Pro
 180 185 190
 Arg Lys Thr Ala Pro Arg Asp Thr Gly Ala Phe Asp Ala Val Gly Glu
 195 200 205
 Val Glu Ala Trp His Arg Asn Cys Ile Ala Tyr Thr Ser Pro Trp Ser
 210 215 220

Pro Cys Ser Thr Ser Cys Gly Leu Gly Val Ser Thr Arg Ile Ser Asn
 225 230 235 240
 Val Asn Ala Gln Cys Trp Pro Glu Gln Glu Ser Arg Leu Cys Asn Leu
 245 250 255
 Arg Pro Cys Asp Val Asp Ile His Thr Leu Ile Lys Ala Gly Lys Lys
 260 265 270
 Cys Leu Ala Val Tyr Gln Pro Glu Ala Ser Met Asn Phe Thr Leu Ala
 275 280 285
 Gly Cys Ile Ser Thr Arg Ser Tyr Gln Pro Lys Tyr Cys Gly Val Cys
 290 295 300
 Met Asp Asn Arg Cys Cys Ile Pro Tyr Lys Ser Lys Thr Ile Asp Val
 305 310 315 320
 Ser Phe Gln Cys Pro Asp Gly Leu Gly Phe Ser Arg Gln Val Leu Trp
 325 330 335
 Ile Asn Ala Cys Phe Cys Asn Leu Ser Cys Arg Asn Pro Asn Asp Ile
 340 345 350
 Phe Ala Asp Leu Glu Ser Tyr Pro Asp Phe Ser Glu Ile Ala Asn
 355 360 365

< 210 > 4
 < 211 > 367
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus
 < 400 > 4

5

Met Arg Trp Leu Leu Pro Trp Thr Leu Ala Ala Val Ala Val Leu Arg
 1 5 10 15
 Val Gly Asn Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ser Pro Thr Pro Thr Thr Met
 20 25 30
 Thr Phe Thr Pro Ala Pro Leu Glu Glu Thr Thr Thr Arg Pro Glu Phe
 35 40 45
 Cys Lys Trp Pro Cys Glu Cys Pro Gln Ser Pro Pro Arg Cys Pro Leu
 50 55 60
 Gly Val Ser Leu Ile Thr Asp Gly Cys Glu Cys Cys Lys Ile Cys Ala
 65 70 75 80
 Gln Gln Leu Gly Asp Asn Cys Thr Glu Ala Ala Ile Cys Asp Pro His
 85 90 95
 Arg Gly Leu Tyr Cys Asp Tyr Ser Gly Asp Arg Pro Arg Tyr Ala Ile

ES 2 381 935 T3

100							105					110				
Gly	Val	Cys 115	Ala	Gln	Val	Val	Gly 120	Val	Gly	Cys	Val	Leu 125	Asp	Gly	Val	
Arg	Tyr 130	Thr	Asn	Gly	Glu	Ser 135	Phe	Gln	Pro	Asn	Cys 140	Arg	Tyr	Asn	Cys	
Thr 145	Cys	Ile	Asp	Gly	Thr 150	Val	Gly	Cys	Thr	Pro 155	Leu	Cys	Leu	Ser	Pro 160	
Arg	Pro	Pro	Arg	Leu 165	Trp	Cys	Arg	Gln	Pro 170	Arg	His	Val	Arg	Val 175	Pro	
Gly	Gln	Cys	Cys 180	Glu	Gln	Trp	Val	Cys 185	Asp	Asp	Asp	Ala	Arg 190	Arg	Pro	
Arg	Gln	Thr 195	Ala	Leu	Leu	Asp	Thr 200	Arg	Ala	Phe	Ala	Ala 205	Ser	Gly	Ala	
Val	Glu 210	Gln	Arg	Tyr	Glu	Asn 215	Cys	Ile	Ala	Tyr	Thr 220	Ser	Pro	Trp	Ser	
Pro 225	Cys	Ser	Thr	Thr	Cys 230	Gly	Leu	Gly	Ile	Ser 235	Thr	Arg	Ile	Ser	Asn 240	
Val	Asn	Ala	Arg	Cys 245	Trp	Pro	Glu	Gln	Glu 250	Ser	Arg	Leu	Cys	Asn 255	Leu	
Arg	Pro	Cys	Asp 260	Val	Asp	Ile	Gln	Leu 265	His	Ile	Lys	Ala	Gly 270	Lys	Lys	
Cys	Leu	Ala 275	Val	Tyr	Gln	Pro	Glu 280	Glu	Ala	Thr	Asn	Phe 285	Thr	Leu	Ala	
Gly	Cys 290	Val	Ser	Thr	Arg	Thr 295	Tyr	Arg	Pro	Lys	Tyr 300	Cys	Gly	Val	Cys	
Thr 305	Asp	Asn	Arg	Cys	Cys 310	Ile	Pro	Tyr	Lys	Ser 315	Lys	Thr	Ile	Ser	Val 320	
Asp	Phe	Gln	Cys	Pro 325	Glu	Gly	Pro	Gly	Phe 330	Ser	Arg	Gln	Val	Leu 335	Trp	
Ile	Asn	Ala	Cys 340	Phe	Cys	Asn	Leu	Ser 345	Cys	Arg	Asn	Pro	Asn 350	Asp	Ile	
Phe	Ala	Asp 355	Leu	Glu	Ser	Tyr	Pro 360	Asp	Phe	Glu	Glu	Ile 365	Ala	Asn		

< 210 > 5
< 211 > 228
< 212 > PRT
< 213 > Homo sapiens

< 400 > 5

Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys
225

- 5 < 210 > 6
 < 211 > 600
 < 212 > PRT
 < 213 > Homo sapiens
 < 400 > 6

Met Asn Lys Arg Arg Leu Leu Tyr Pro Ser Gly Trp Leu His Gly Pro
 1 5 10 15
 Ser Asp Met Gln Gly Leu Leu Phe Ser Thr Leu Leu Leu Ala Gly Leu
 20 25 30
 Ala Gln Phe Cys Cys Arg Val Gln Gly Thr Gly Pro Leu Asp Thr Thr
 35 40 45
 Pro Glu Gly Arg Pro Gly Glu Val Ser Asp Ala Pro Gln Arg Lys Gln
 50 55 60
 Phe Cys His Trp Pro Cys Lys Cys Pro Gln Gln Lys Pro Arg Cys Pro
 65 70 75 80
 Pro Gly Val Ser Leu Val Arg Asp Gly Cys Gly Cys Cys Lys Ile Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gln Pro Gly Glu Ile Cys Asn Glu Ala Asp Leu Cys Asp Pro
 100 105 110
 His Lys Gly Leu Tyr Cys Asp Tyr Ser Val Asp Arg Pro Arg Tyr Glu
 115 120 125
 Thr Gly Val Cys Ala Tyr Leu Val Ala Val Gly Cys Glu Phe Asn Gln
 130 135 140
 Val His Tyr His Asn Gly Gln Val Phe Gln Pro Asn Pro Leu Phe Ser
 145 150 155 160
 Cys Leu Cys Val Ser Gly Ala Ile Gly Cys Thr Pro Leu Phe Ile Pro
 165 170 175
 Lys Leu Ala Gly Ser His Cys Ser Gly Ala Lys Gly Gly Lys Lys Ser
 180 185 190
 Asp Gln Ser Asn Cys Ser Leu Glu Pro Leu Leu Gln Gln Leu Ser Thr
 195 200 205
 Ser Tyr Lys Thr Met Pro Ala Tyr Arg Asp Leu Pro Leu Ile Trp Lys
 210 215 220
 Lys Lys Cys Leu Val Gln Ala Thr Lys Trp Thr Pro Cys Ser Arg Thr
 225 230 235 240
 Cys Gly Met Gly Ile Ser Asn Arg Val Thr Asn Glu Asn Ser Asn Cys
 245 250 255

Glu Met Arg Lys Glu Lys Arg Leu Cys Tyr Ile Gln Pro Cys Asp Ser
 260 265 270
 Asn Ile Leu Lys Thr Ile Lys Ile Pro Lys Gly Lys Thr Cys Gln Pro
 275 280 285
 Thr Phe Gln Leu Ser Lys Ala Glu Lys Phe Val Phe Ser Gly Cys Ser
 290 295 300
 Ser Thr Gln Ser Tyr Lys Pro Thr Phe Cys Gly Ile Cys Leu Asp Lys
 305 310 315 320
 Arg Cys Cys Ile Pro Asn Lys Ser Lys Met Ile Thr Ile Gln Phe Asp
 325 330 335
 Cys Pro Asn Glu Gly Ser Phe Lys Trp Lys Met Leu Trp Ile Thr Ser
 340 345 350
 Cys Val Cys Gln Arg Asn Cys Arg Glu Pro Gly Asp Ile Phe Ser Glu
 355 360 365
 Leu Lys Ile Leu Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 370 375 380
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 385 390 395 400
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 405 410 415
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 420 425 430
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 435 440 445
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 450 455 460
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 465 470 475 480
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 485 490 495
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 500 505 510
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 515 520 525

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 530 535 540

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 545 550 555 560

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 565 570 575

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 580 585 590

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 595 600

< 210 > 7
 < 211 > 582
 < 212 > PRT
 < 213 > Homo sapiens
 < 400 > 7

5

Met Gln Gly Leu Leu Phe Ser Thr Leu Leu Leu Ala Gly Leu Ala Gln
 1 5 10 15

Phe Cys Cys Arg Val Gln Gly Thr Gly Pro Leu Asp Thr Thr Pro Glu
 20 25 30

Gly Arg Pro Gly Glu Val Ser Asp Ala Pro Gln Arg Lys Gln Phe Cys
 35 40 45

His Trp Pro Cys Lys Cys Pro Gln Gln Lys Pro Arg Cys Pro Pro Gly
 50 55 60

Val Ser Leu Val Arg Asp Gly Cys Gly Cys Cys Lys Ile Cys Ala Lys
 65 70 75 80

Gln Pro Gly Glu Ile Cys Asn Glu Ala Asp Leu Cys Asp Pro His Lys
 85 90 95

Gly Leu Tyr Cys Asp Tyr Ser Val Asp Arg Pro Arg Tyr Glu Thr Gly
 100 105 110

Val Cys Ala Tyr Leu Val Ala Val Gly Cys Glu Phe Asn Gln Val His
 115 120 125

Tyr His Asn Gly Gln Val Phe Gln Pro Asn Pro Leu Phe Ser Cys Leu
 130 135 140

Cys Val Ser Gly Ala Ile Gly Cys Thr Pro Leu Phe Ile Pro Lys Leu
 145 150 155 160

Ala Gly Ser His Cys Ser Gly Ala Lys Gly Gly Lys Lys Ser Asp Gln
165 170 175

Ser Asn Cys Ser Leu Glu Pro Leu Leu Gln Gln Leu Ser Thr Ser Tyr
180 185 190

Lys Thr Met Pro Ala Tyr Arg Asn Leu Pro Leu Ile Trp Lys Lys Lys
195 200 205

Cys Leu Val Gln Ala Thr Lys Trp Thr Pro Cys Ser Arg Thr Cys Gly
210 215 220

Met Gly Ile Ser Asn Arg Val Thr Asn Glu Asn Ser Asn Cys Glu Met
225 230 235 240

Arg Lys Glu Lys Arg Leu Cys Tyr Ile Gln Pro Cys Asp Ser Asn Ile
245 250 255

Leu Lys Thr Ile Lys Ile Pro Lys Gly Lys Thr Cys Gln Pro Thr Phe
260 265 270

Gln Leu Ser Lys Ala Glu Lys Phe Val Phe Ser Gly Cys Ser Ser Thr
275 280 285

Gln Ser Tyr Lys Pro Thr Phe Cys Gly Ile Cys Leu Asp Lys Arg Cys
290 295 300

Cys Ile Pro Asn Lys Ser Lys Met Ile Thr Ile Gln Phe Asp Cys Pro
305 310 315 320

Asn Glu Gly Ser Phe Lys Trp Lys Met Leu Trp Ile Thr Ser Cys Val
325 330 335

Cys Gln Arg Asn Cys Arg Glu Pro Gly Asp Ile Phe Ser Glu Leu Lys
340 345 350

Ile Leu Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
355 360 365

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
370 375 380

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
385 390 395 400

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
405 410 415

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
420 425 430

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
435 440 445

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
450 455 460

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
465 470 475 480

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
485 490 495

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
500 505 510

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
515 520 525

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
530 535 540

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
545 550 555 560

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
565 570 575

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580

< 210 > 8
< 211 > 354
< 212 > PRT
< 213 > Homo sapiens
< 400 > 8

5

Met Gln Gly Leu Leu Phe Ser Thr Leu Leu Leu Ala Gly Leu Ala Gln
 1 5 10 15
 Phe Cys Cys Arg Val Gln Gly Thr Gly Pro Leu Asp Thr Thr Pro Glu
 20 25 30
 Gly Arg Pro Gly Glu Val Ser Asp Ala Pro Gln Arg Lys Gln Phe Cys
 35 40 45
 His Trp Pro Cys Lys Cys Pro Gln Gln Lys Pro Arg Cys Pro Pro Gly
 50 55 60
 Val Ser Leu Val Arg Asp Gly Cys Gly Cys Cys Lys Ile Cys Ala Lys
 65 70 75 80
 Gln Pro Gly Glu Ile Cys Asn Glu Ala Asp Leu Cys Asp Pro His Lys

85										90					95				
Gly	Leu	Tyr	Cys ₁₀₀	Asp	Tyr	Ser	Val	Asp ₁₀₅	Arg	Pro	Arg	Tyr	Glu ₁₁₀	Thr	Gly				
Val	Cys	Ala ₁₁₅	Tyr	Leu	Val	Ala	Val ₁₂₀	Gly	Cys	Glu	Phe	Asn ₁₂₅	Gln	Val	His				
Tyr	His ₁₃₀	Asn	Gly	Gln	Val	Phe ₁₃₅	Gln	Pro	Asn	Pro	Leu ₁₄₀	Phe	Ser	Cys	Leu				
Cys ₁₄₅	Val	Ser	Gly	Ala	Ile ₁₅₀	Gly	Cys	Thr	Pro	Leu ₁₅₅	Phe	Ile	Pro	Lys	Leu ₁₆₀				
Ala	Gly	Ser	His	Cys ₁₆₅	Ser	Gly	Ala	Lys	Gly ₁₇₀	Gly	Lys	Lys	Ser	Asp ₁₇₅	Gln				
Ser	Asn	Cys	Ser ₁₈₀	Leu	Glu	Pro	Leu	Leu ₁₈₅	Gln	Gln	Leu	Ser	Thr ₁₉₀	Ser	Tyr				
Lys	Thr	Met ₁₉₅	Pro	Ala	Tyr	Arg	Asn ₂₀₀	Leu	Pro	Leu	Ile	Trp ₂₀₅	Lys	Lys	Lys				
Cys	Leu ₂₁₀	Val	Gln	Ala	Thr	Lys ₂₁₅	Trp	Thr	Pro	Cys	Ser ₂₂₀	Arg	Thr	Cys	Gly				
Met ₂₂₅	Gly	Ile	Ser	Asn	Arg ₂₃₀	Val	Thr	Asn	Glu	Asn ₂₃₅	Ser	Asn	Cys	Glu	Met ₂₄₀				
Arg	Lys	Glu	Lys	Arg ₂₄₅	Leu	Cys	Tyr	Ile	Gln ₂₅₀	Pro	Cys	Asp	Ser	Asn ₂₅₅	Ile				
Leu	Lys	Thr	Ile ₂₆₀	Lys	Ile	Pro	Lys	Gly ₂₆₅	Lys	Thr	Cys	Gln	Pro ₂₇₀	Thr	Phe				
Gln	Leu	Ser ₂₇₅	Lys	Ala	Glu	Lys	Phe ₂₈₀	Val	Phe	Ser	Gly	Cys ₂₈₅	Ser	Ser	Thr				
Gln	Ser ₂₉₀	Tyr	Lys	Pro	Thr	Phe ₂₉₅	Cys	Gly	Ile	Cys	Leu ₃₀₀	Asp	Lys	Arg	Cys				
Cys ₃₀₅	Ile	Pro	Asn	Lys	Ser ₃₁₀	Lys	Met	Ile	Thr	Ile ₃₁₅	Gln	Phe	Asp	Cys	Pro ₃₂₀				
Asn	Glu	Gly	Ser	Phe ₃₂₅	Lys	Trp	Lys	Met	Leu ₃₃₀	Trp	Ile	Thr	Ser	Cys ₃₃₅	Val				
Cys	Gln	Arg	Asn ₃₄₀	Cys	Arg	Glu	Pro	Gly ₃₄₅	Asp	Ile	Phe	Ser	Glu ₃₅₀	Leu	Lys				
Ile	Leu																		

< 210 > 9
 < 211 > 372
 < 212 > PRT
 < 213 > Homo sapiens

< 400 > 9

Met Asn Lys Arg Arg Leu Leu Tyr Pro Ser Gly Trp Leu His Gly Pro
 1 5 10 15
 Ser Asp Met Gln Gly Leu Leu Phe Ser Thr Leu Leu Leu Ala Gly Leu
 20 25 30
 Ala Gln Phe Cys Cys Arg Val Gln Gly Thr Gly Pro Leu Asp Thr Thr
 35 40 45
 Pro Glu Gly Arg Pro Gly Glu Val Ser Asp Ala Pro Gln Arg Lys Gln
 50 55 60
 Phe Cys His Trp Pro Cys Lys Cys Pro Gln Gln Lys Pro Arg Cys Pro
 65 70 75 80
 Pro Gly Val Ser Leu Val Arg Asp Gly Cys Gly Cys Cys Lys Ile Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gln Pro Gly Glu Ile Cys Asn Glu Ala Asp Leu Cys Asp Pro
 100 105 110
 His Lys Gly Leu Tyr Cys Asp Tyr Ser Val Asp Arg Pro Arg Tyr Glu
 115 120 125
 Thr Gly Val Cys Ala Tyr Leu Val Ala Val Gly Cys Glu Phe Asn Gln
 130 135 140
 Val His Tyr His Asn Gly Gln Val Phe Gln Pro Asn Pro Leu Phe Ser
 145 150 155 160
 Cys Leu Cys Val Ser Gly Ala Ile Gly Cys Thr Pro Leu Phe Ile Pro
 165 170 175
 Lys Leu Ala Gly Ser His Cys Ser Gly Ala Lys Gly Gly Lys Lys Ser
 180 185 190
 Asp Gln Ser Asn Cys Ser Leu Glu Pro Leu Leu Gln Gln Leu Ser Thr
 195 200 205
 Ser Tyr Lys Thr Met Pro Ala Tyr Arg Asp Leu Pro Leu Ile Trp Lys
 210 215 220
 Lys Lys Cys Leu Val Gln Ala Thr Lys Trp Thr Pro Cys Ser Arg Thr
 225 230 235 240

Cys Gly Met Gly Ile Ser Asn Arg Val Thr Asn Glu Asn Ser Asn Cys
245 250 255
Glu Met Arg Lys Glu Lys Arg Leu Cys Tyr Ile Gln Pro Cys Asp Ser
260 265 270
Asn Ile Leu Lys Thr Ile Lys Ile Pro Lys Gly Lys Thr Cys Gln Pro
275 280 285
Thr Phe Gln Leu Ser Lys Ala Glu Lys Phe Val Phe Ser Gly Cys Ser
290 295 300
Ser Thr Gln Ser Tyr Lys Pro Thr Phe Cys Gly Ile Cys Leu Asp Lys
305 310 315 320
Arg Cys Cys Ile Pro Asn Lys Ser Lys Met Ile Thr Ile Gln Phe Asp
325 330 335
Cys Pro Asn Glu Gly Ser Phe Lys Trp Lys Met Leu Trp Ile Thr Ser
340 345 350
Cys Val Cys Gln Arg Asn Cys Arg Glu Pro Gly Asp Ile Phe Ser Glu
355 360 365
Leu Lys Ile Leu
370

< 210 > 10
< 211 > 250
5 < 212 > PRT
< 213 > Homo sapiens
< 400 > 10

Met Arg Gly Thr Pro Lys Thr His Leu Leu Ala Phe Ser Leu Leu Cys
1 5 10 15
Leu Leu Ser Lys Val Arg Thr Gln Leu Cys Pro Thr Pro Cys Thr Cys
20 25 30
Pro Trp Pro Pro Pro Arg Cys Pro Leu Gly Val Pro Leu Val Leu Asp
35 40 45
Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Arg Arg Leu Gly Glu Pro Cys
50 55 60
Asp Gln Leu His Val Cys Asp Ala Ser Gln Gly Leu Val Cys Gln Pro
65 70 75 80
Gly Ala Gly Pro Gly Gly Arg Gly Ala Leu Cys Leu Leu Ala Glu Asp
85 90 95

Asp Ser Ser Cys Glu Val Asn Gly Arg Leu Tyr Arg Glu Gly Glu Thr
 100 105 110
 Phe Gln Pro His Cys Ser Ile Arg Cys Arg Cys Glu Asp Gly Gly Phe
 115 120 125
 Thr Cys Val Pro Leu Cys Ser Glu Asp Val Arg Leu Pro Ser Trp Asp
 130 135 140
 Cys Pro His Pro Arg Arg Val Glu Val Leu Gly Lys Cys Cys Pro Glu
 145 150 155 160
 Trp Val Cys Gly Gln Gly Gly Gly Leu Gly Thr Gln Pro Leu Pro Ala
 165 170 175
 Gln Gly Pro Gln Phe Ser Gly Leu Val Ser Ser Leu Pro Pro Gly Val
 180 185 190
 Pro Cys Pro Glu Trp Ser Thr Ala Trp Gly Pro Cys Ser Thr Thr Cys
 195 200 205
 Gly Leu Gly Met Ala Thr Arg Val Ser Asn Gln Asn Arg Phe Cys Arg
 210 215 220
 Leu Glu Thr Gln Arg Arg Leu Cys Leu Ser Arg Pro Cys Pro Pro Ser
 225 230 235 240
 Arg Gly Arg Ser Pro Gln Asn Ser Ala Phe
 245 250

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido WISP-3 para uso en un procedimiento de tratamiento de células o tejido de cartílago de mamífero dañados en un trastorno cartilaginoso degenerativo, comprendiendo dicho procedimiento poner en
5 contacto dichas células o tejido del cartílago con una cantidad eficaz de polipéptido WISP-3, en el que el trastorno cartilaginoso degenerativo es artritis reumatoide u osteoartritis.
2. Uso de un polipéptido WISP-3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de células o
10 tejido de cartílago de mamífero dañados en un trastorno cartilaginoso degenerativo, en el que el trastorno cartilaginoso degenerativo es artritis reumatoide u osteoartritis.
3. El polipéptido WISP-3 para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2 en el que dicho cartílago es cartílago articular.
- 15 4. El polipéptido WISP-3 para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2 en el que el trastorno cartilaginoso degenerativo es artritis reumatoide.
5. Un polipéptido WISP-3 para uso en un procedimiento de tratamiento de células o tejido lesionados de
20 cartílago de mamífero, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dichas células o tejido de cartílago dañados de la lesión con una cantidad eficaz de polipéptido WISP-3.
6. Uso de un polipéptido WISP-3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de células o
tejido lesionados de cartílago de mamífero.
- 25 7. El polipéptido WISP-3 para uso de acuerdo con la reivindicación 5 o el uso de la reivindicación 6, en el que la lesión es una microlesión o golpe contundente, una fractura condrial, una fractura osteocondrial o lesión de menisco, tendón o ligamento.
- 30 8. El polipéptido WISP-3 para uso de acuerdo con la reivindicación 5 o el uso de la reivindicación 6, en el que se administra dicho polipéptido WISP, o el medicamento es para la administración a un mamífero mediante inyección en dichas células o tejido del cartílago o una articulación del mamífero.
- 35 9. El polipéptido WISP-3 para uso o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho polipéptido WISP es un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en:
 - a) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 34 a 372 de la SEQ ID NO: 9;
 - b) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 1 a 372 de la SEQ ID NO: 9;
 - 40 c) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 16 a 354 de la SEQ ID NO: 8;
 - d) un polipéptido WISP-3 que comprende los aminoácidos 1 a 354 de la SEQ ID NO: 8;
 - e) un polipéptido WISP-3 que tiene al menos un 90 % de identidad con el polipéptido de a), b), c) o d), en el que
45 dicho polipéptido WISP-3 estimula la proliferación o la diferenciación de condriocitos; y
 - f) un fragmento biológicamente activo del polipéptido de a), b), c) o d), en el que dicho fragmento biológicamente activo estimula la proliferación o la diferenciación de condriocitos.
- 50 10. El polipéptido WISP-3 para uso o el uso de la reivindicación 9, en el que dicho polipéptido WISP-3 comprende los aminoácidos 34 a 372 de la SEQ ID NO: 9.
11. El polipéptido WISP-3 para uso o el uso de la reivindicación 9, en el que dicho polipéptido WISP-3
55 comprende los aminoácidos 16 a 354 de la SEQ ID NO: 8.
12. El polipéptido WISP-3 para el uso o el uso de la reivindicación 9, en el que dicho polipéptido WISP-3 está unido a una o más moléculas de polietilenglicol, o a un epítipo etiqueta o a una molécula de inmunoglobulina.
13. El polipéptido WISP-3 para el uso o el uso de la reivindicación 9, en el que el polipéptido WISP-3 se
60 pone en contacto, o el medicamento es para poner en contacto, con células o tejido de cartílago de mamífero *in vivo* o en cultivo antes del trasplante en un mamífero.
14. El polipéptido WISP-3 para el uso o el uso de la reivindicación 9, en el que el polipéptido WISP-3 está comprendido en una composición que comprende además, o el medicamento comprende además, un vehículo

farmacéuticamente aceptable.

- 5 15. Un artículo de fabricación que comprende (a) un recipiente que mantiene una composición que es eficaz para el tratamiento de un trastorno cartilaginoso tal como se define en la reivindicación 1 o 5, en el que la composición comprende una cantidad eficaz de polipéptido WISP-3, y (b) instrucciones para usar dicho polipéptido WISP para tratar un trastorno cartilaginoso tal como se define en la reivindicación 1 o 5.

Unión celular con WISP-1



FIG. 1A

Hs 597.Sk (*fibroblastos de piel humana normal*)
 Hs 839.T (*fibroblastos de melanoma de piel humana*)
 Hs 908.Sk (*fibroblastos de melanoma de piel humana*)
 NRK (*fibroblastos de riñón de rata normal*)



FIG. 1B

RAG (*Adenocarcinoma de riñón de rata*)
 COLO 320 DM 293 (*Adenocarcinoma de colon humano*)
 HUVEC (*células epiteliales de riñón humano*)
 WM-266-4 (*células endoteliales de la vena umbilical humana*)
 WM-266-4 (*células epiteliales de melanoma de piel humana*)



FIG. 1C

Control negativo

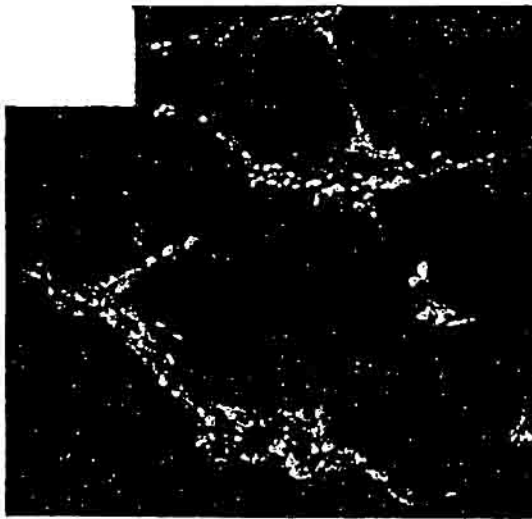


FIG. 1D

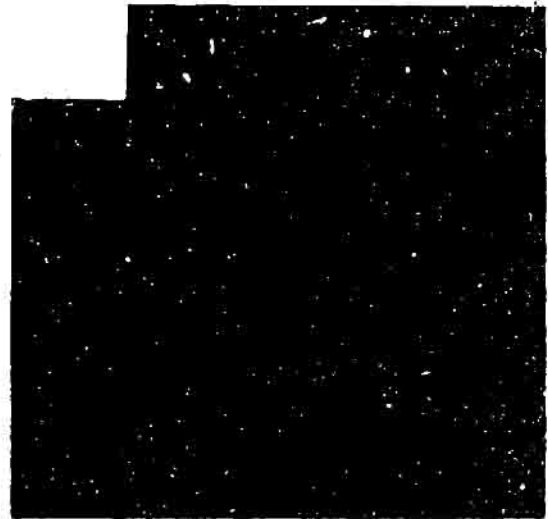


FIG. 1E

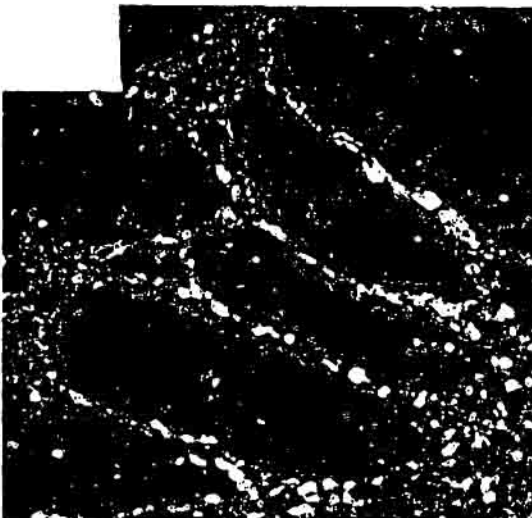


FIG. 1F

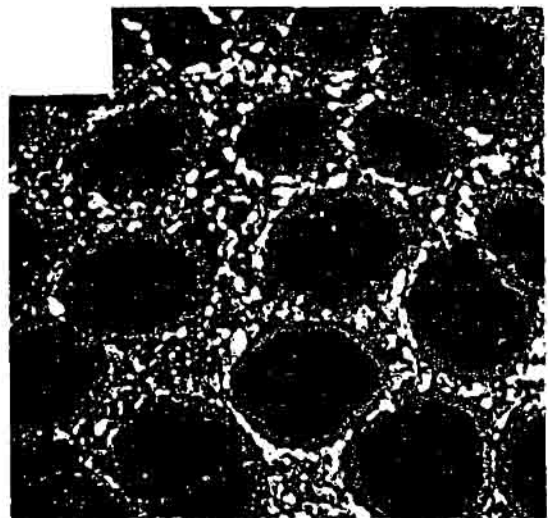


FIG. 1G

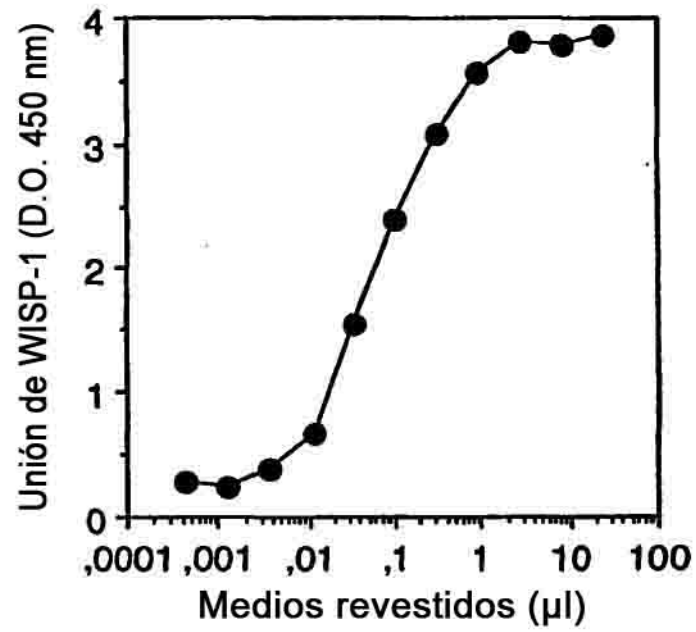


FIG. 2A

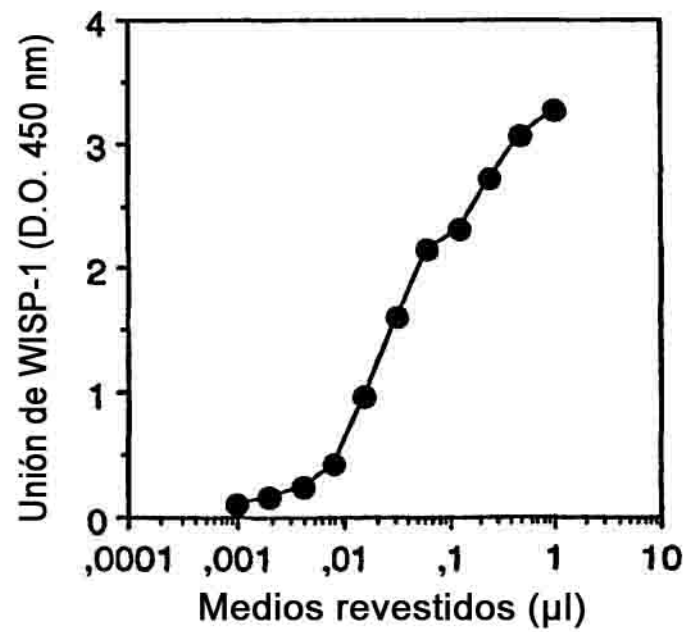


FIG. 2B

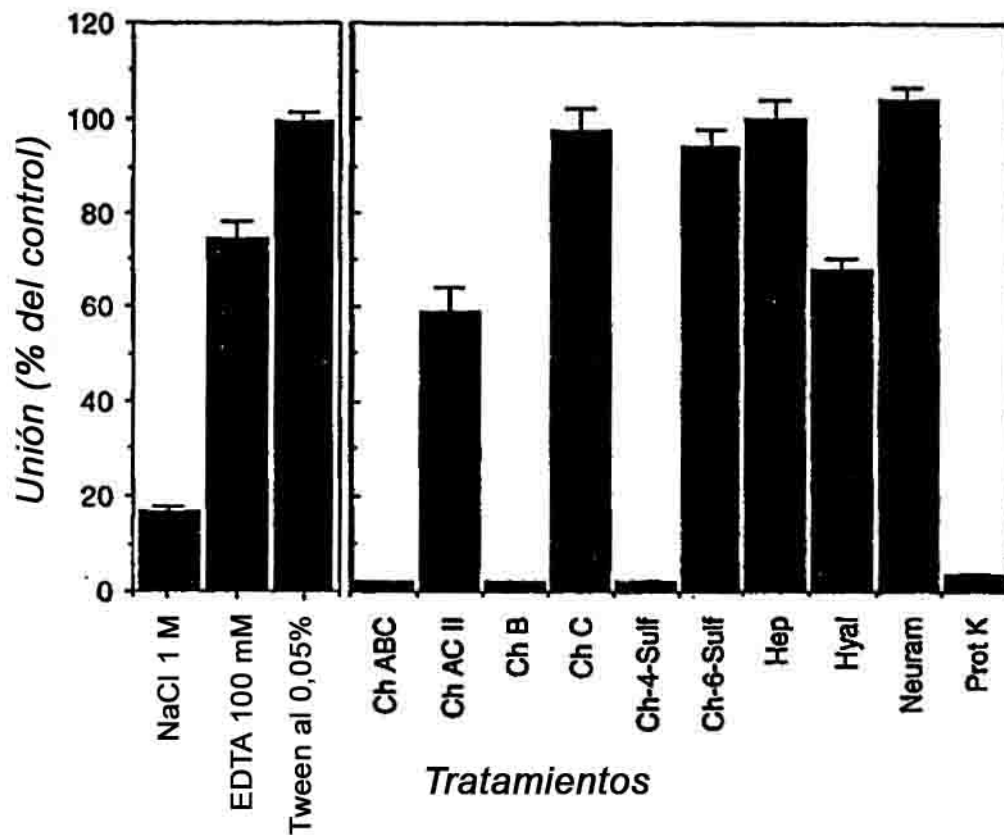


FIG. 3A

FIG. 3B

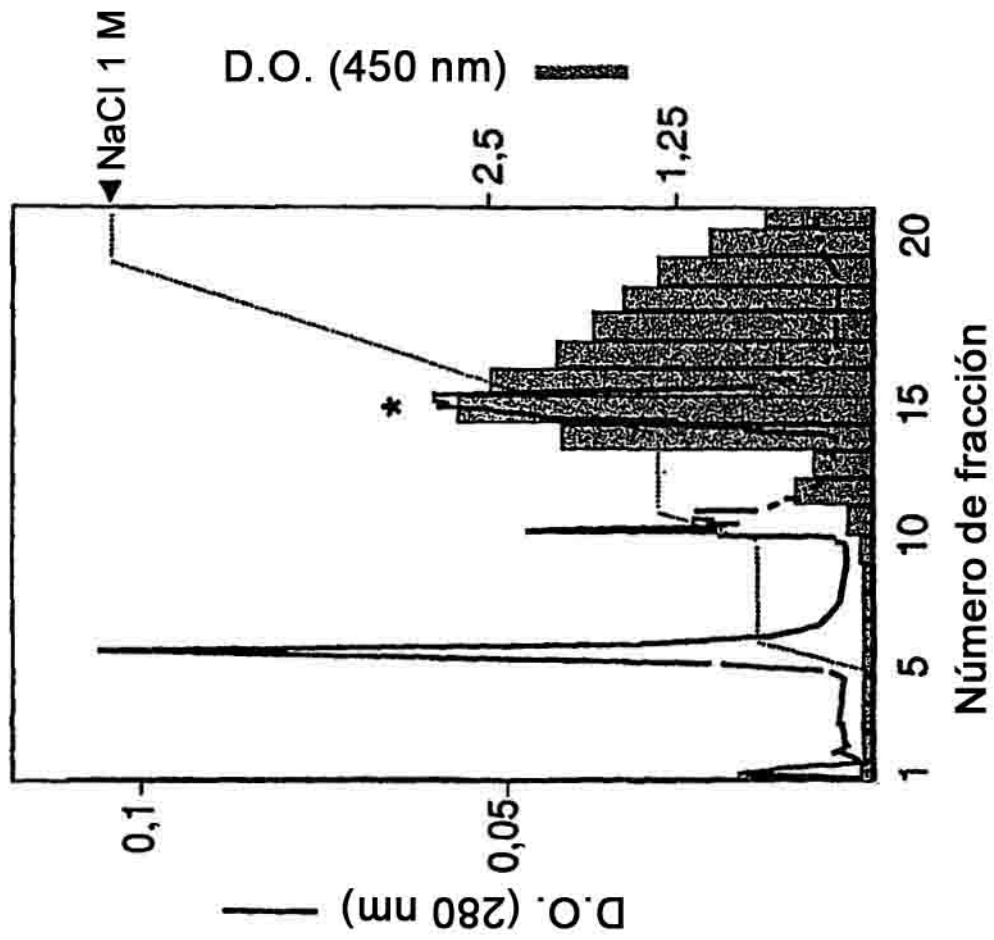


FIG. 4A

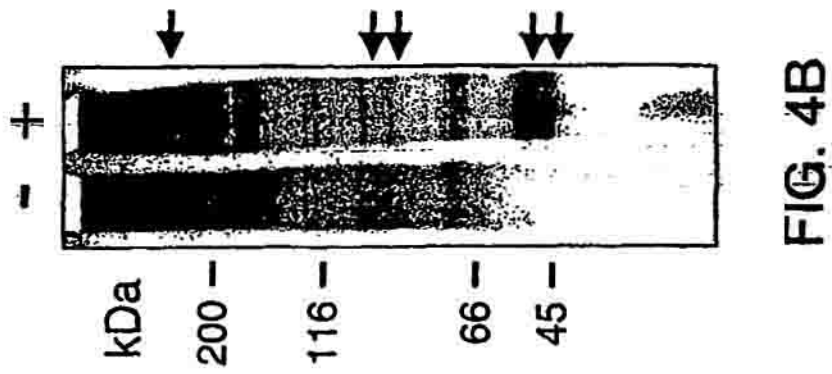


FIG. 4B

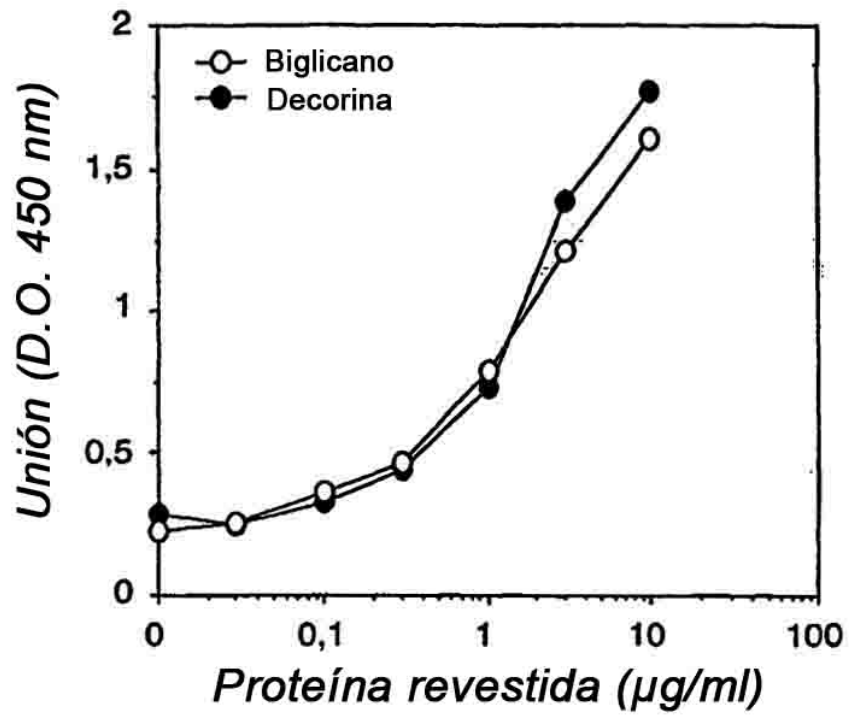


FIG. 5A

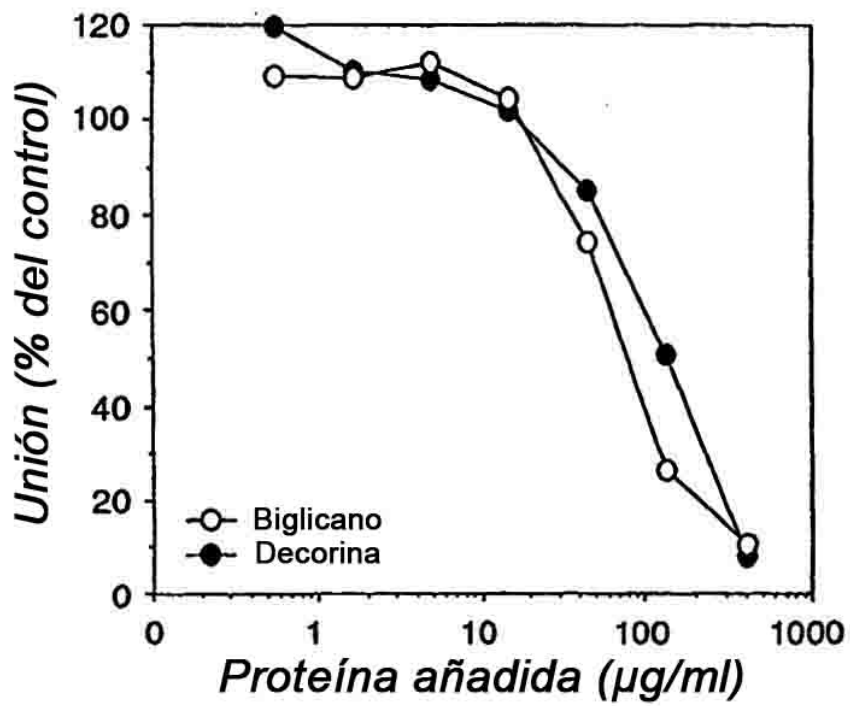


FIG. 5B

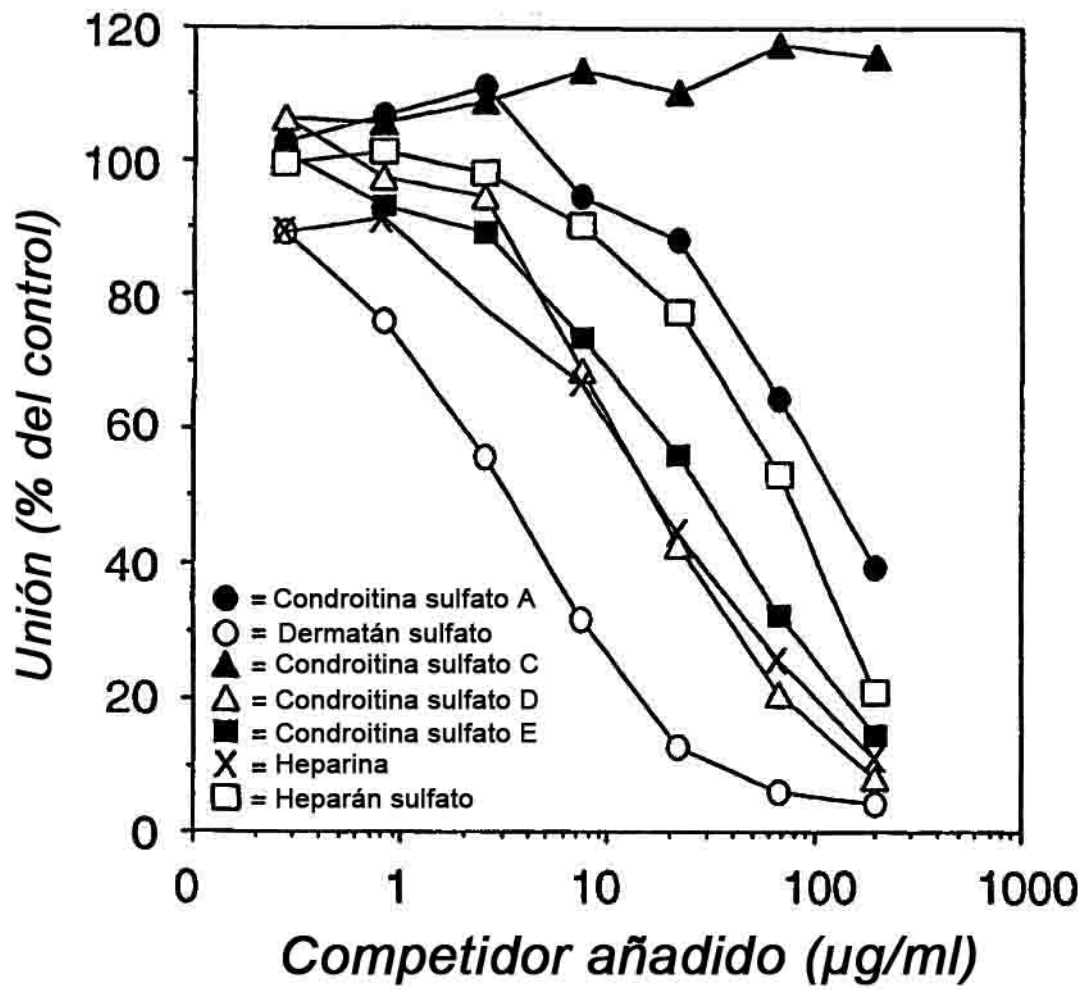


FIG. 6

FIG. 7A



FIG. 7B



FIG. 7C

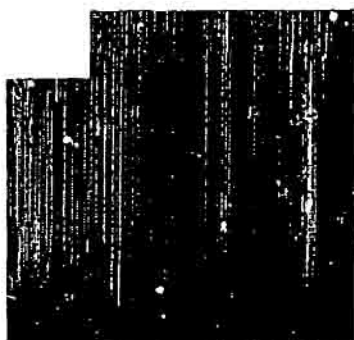


FIG. 7D

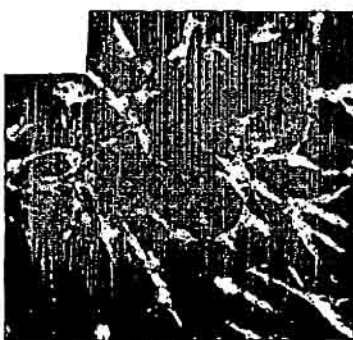


FIG. 7E



FIG. 7F

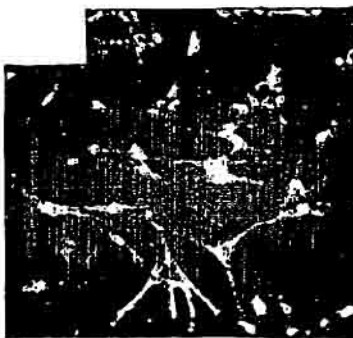


FIG. 7G

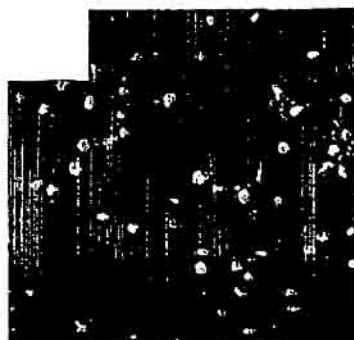


FIG. 7H



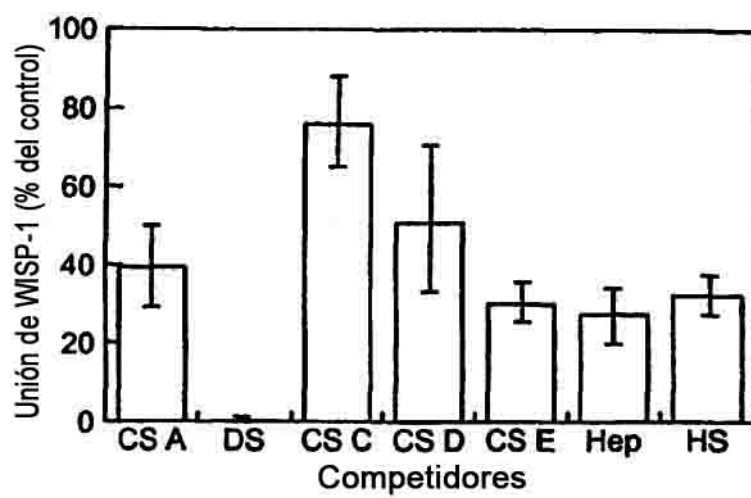


FIG. 7I

FIG. 8A



FIG. 8B

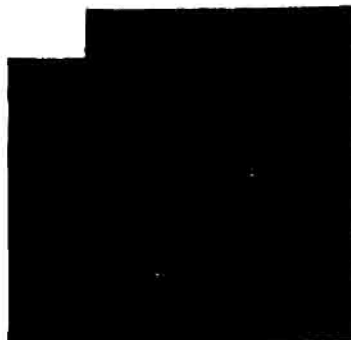


FIG. 8C

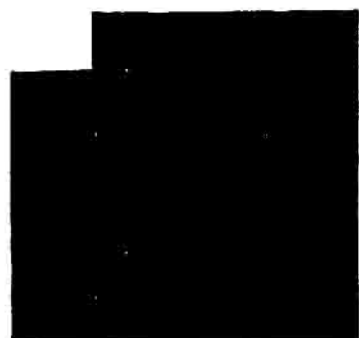


FIG. 8D



FIG. 8E



FIG. 8F



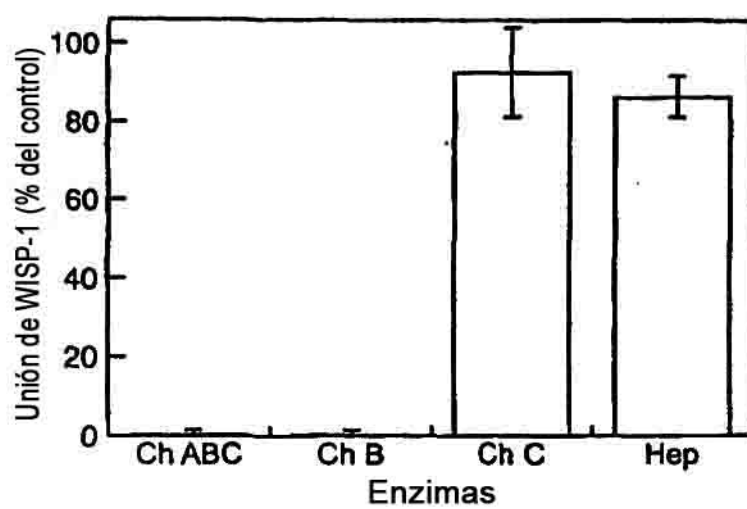


FIG. 8G

FIG. 9A



FIG. 9B



FIG. 9C



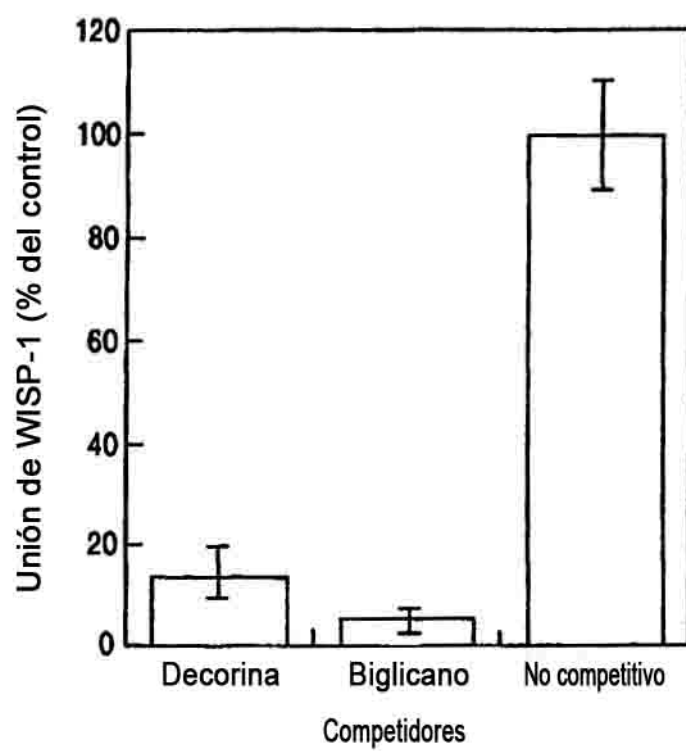


FIG. 9D

La adhesión de células CHO a WISP-1 está mediada por su proteoglicano

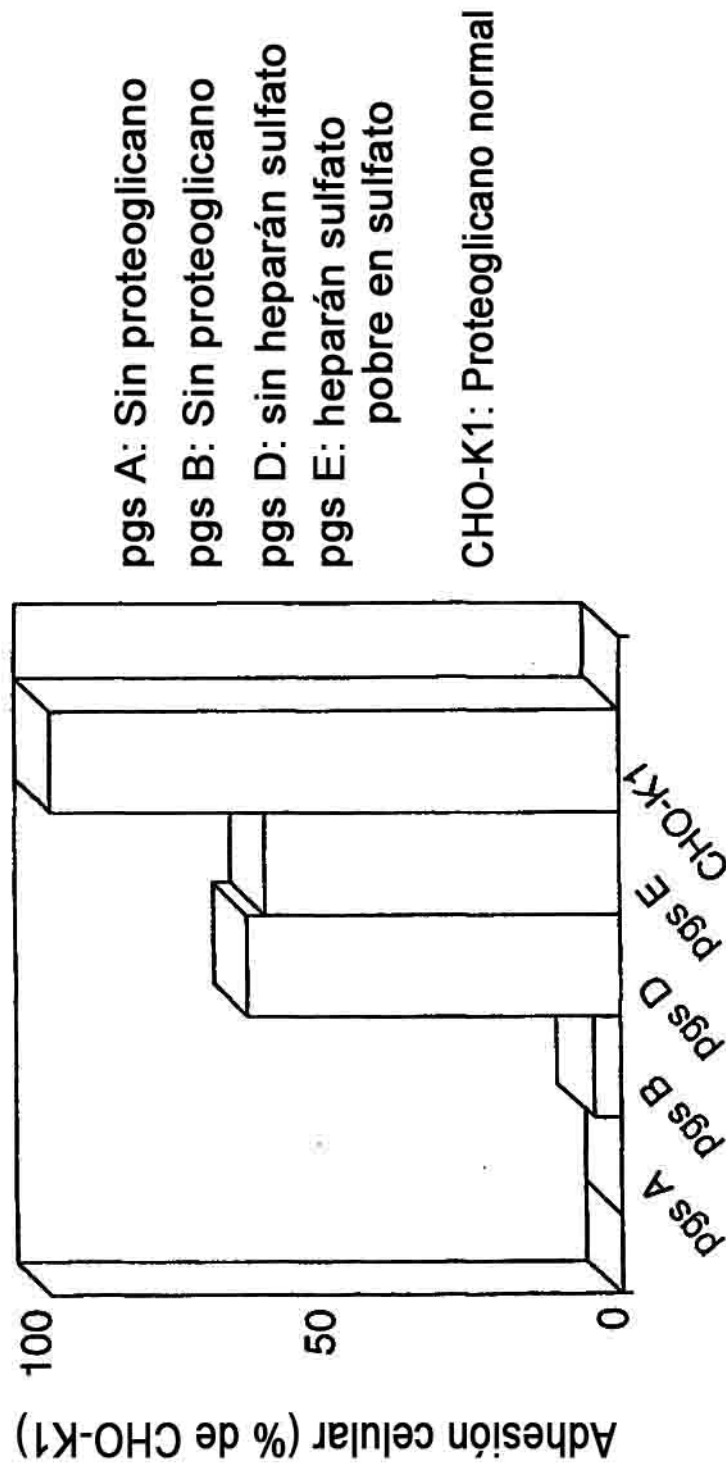


FIG. 10

La adhesión de los fibroblastos mediada por WISP-1 está inhibida por la condroitina sulfato B

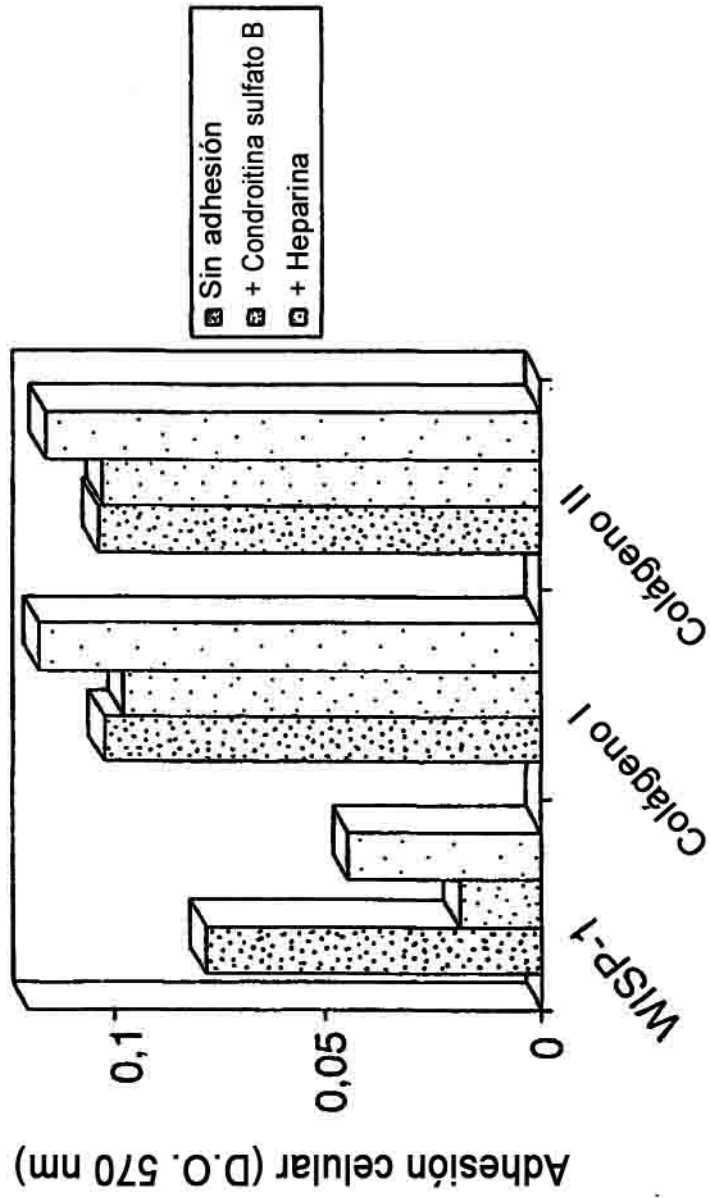


FIG. 11

WISP-1 induce la diferenciación de los condriocitos

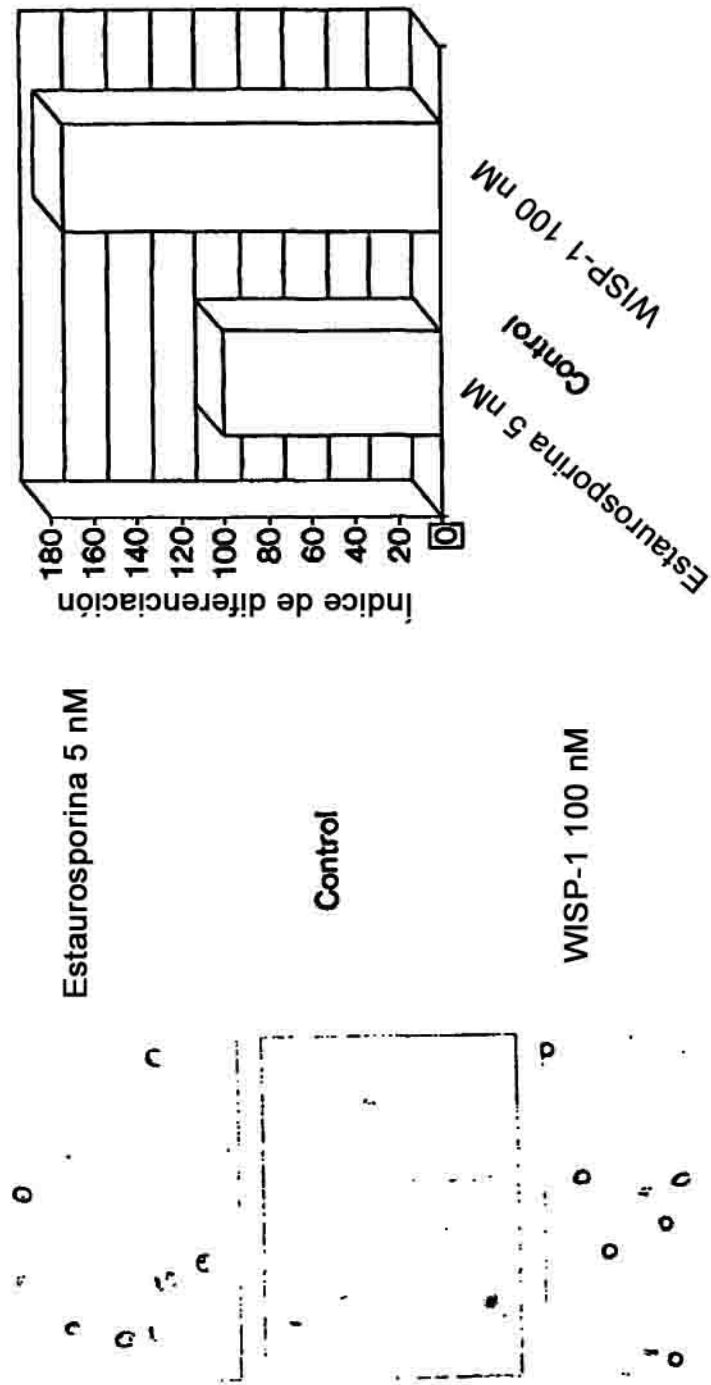


FIG. 12

Los WISP son factores de diferenciación de los condriocitos

Tinción del colágeno II

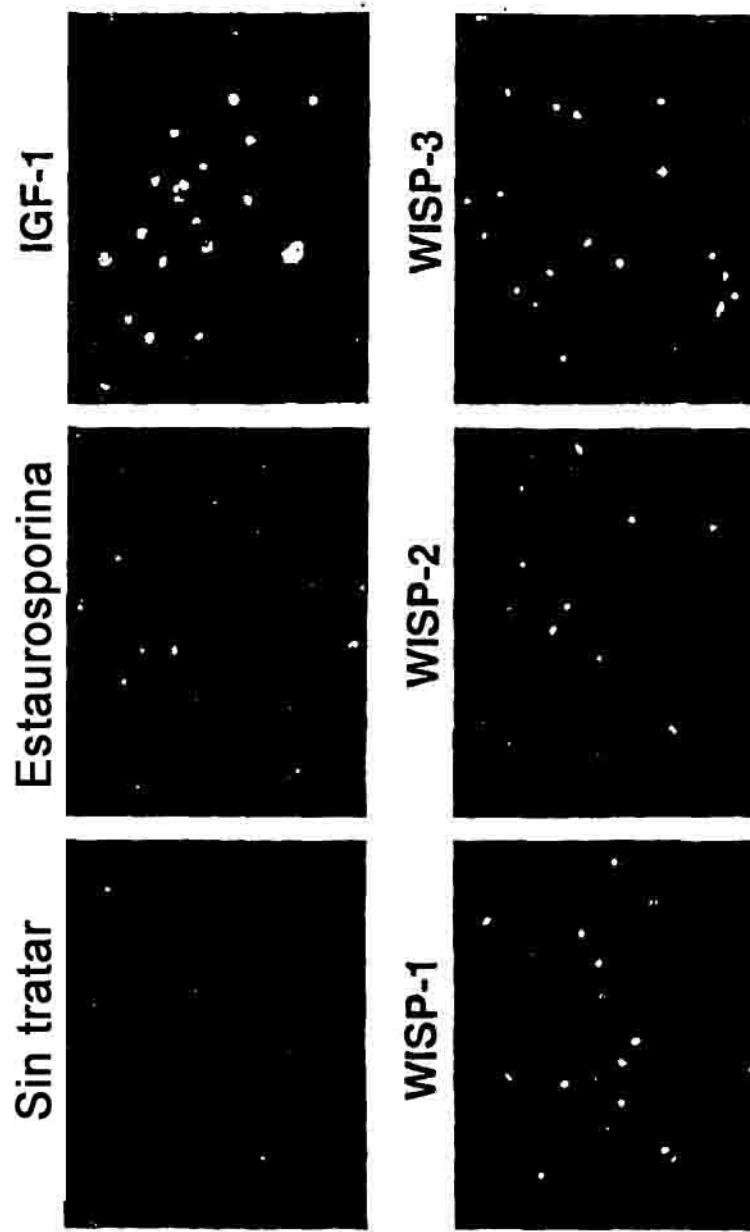


FIG. 13

WISP3 disminuye la rotura de la matriz del cartílago

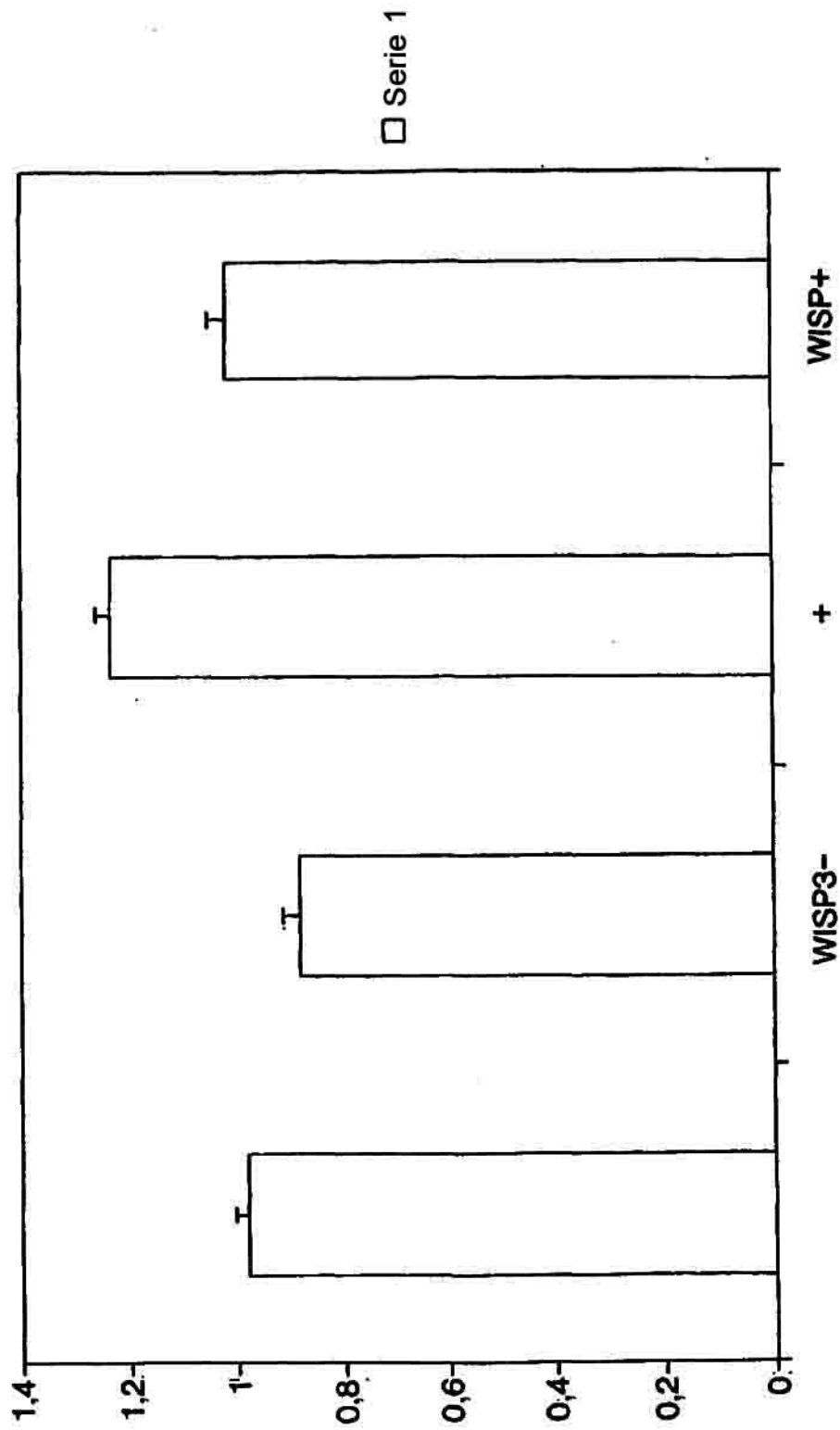


FIG. 14

WISP1 inhibe la rotura de la matriz del cartílago

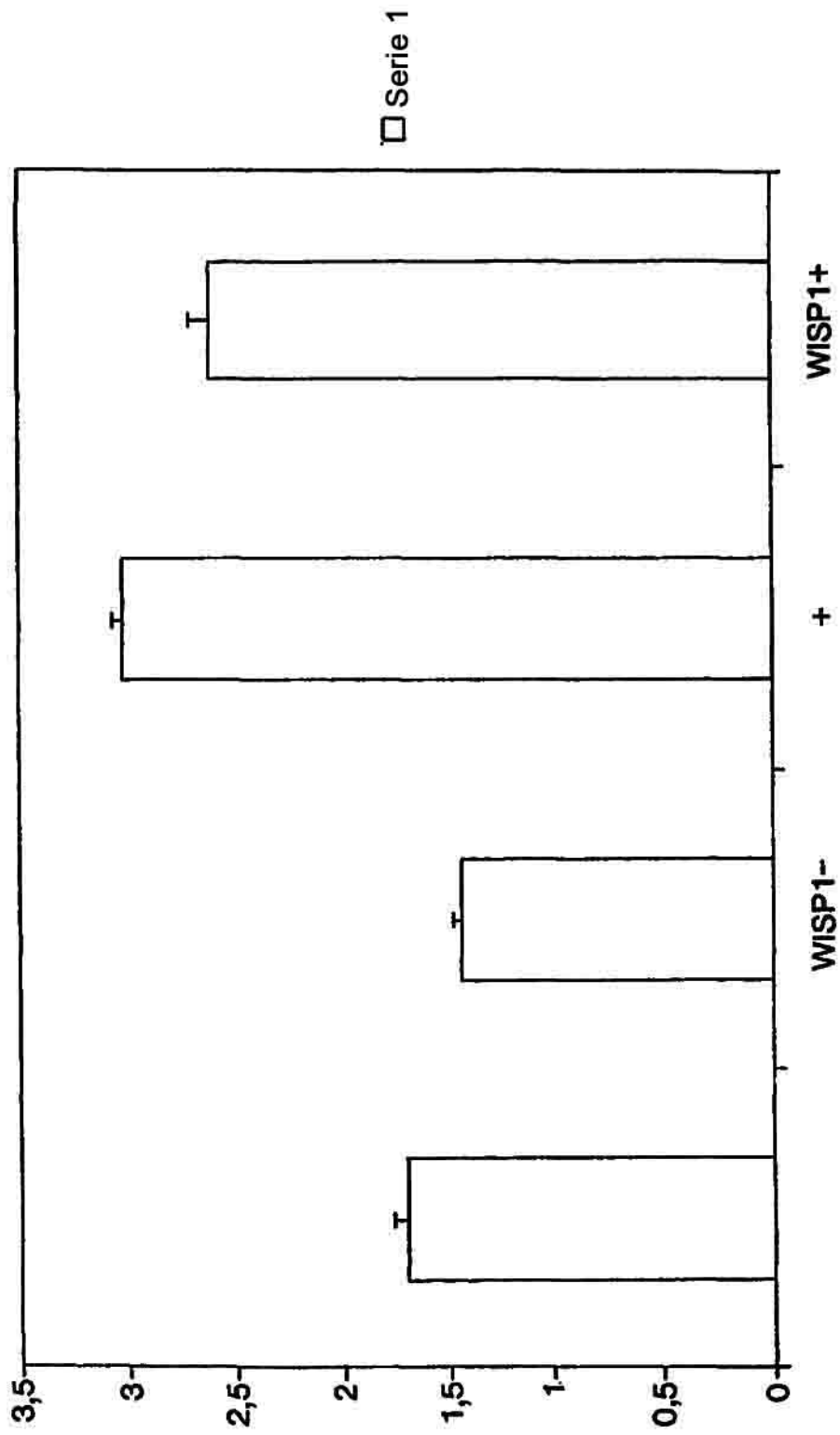


FIG. 15A

WISP1 inhibe la producción de óxido nítrico

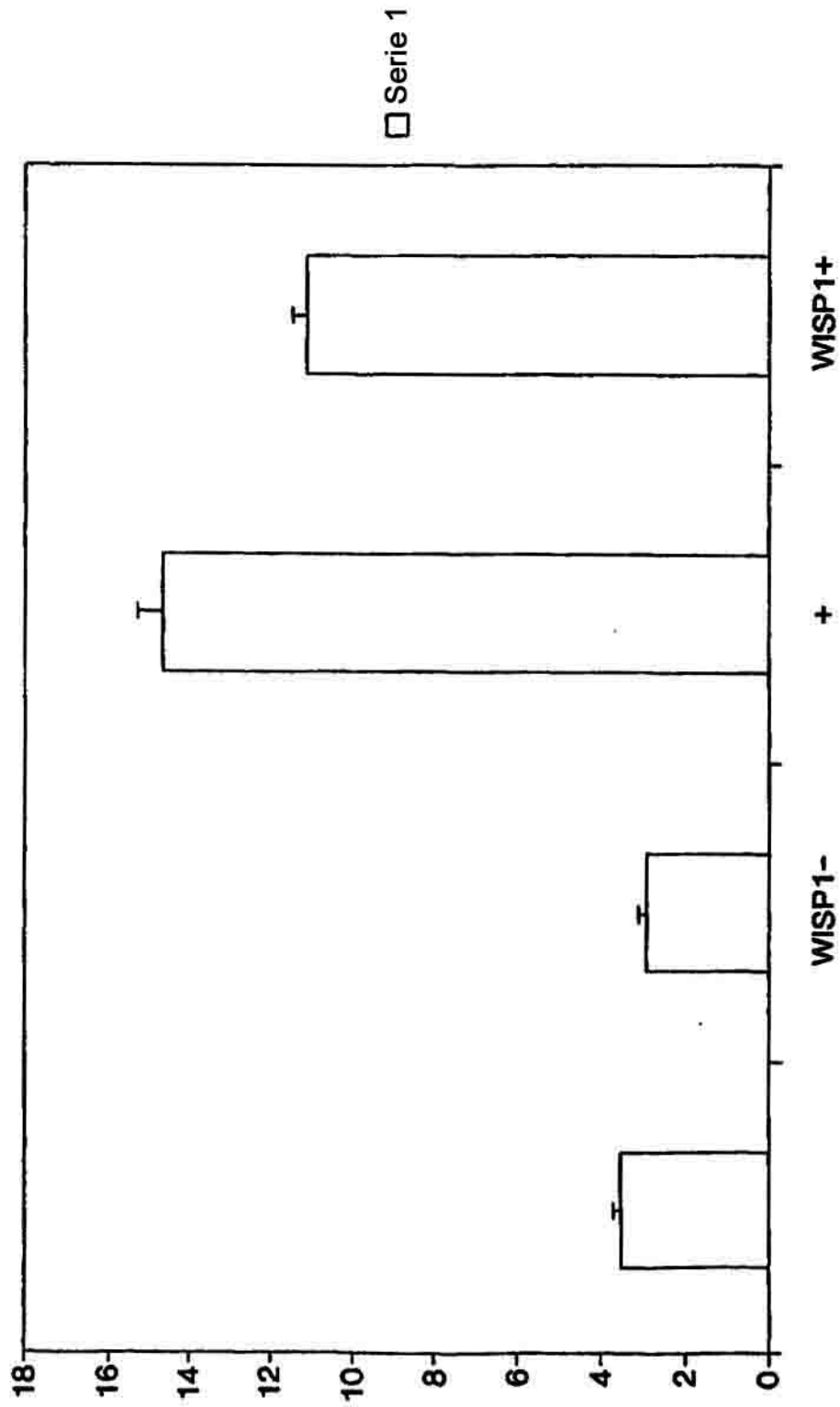


FIG. 15B

Los WISP2 transgénicos tienen cambios condrioplásticos en los huesos largos

500,0 μm



Transgénico N1 n° 7097

500,0 μm



Natural N1 n° 7100

FIG. 16

WISP-1 Sequences**Secuencias de construcciones****PIN 414****DNA 43059****HUMAN WISP-1-IgG**

SEQ ID 1 {
 MRWFLPWTAAVTA AAAASTVLATALSPAPTTMDFTPAPLEDTSSRPQFCKWPCECPPSP
 RCPLGVSLITDGCECKMCAQQLGDNCTEAAICDPHRGLYCDYSGDRPRYAIGVCAQVVG
 VGCVLGDGVRYNNGQSFQPNCKYNCTCIDGAVGCTPLCLRVRPRLWCPHPRRVSIPGHCC
 EQWVCEDDAKRPRKTAPRDTGAFDAVGEVEAWHRNCIAYTSPWSPCSTSCGLGVSTRISN
 VNAQCWPEQESRLCNLRPCDVDIHTLIKAGKKCLAVYQPEASMNFTLAGCISTRSYQPKY
 CGVCMNDNRCCIPYKSKTIDVSFQCPDGLGFSRQVLWINACFCNLSCRNPNDIFADLESYP
 DFSEIANPDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

MOUSE WISP-1-IgG

SEQ ID 2 {
 MRWLLPWTAAVAVLRVGNILATALSPTPTMTFTAPLEETTRPEFCKWPCECPQSP
 RCPLGVSLITDGCECKICAQQLGDNCTEAAICDPHRGLYCDYSGDRPRYAIGVCAQVVG
 VGCVLGDGVRYTNGESFQPNCRYNCTCIDGTGCTPLCLSPRPPRLWCRQPRHVRVPGQCC
 EQWVCDDDDARRPRQTALLDTRAFAASGAVEQRYENCIAYTSPWSPCSTTCGLGISTRISN
 VNARCWPEQESRLCNLRPCDVDIQLHIKAGKKCLAVYQPEEATNFTLAGCVSTRTYRPKY
 CGVCTDNRRCCIPYKSKTISVDFQCPEGPGFSRQVLWINACFCNLSCRNPNDIFADLESYP
 DFEEIANPDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencias "naturales"**HUMAN WISP-1**

SEQ ID 3 {
 MRWFLPWTAAVTA AAAASTVLATALSPAPTTMDFTPAPLEDTSSRPQFCKWPCECPPSP
 RCPLGVSLITDGCECKMCAQQLGDNCTEAAICDPHRGLYCDYSGDRPRYAIGVCAQVVG
 VGCVLGDGVRYNNGQSFQPNCKYNCTCIDGAVGCTPLCLRVRPRLWCPHPRRVSIPGHCC
 EQWVCEDDAKRPRKTAPRDTGAFDAVGEVEAWHRNCIAYTSPWSPCSTSCGLGVSTRISN
 VNAQCWPEQESRLCNLRPCDVDIHTLIKAGKKCLAVYQPEASMNFTLAGCISTRSYQPKY
 CGVCMNDNRCCIPYKSKTIDVSFQCPDGLGFSRQVLWINACFCNLSCRNPNDIFADLESYP
 DFSEIAN

MOUSE WISP-1

SEQ ID 4 {
 MRWLLPWTAAVAVLRVGNILATALSPTPTMTFTAPLEETTRPEFCKWPCECPQSP
 RCPLGVSLITDGCECKICAQQLGDNCTEAAICDPHRGLYCDYSGDRPRYAIGVCAQVVG
 VGCVLGDGVRYTNGESFQPNCRYNCTCIDGTGCTPLCLSPRPPRLWCRQPRHVRVPGQCC
 EQWVCDDDDARRPRQTALLDTRAFAASGAVEQRYENCIAYTSPWSPCSTTCGLGISTRISN
 VNARCWPEQESRLCNLRPCDVDIQLHIKAGKKCLAVYQPEEATNFTLAGCVSTRTYRPKY
 CGVCTDNRRCCIPYKSKTISVDFQCPEGPGFSRQVLWINACFCNLSCRNPNDIFADLESYP
 DFEEIAN

HUMAN IgG tag

SEQ ID 5 {
 PDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 17

WISP-3 IgG
 ></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.full/ss.DNA59535
 ><subunit 1 of 1, 600 aa, 1 stop
 ><MW: 67062, pI: 8.82, NX(S/T): 3

SEQ ID 6 { MNKRRLLYPSGWLHGSPDMQGLLFSTLLLAGLAQFCCRVQGTGPLDTPPEGRPGEVSDAP
 QRKQFCHWPCCKPQQKPRCPGVS LVRDGCCKICAKQGEICNEADLCDPHKGLYCDY
 SVDRPRYETGVCAYLVAVGCEFNQVHYHNGQVFQPNPLFSCLCVSGAIGCTPLFIPKLAG
 SHCSGAKGGKSDQSNCSLEPLLQQLSTSYKTM PAYRDLPLIWKKCLVQATKWTPCSRT
 CGMGISNRVTNENSNCCEMRKEKRLCYIQPCDSNILKTIKIPKGKTCQPTFQLSKAEKFVF
 SGCSSTQSYKPTFCGICLDKRCCIPNKS KMITIQFDCPNEG SFKWMLWITSCVCQRNCR
 EPGDIFSELKILPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

alternate WISP3-IgG
 ></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.full/ss.DNA59533
 ><subunit 1 of 1, 582 aa, 1 stop
 ><MW: 64952, pI: 8.79, NX(S/T): 3

SEQ ID 7 { MQGLLFSTLLLAGLAQFCCRVQGTGPLDTPPEGRPGEVSDAPQRKQFCHWPCCKPQQKPR
 CPPGVSLVRDGCCKICAKQGEICNEADLCDPHKGLYCDYSVDRPRYETGVCAYLVAV
 GCEFNQVHYHNGQVFQPNPLFSCLCVSGAIGCTPLFIPKLAGSHCSGAKGGKSDQSNCS
 LEPLLQQLSTSYKTM PAYRNLPLIWKKCLVQATKWTPCSRTCGMGISNRVTNENSNCCEM
 RKEKRLCYIQPCDSNILKTIKIPKGKTCQPTFQLSKAEKFVFSGCSSTQSYKPTFCGICL
 DKRCCIPNKS KMITIQFDCPNEG SFKWMLWITSCVCQRNCREPGDIFSELKILPDKTHT
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

WISP3
 ></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.full/ss.DNA58800
 ><subunit 1 of 1, 354 aa, 1 stop
 ><MW: 39293, pI: 8.93, NX(S/T): 2

SEQ ID 8 { MQGLLFSTLLLAGLAQFCCRVQGTGPLDTPPEGRPGEVSDAPQRKQFCHWPCCKPQQKPR
 CPPGVSLVRDGCCKICAKQGEICNEADLCDPHKGLYCDYSVDRPRYETGVCAYLVAV
 GCEFNQVHYHNGQVFQPNPLFSCLCVSGAIGCTPLFIPKLAGSHCSGAKGGKSDQSNCS
 LEPLLQQLSTSYKTM PAYRNLPLIWKKCLVQATKWTPCSRTCGMGISNRVTNENSNCCEM
 RKEKRLCYIQPCDSNILKTIKIPKGKTCQPTFQLSKAEKFVFSGCSSTQSYKPTFCGICL
 DKRCCIPNKS KMITIQFDCPNEG SFKWMLWITSCVCQRNCREPGDIFSELKIL

WISP3 "long 5' splicing"
 ></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.full/ss.DNA56350
 ><subunit 1 of 1, 372 aa, 1 stop
 ><MW: 41403, pI: 8.96, NX(S/T): 2

SEQ ID 9 { MNKRRLLYPSGWLHGSPDMQGLLFSTLLLAGLAQFCCRVQGTGPLDTPPEGRPGEVSDAP
 QRKQFCHWPCCKPQQKPRCPGVS LVRDGCCKICAKQGEICNEADLCDPHKGLYCDY
 SVDRPRYETGVCAYLVAVGCEFNQVHYHNGQVFQPNPLFSCLCVSGAIGCTPLFIPKLAG
 SHCSGAKGGKSDQSNCSLEPLLQQLSTSYKTM PAYRDLPLIWKKCLVQATKWTPCSRT
 CGMGISNRVTNENSNCCEMRKEKRLCYIQPCDSNILKTIKIPKGKTCQPTFQLSKAEKFVF
 SGCSSTQSYKPTFCGICLDKRCCIPNKS KMITIQFDCPNEG SFKWMLWITSCVCQRNCR
 EPGDIFSELKIL

FIG. 18

1 M R G T P K T H L L A F S L L C L L S K V R T Q L C P

28 T P C T C P W P P P R C P L G V P L V L D G C G C C R V C A R R L

61 G E P C D Q L H V C D A S Q G L V C Q P G A G P G G R G A L C L L

94 A E D D S S C E V N G R L Y R E G E T F Q P H C S I R C R C E D G G

128 F T C V P L C S E D V R L P S W D C P H P R R V E V L G K C C P E

161 W V C G Q G G L G T Q P L P A Q G P Q F S G L V S S L P P G V P

194 C P E W S T A W G P C S T T C G L G M A T R V S N Q N R F C R L E T

228 Q R R L C L S R P C P P S R G R S P Q N S A F O

FIG. 19