

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 883**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2009 E 09703915 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2239324**

54 Título: **Célula transformada por el gen WNT3A humano**

30 Prioridad:

21.01.2008 JP 2008010823

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.10.2013

73 Titular/es:

**SHISEIDO COMPANY, LTD. (100.0%)
5-5 GINZA 7-CHOME CHUO-KU
TOKYO 104-8010, JP**

72 Inventor/es:

**ISHIMATSU, YUMIKO;
IRIYAMA, SHUNSUKE;
FUJIWARA, SHIGEYOSHI;
SOMA, TSUTOMU y
KISHIMOTO, JIRO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 425 883 T3

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

DESCRIPCIÓN

Célula transformada por el gen WNT3A humano

Campo técnico

5 La presente invención proporciona una célula transformada con un vector que contiene el gen de la proteína Wnt3a humana que presenta una elevada eficacia de expresión de la proteína Wnt3a humana.

Antecedentes de la técnica

10 La proteína Wnt es una glicoproteína secretora que tiene un peso molecular de aproximadamente 40.000 y que es conocida por ser una importante molécula de señalización intercelular para la morfogénesis embrionaria y la regeneración del folículo piloso, y está implicada en la diferenciación y el mantenimiento funcional de los melanocitos. Se conocen casi 20 tipos de Wnt de vertebrado, estas Wnt forman subfamilias, y cada una se une a un receptor de siete dominios transmembranales conocido como Frizzled y a unos receptores de un solo dominio transmembranal conocidos como LRP de la membrana celular. Basándose en estudios sobre trasplantes en ratones, se ha demostrado claramente que Wnt3a, que es un miembro de la familia de Wnt, mantiene la actividad de la papila pilosa en cuanto a la inducción de la formación de folículos pilosos al actuar sobre células de la papila pilosa [J. Kishimoto et al., Genes & Dev., 15 de mayo de 2000, 14 (10), 1181-5], y, recientemente, se ha centrado una considerable atención en su relación con la inducción de folículos pilosos. Se está llevando a cabo una investigación sobre la proteína Wnt3a recombinante aviar o de ratón, producida por Wnt3a aviar o por células aviares transformadas con el gen Wnt3a de ratón, dejando que esta proteína recombinante actúe sobre células de papila pilosa de ratón.

20 Cuando se tiene en cuenta un uso en estudios clínicos aplicables a seres humanos, es necesario preparar grandes cantidades de proteína recombinante Wnt3a humana en lugar de proteína humana o de ratón. Sin embargo, la Wnt3a humana recombinante presenta el problema de que es difícil producir una proteína que conserve una actividad adecuada, probablemente a causa de problemas en la traducción y la modificación después de la transcripción. Por lo tanto, la selección de células huésped para uso en la producción eficaz de una proteína recombinante Wnt3a humana que conserve la actividad de inducción de folículos pilosos es un factor importante para elucidar los mecanismos de la formación y regeneración de folículos pilosos, así como para explorar y evaluar fármacos que induzcan y aceleren la formación y regeneración de folículos pilosos.

Documento 1 que no es Patente: Genes & Dev., 15 de mayo de 2000, 14 (10), 1181-5.

Descripción de la invención

30 Problemas a resolver por la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una célula capaz de expresar eficazmente una proteína recombinante Wnt3a humana que tenga una actividad que induzca la formación de folículos pilosos por células de papilas pilosas.

Medios para resolver los problemas

35 Como resultado de la realización de vastos estudios, los inventores de la presente invención hallaron que células procedentes de folículos pilosos y células procedentes de cáncer de próstata son óptimas como huéspedes para la expresión eficaz de una proteína recombinante Wnt3a humana que conserve la actividad, lo que condujo a la compleción de la presente invención.

Por lo tanto, la presente solicitud incluye las invenciones siguientes:

40 (1) una célula transformada con un vector que contiene el gen Wnt3a humano, en donde la célula es seleccionada de un grupo que consiste en células procedentes de folículos pilosos y células procedentes de cáncer de próstata, en donde las células procedentes de folículos pilosos son células IORS o IDP, y en donde las células procedentes de cáncer de próstata son células PC3; y

(2) la célula de (1), en donde el vector es un vector pTarget.

45 Efectos de la invención

De acuerdo con la presente invención, se puede expresar eficazmente una proteína recombinante Wnt3a humana que tenga una actividad que induzca la formación de folículos pilosos por células de papilas pilosas y se espera que se lleve eficazmente a cabo la elucidación de los mecanismos de la formación y regeneración de folículos pilosos, así como la evaluación de fármacos eficaces para la regeneración de folículos pilosos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica Wnt3a.

La Figura 2 muestra una transferencia Western de células que contienen Wnt3a.

La Figura 3 muestra la confirmación de la expresión funcional de Wnt3a introducida por expresión acelerada de Lef-1.

5 Mejor modo de llevar la invención a cabo

La Wnt3a humana es una proteína compuesta de 352 restos de aminoácido y, en la ID. SEC. nº 1 y la Figura 1, se muestra la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica esta proteína. Se puede producir un vector de expresión que contenga el gen Wnt3a uniendo el gen Wnt3a a un vector por medio de un sitio de restricción adecuado que se va a poner bajo el control de un promotor adecuado del vector usando un método conocido. No hay limitaciones
10 particulares al tipo de vector y se pueden utilizar todos los tipos de vectores comercialmente asequibles, incluyendo vectores de expresión de células animales comercialmente disponibles tales como el vector pTarget (Promega), el vector pBK-CMV o el vector pBK-RSV (Stratagene). Es particularmente preferible el vector pTarget.

No hay limitaciones particulares a un promotor preferible utilizado en la presente invención con tal de que sea un promotor adecuado que corresponda al huésped usado para que se exprese el gen, ejemplos del cual incluyen el
15 promotor de CMV, el promotor de SR α , el promotor de SV40, el promotor de LTR, el promotor de HSV-TK y el promotor de β -actina.

Además, en el vector de expresión también pueden estar contenidos, según se desee, un potenciador, una señal de corte y empalme, una señal de adición de poli(A), un marcador de selección o un origen de replicación de SV40 y similares.

20 Como células huésped se utilizan células procedentes de folículos pilosos, tales como células inmortalizadas de vaina radicular externa (IORS; del inglés, *immortalized outer root sheath*) humanas o células inmortalizadas de papila dérmica (IDP; del inglés, *immortalized dermal papilla*) humanas, o células procedentes de cáncer de próstata humano (PC3). Son particularmente preferibles las células IORS.

25 Para obtener células humanas de vaina radicular externa, se obtiene cuero cabelludo humano como un subproducto de, por ejemplo, procedimientos de cirugía plástica o procedimientos de cirugía, y se obtiene tejido de folículo piloso del cuero cabelludo bajo un microscopio estereoscópico. A continuación, después del tratamiento del tejido de folículo piloso con una disolución de hidrolasa, tal como una disolución mixta de colagenasa y dispasa, durante 30 minutos a 37 °C, se deja reposar el tejido en una placa de cultivo revestida con colágeno, lo que va seguido de un cultivo en un medio exento de suero y de bajo contenido en calcio, tal como K-GM (Clonetics) o Keratinocyte-SFM
30 (Gibco BRL), y de sustitución del medio cada 2 semanas. Una vez que se ha confirmado que las células han proliferado, se liberan las células adheridas al recipiente de cultivo y se recuperan por centrifugación, lo que va seguido de un subcultivo en medio exento de suero.

35 Las células humanas de papila dérmica se obtienen también de la misma manera que las células de vaina radicular externa a partir de cuero cabelludo humano obtenido como subproducto de procedimientos de cirugía plástica y procedimientos de cirugía, bajo un microscopio estereoscópico. A continuación, se cultivan las papilas pilosas en un medio de cultivo ordinario para células animales, tal como Dulbecco's Modified Eagle Medium que contiene suero de ternera fetal, y se sustituye el medio cada 2 días. Una vez que se ha confirmado que las células han proliferado, se liberan las células adheridas al recipiente de cultivo y se recuperan por centrifugación, lo que va seguido de un subcultivo en medio exento de suero.

40 La inmortalización de células humanas de vaina radicular externa o células humanas de papila dérmica obtenidas de esta manera puede ser llevada a cabo mediante métodos conocidos. Preferiblemente, se puede utilizar el gen del antígeno T grande del virus SV40, deficiente en cuanto a un origen de replicación, como se describe en la Publicación Japonesa de Patente no Examinada nº 2000-89. Este gen se utiliza normalmente en un estado que se introduce en un vector de plásmido o virus. Este gen se utiliza ampliamente en la técnica como un gen típico para
45 inmortalizar células animales y se puede adquirir fácilmente. Por ejemplo, en Doren et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1653-1656 (1984), se describe un virus en que la región E1A del vector adenovírico, Δ E1/X [Doren et al., *J. Virol.*, Volumen 50, 606-614 (1984)], está sustituida por el antígeno T grande de SV40, virus deficiente en cuanto a un punto de inicio de la replicación. Además, se puede usar el vector retrovírico pZITtsa [W. Filsell et al., *Journal of Cell Science*, volumen 107, 1761-1772 (1994)], que se obtiene al escindir de pLTtsa [M. Rassoulzadegan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, volumen 80, 4354-4358 (1983)], mediante el uso de BglII e HingII, un fragmento de 2491 pares de bases que contiene un gen que codifica el antígeno T grande de poliomavirus sensible a la temperatura (Plttsa), e insertar luego este fragmento en un sitio BamHI del vector retrovírico pZIPNeoSV(X)1 [C. L. Cepko et al., *Cell*, volumen 37, 1053-1062 (1984)]. Además, también se puede usar pSV40ori-, obtenido al clonar DNA viral de SV40, deficiente en cuanto a un origen de replicación, en pBR322, o pSHPV16s [Tissue Cult. Res. Commun., volumen 11, 13-24 (1992)],
50 obtenido al clonar DNA de papilomavirus humano de tipo 16 en el vector pSV2neo.

La línea celular PC3 de cáncer de próstata es una línea celular comercialmente asequible que se puede obtener de, por ejemplo, la American Type Culture Collection (ATCC) o de DS Pharma Biomedical (antiguamente Dainippon Sumitomo Pharma).

- 5 La transformación de células huésped puede ser llevada a cabo mediante un método comúnmente conocido, tal como el método del cloruro cálcico, la coprecipitación con fosfato cálcico, el método de DEAE-dextrano, la lipofección, la fusión de protoplastos con polietileno o la electroporación, y se selecciona un método adecuado de acuerdo con las células huésped que se van a utilizar. Además, también se puede emplear un adecuado kit comercialmente asequible para llevar la transformación a cabo. Los ejemplos de dichos kits incluyen Fugene® (Roche Applied Science), CombiMag (Oz Biosciences) y PolyMag (Oz Biosciences).
- 10 Se cultivan las células huésped transformadas resultantes en un medio de cultivo adecuado, se separan las células del líquido de cultivo por un medio convencional tal como, sin limitación, centrifugación o filtración, y se lisan las células cuando es necesario, se precipita el componente proteico del sobrenadante o del producto de filtración con una sal del tipo sulfato amónico, y se puede recuperar la proteína diana llevando a cabo diversas técnicas cromatográficas, tales como cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad.
- 15 La actividad de Wnt3a en cuanto a la inducción de la formación de folículos pilosos puede ser medida usando, por ejemplo, el factor 1 potenciador de linfocitos (LEF-1; del inglés, lymphocyte enhancer factor 1), que es un factor cuya expresión génica resulta acelerada por la acción de Wnt3a, como un indicador (M. Filali et al., J. Biol. Chem., 277, 33.398-33.410, 2002). La Wnt instruye a las células para que no descompongan la β -catenina (β -CAT), y, como resultado, la β -catenina se une con LEF-1 y proteínas similares para dar lugar a la inducción de la regeneración de folículos pilosos y del crecimiento de pelo. La confirmación de la expresión de LEF-1 puede ser llevada a cabo mediante un método comúnmente conocido, tal como RT-PCR o transferencia Western.
- 20

A continuación se proporciona una explicación más detallada de la presente invención por medio de ejemplos específicos de la misma. Además, la presente invención no está limitada por estos ejemplos.

Ejemplos

- 25 Construcción de plásmidos de Wnt3a y Wnt7a

Se multiplicó la longitud total de Wnt3a humano por PCR usando cDNA sintetizado a partir de RNA total placentario humano comercialmente asequible (Clontech) como molde y utilizando un cebador de cadena sentido, gatggcccactcggata (ID. SEC. nº 2), y un cebador de cadena antisentido, gggtcctactgcaggtgt (ID. SEC. nº 3). Cada producto génico multiplicado por PCR fue purificado con un kit comercialmente asequible (Promega), copulado con un vector pTarget y clonado usando *E. coli*. Una vez identificados los plásmidos que contenían cada gen basándose en un análisis de los patrones de escisión por restrictasas, se determinó la secuencia de nucleótidos de cada gen insertado usando un secuenciador de DNA. En la Figura 1 se muestra la secuencia de nucleótidos del gen que codifica Wnt3a.

30

Transfección de células

- 35 Se sembró cada una de las células mostradas en la Tabla 1 siguiente en una placa de 6 pocillos, en una cantidad de 1 a 3 x 10⁵ células, lo que fue seguido de un cultivo hasta que las células alcanzaron la subconfluencia bajo unas condiciones de 37 °C y CO₂ al 5%. A continuación, se transfectaron las células cultivadas con el construido vector pTarget de Wnt3a o con un testigo usando reactivos para transfección génica comercialmente asequibles [Fugene® (Roche Applied Science), CombiMag (Oz Biosciences) y PolyMag (Oz Biosciences)]. En la Tabla 1 se muestra el reactivo para transfección génica que se usó para cada una de las células. Los reactivos para transfección se utilizaron de acuerdo con el protocolo proporcionado con cada reactivo. Además, se calculó la eficacia de la transferencia génica introduciendo un plásmido en el que estaba copulado el gen Azami Green (Medical & Biological Laboratories) con pTarget, y contando luego el número de células positivas para fluorescencia de Azami Green usando un citómetro de flujo (Beckman Coulter). En la Tabla 1 se muestran el medio, el reactivo para transfección
- 40
- 45

Tabla 1

Nombre de las células	Especie	Origen	Eficacia de la transferencia génica	Reactivo para la transfección génica
IORS	Ser humano	Células inmortalizadas de vaina radicular externa	25	Fugene
hKC	Ser humano	Queratinocitos epidérmicos	8	CombiMag
CEF	Gallina	Fibroblastos fetales	10	PolyMag

Nombre de las células	Especie	Origen	Eficacia de la transferencia génica	Reactivo para la transfección génica
IDP	Ser humano	Células inmortalizadas de papila dérmica	18	PolyMag
HacaT	Ser humano	Queratinocitos inmortalizados	7	PolyMag
Pam212	Ratón	Células epiteliales escamosas	32	PolyMag
PC3	Ser humano	Células de cáncer de próstata	46	Fugene
LNcap	Ser humano	Células de cáncer de próstata	10	PolyMag
hFB	Ser humano	Fibroblastos	17	Fugene
MCF7	Ser humano	Células de cáncer de mama	0,8	Fugene
HeLa	Ser humano	Células de cáncer cervical	0,3	Fugene
mDC	Ratón	Células dérmicas	0,4	Fugene

Como resultado, se halló que el gen Wnt3a se introducía en células IORS, IDP y PC3 con una eficacia comparativamente elevada.

Confirmación de la hiperexpresión de mRNA por Wnt3a según se determina por RT-PCR

5 Se introdujo el construido vector pTarget de Wnt3a o el testigo en células IORS y se extrajo el RNA total 2 días más tarde usando Isogen (Nippon Gene) para sintetizar cDNA. Usando el resultante cDNA de células IORS como molde, se llevó a cabo una reacción PCR sobre Wnt3a humano usando un cebador sentido, caggaaactacgtggagatca (ID. SEC. nº 4), y un cebador antisentido, ccatcccaccaaactcgtg (ID. SEC. nº 5), y se observó hiperexpresión cuando se investigó la expresión de Wnt3a por el plásmido introducido (datos no mostrados).

Confirmación de la expresión de la proteína Wnt3a recombinante mediante transferencia Western

10 2 días después de la transfección génica, se lisaron células transfectadas con cada uno de los genes mostrados en la Tabla 1 y se sometió el lisado a un tratamiento térmico en tampón de muestras para electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE; del inglés, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) y se aplicó después a una SDS-PAGE. En ese momento, se prepararon muestras de modo que el número de células medido antes de la extracción proteica fuera igual entre las células transfectadas con el plásmido Wnt y con el vector testigo. A continuación, después de la SDS-PAGE, se transfirió la proteína del gel a una membrana usando un método semiseco. Después del tratamiento de la membrana con una disolución de bloqueo comercialmente asequible, se dejó que la membrana reaccionara con anticuerpo Wnt3a (Abcam) diluido por un factor de 500 como anticuerpo primario. Después de un lavado con PBS-T, se dejó que la membrana reaccionara adicionalmente con IgG anti-conejo marcada con HRP (GE Healthcare Life Sciences) diluida por un factor de 2000 como anticuerpo secundario. Además, después de un lavado con PBS-T, se llevó a cabo la detección usando ECL Advance (GE Healthcare Life Sciences). Como testigo positivo se usó una proteína Wnt3a de ratón comercialmente asequible (R&D System). Los resultados se muestran en la Figura 2. Se observó una elevada expresión de Wnt3a en células IORS e IDP, y también se observó expresión en células PC3.

Confirmación de la expresión funcional del Wnt3a introducido, mediante la expresión acelerada de Lef-1

25 Se investigó si el Wnt3a hiperexpresado por la introducción de un plásmido construido actúa fisiológicamente o no, usando Lef-1, que es un factor cuya expresión génica resulta acelerada por la acción de Wnt (M. Filali et al., J. Biol. Chem., 277, 33.398-33.410, 2002), como un indicador. Se introdujo el vector pTarget del plásmido Wnt3a o el testigo en células IORS y se extrajo el RNA total 2 días más tarde usando Isogen (Nippon Gene) para sintetizar cDNA. Usando el resultante cDNA de las células IORS como molde, se llevó a cabo una reacción PCR sobre Lef-1 humano usando un cebador sentido, cttccttggtgaacgagtctg (ID. SEC. nº 6), y un cebador antisentido, ggtgttctctggccttgcgt (ID. SEC. nº 7).

Los resultados se muestran en la Figura 3. En el caso de haberse introducido el plásmido Wnt3a, se observó aceleración de la expresión del gen Lef-1 en comparación con el testigo y se determinó que el Wnt3a introducido actúa fisiológicamente.

ES 2 425 883 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> SHISEIDO COMPANY, LTD.

5 <120> Célula transformada con el gen Wnt3a humano

<130> V724-PCT

<160> 7

10 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 2932

15 <212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

agctcccagg	gcccggcccc	ccccggcgct	cacgctctcg	gggcggactc	ccggccctcc	60
gcgccctctc	gcgcggcgat	ggccccactc	ggataacttct	tactcctctg	cagcctgaag	120
caggctctgg	gcagctaccc	gatctggtgg	tcgctggctg	ttgggccaca	gtattcctcc	180
ctgggctcgc	agcccatcct	gtgtgccagc	atcccgggcc	tggtccccaa	gcagctccgc	240
ttctgcagga	actacgtgga	gatcatgccc	agcgtggccg	agggcatcaa	gattggcatc	300
caggagtgcc	agcaccagtt	ccgcggccgc	cggtggaact	gcaccaccgt	ccacgacagc	360
ctggccatct	tcgggcccg	gctggacaaa	gctaccaggg	agtcggcctt	tgtccacgcc	420
attgcctcag	ccggtgtggc	ctttgcagtg	acacgctcat	gtgcagaagg	cacggccgcc	480
atctgtgget	gcagcagccg	ccaccagggc	tcaccaggca	agggctggaa	gtggggtggc	540
tgtagcgagg	acatcgagtt	tggtgggatg	gtgtctcggg	agttcgccga	cgcccgggag	600
aaccggccag	atgcccgctc	agccatgaac	cgccacaaca	acgaggctgg	gcgccaggcc	660
atcgccagcc	acatgcacct	caagtgaag	tgccacgggc	tgtcgggcag	ctgcgaggtg	720
aagacatgct	ggtggtcgca	acccgacttc	cgcgccatcg	gtgacttcct	caaggacaag	780
tacgacagcg	cctcggagat	ggtggtggag	aagcaccggg	agtcccgcgg	ctgggtggag	840
accctgcggc	cgcgctacac	ctacttcaag	gtgcccacgg	agcgcgacct	ggtctactac	900
gaggcctcgc	ccaacttctg	cgagcccaac	cctgagacgg	gctccttcgg	cacgcgcgac	960
cgcacctgca	acgtcagctc	gcacggcatc	gacggctcgc	acctgctgtg	ctgcggccgc	1020
ggccacaacg	cgcgagcggg	gcggcgccgg	gagaagtgcc	gctgcgtgtt	ccactggtgc	1080
tgctacgtca	gctgccagga	gtgcacgcgc	gtctacgacg	tgcacacctg	caagtaggca	1140
ccggccgcgg	ctccccctgg	acggggcggg	ccctgcctga	gggtgggctt	ttccctgggt	1200
ggagcaggac	tcccacctaa	acggggcagt	actcctccct	gggggcggga	ctcctccctg	1260
ggggtggggc	tcctacctgg	gggcagaact	cctacctgaa	ggcagggctc	ctccctggag	1320
ctagtgtctc	ctctctggtg	gctgggctgc	tcctgaatga	ggcggagctc	caggatgggg	1380
aggggctctg	cgttggcttc	tcctggggga	cggggctccc	ctggacagag	gcggggctac	1440

20

ES 2 425 883 T3

agattgggcg gggcttctct tgggtgggac agggcttctc ctgcgggggc gaggccctc 1500
ccagtaaggg cgtggctctg ggtgggcggg gcactaggta ggcttctacc tgcaggcggg 1560
gctcctcctg aaggaggcgg ggctctagga tggggcacgg ctctggggta ggctgctccc 1620
tgagggcgga gcgcctcctt aggagtgggg ttttatggtg gatgaggctt cttcctggat 1680
ggggcagagc ttctcctgac cagggaagg ccccttccac gggggctgtg gctctgggtg 1740
ggcgtggcct gcataggctc cttcctgtgg gtggggcttc tctgggacca ggctccaatg 1800
gggcggggct tctctccgcg ggtgggactc ttccctggga accgccctcc tgattaaggc 1860
gtggcttctg caggaatccc ggctccagag caggaaatc agcccaccag ccacctcatc 1920
cccaaccccc tgtaaggttc catccacccc tgcgtcgagc tgggaagggt ccatgaagcg 1980
agtcgggtcc ccaaccctg cccctgggat ccgagggcc cctctccaagc gcctggcttt 2040
ggaatgctcc aggcgcgccc acgcctgtgc cacccttcc tcagcctggg gtttgaccac 2100
ccacctgacc aggggccta cctggggaaa gcctgaaggg cctcccagcc cccaaccca 2160
agaccaagct tagtcctggg agaggacagg gacttcgagc aggcaagcga ccgaggccct 2220
cccaaagagg cccgccctgc ccgggtccc acaccgtcag gtactcctgc cagggaactg 2280
gcctgctgcg ccccaggccc cgcccgtctc tgctctgctc agctgcgccc ccttctttgc 2340
agctgcccag cccctcctcc ctgccctcgg gtctccccac ctgactcca tccagctaca 2400
ggagagatag aagcctctcg tcccgtccct cccttctctc cgctgtcca cagcccctta 2460
agggaaagggt aggaagagag gtccagcccc ccaggctgcc cagagctgct ggtctcattt 2520
ggggcggttc gggaggtttg gggggcatca accccccgac tgtgctgctc gcgaaggctc 2580
cacagccctg agatgggccc gcccccttcc tggcccctca tggcgggact ggagaaatgg 2640
tccgctttcc tggagccaat ggcccggccc ctctgactc atccgcctgg cccgggaatg 2700
aatggggagg ccgctgaacc caccggccc atatccctgg ttgcctcatg gccagcggcc 2760
ctcagcctct gccactgtga accggtccc accctcaagg tgcggggaga agaagcggcc 2820
aggcggggcg cccaagagc caaaagagg gcacaccgcc atcctctgcc tcaaattctg 2880
cgtttttggg ttaaatgta tatctgatgc tgctatatcc actgtccaac gg 2932

<210> 2
<211> 18
5 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
10 <223> Cebador sentido de Wnt3a

<400> 2
gatggcccca ctcgata

18

	<210> 3		
	<211> 19		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> Cebador antisentido de Wnt3a		
	<400> 3		
10	ggtgcctact tgcaggtgt		19
	<210> 4		
	<211> 20		
15	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador sentido de Wnt3a		
20	<400> 4		
	caggaactac gtggagatca		20
25	<210> 5		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador antisentido de Wnt3a		
	<400> 5		
	ccatcccacc aaactcgatg		20
35	<210> 6		
	<211> 21		
	<212> DNA		
40	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador sentido de Lef-1		
45	<400> 6		
	cttccttggt gaacgagtct g		21
50	<210> 7		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
55	<223> Cebador antisentido de Lef-1		
	<400> 7		
	gtgttctctg gccttgctcg		20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula transformada con un vector que contiene el gen Wnt3a humano, en donde dicha célula es seleccionada de un grupo que consiste en células procedentes de folículos pilosos, en donde dichas células procedentes de folículos pilosos son células inmortalizadas de vaina radicular externa (IORS) o células inmortalizadas de papila dérmica (IDP), y células procedentes de cáncer de próstata que son células de cáncer de próstata humano (PC3).
2. La célula según la Reivindicación 1, en donde el vector es un vector pTarget.

Fig.1

SECUENCIA DEL GEN WNT3A HUMANO

Clon de cDNA del Orden WNT3A, Enlaces

Símbolo WNT3A y Nombre Oficiales: familia del sitio de integración MMTV de tipo sin alas, miembro 3A [*Homo sapiens*]

Otros sobrenombres: MGC119418, MGC119419, MGC119420

Cromosoma: 1; Posición: 1q42

Anotación: Cromosoma 1, NC_000001.9 (226261375..226315584)

MIM: 606359

ID. del gen: 89780

```

1 agctcccagc gcccgcccc ccccgccgct cacgctctcg gggcggactc ccggccctcc
61 gcgccccttc gcgcggcgcg ggcccactc ggatacttct tactcctctg cagcctgaag
121 caggctctcg gcagctaccc gatctggtgg tcgctggctg ttgggccaca gtattcctcc
181 ctgggctcgc agcccacect gtgtgccagc atcccggggc tggccccaa gcagctccgc
241 ttctgcagga actacgtgga gatcatgccc agcgtggccg agggcatcaa gattggcatc
301 caggagtgcc agcaccagtt ccgcgccgc cggtggaact gcaccaccgt ccacgacagc
361 ctggccatct tcgggcccgt gctggacaaa gctaccaggg agtcggcctt tgtccacgcc
421 attgcctcag ccgggtgtggc ctttgcagtg acacgctcat gtgcagaagg cacggccgcc
481 atctgtggct gcagcagccg ccaccagggc tcaccaggca agggctggaa gtgggggtggc
541 tgtagegagg acategagtt tgggtgggat gtgtctcggg agtccgccga cgcggggag
601 aaccggccag atgcccgctc agccatgaac cgccacaaca acgaggctgg gcgccaggcc
661 atcggcagcc acatgcacct caagtgaag tgccacgggc tgtcgggcag ctgcgaggtg
721 aagacatgct ggtggtcgca acccgacttc cgcgccatcg gtgacttccct caaggacaag
781 tacgacagcg cctcggagat ggtggtggag aagcaccggg agtcccggcg ctgggtggag
841 accctcggcg cgcgctacac ctactcaag gtgccacgg agcgcgacct ggtctactac
901 gaggcctcgc ccaacttctg cgagcccaac cctgagacgg gctcctctcg cacgcgcgac
961 cgacactgca acgtcagctc gcacggcatc gacggctgag acctgctgtg ctgcggccgc
1021 ggccacaacg cgcgagcggg gcgggccgg gagaaagtcc gctcgcgtgt ccactggtgc
1081 tgctacgtca gctgccagga gtgcacgcgc gtctacgacg tgcacacctg caagtaggca
1141 ccggcccgcg ctccccctgg acggggcggg ccctgcctga ggggtggctt tccccgggt
1201 ggagcaggac tcccaccta acggggcagt actcctccct gggggcggga ctccctcctg
1261 ggggtggggc tcctacctgg gggcagaact cctacctgaa ggcagggctc ctccctggag
1321 ctagtgtctc ctctctggtg gctgggctgc tcctgaatga ggcggagctc caggatgggg
1381 aggggctctg cgttgcttc tcctgggga cggggctccc ctggaacagag gcggggctac
1441 agattggggg gggcttctct tgggtgggac agggcttctc ctgcgggggc gaggccctc
1501 ccagtaaggg cgtgctctg ggtgggcggg gcactaggta ggcttctacc tgcagcggg
1561 gctcctcctg aaggaggcgg ggctctagga tggggcacgg ctctggggta ggctgtctcc
1621 tgagggcgga gcgctcctt aggagtgggg ttttatggtg gatgagctt ctctctggat
1681 ggggcagagc ttctcctgac cagggcaagg cccctccac ggggctgtg gctctgggtg
1741 ggcgtggcct gcataaggct ctctctgtg gtggggcttc tctgggacca ggctccaatg
1801 gggcggggct tctctccgcg ggtgggactc ttccctggga accgcccctc tgattaaggc
1861 gtggttctg caggaatccc ggctccagag caggaaatc agcccaccag ccacctcctc
1921 cccaaccccc tghtaaggttc catccacccc tgcgtcgagc tgggaagggt ccataagcg
1981 agtcgggtcc ccaacccgtg cccctgggat ccgagggccc ctctccaagc gcctggcttt
2041 ggaatgctcc aggcgcgccc acgctgtgc cacccttcc tcagcctggg gtttgaccac
2101 ccacctgacc aggggccccta cctggggaaa gctgaaggg cctcccagcc cccaacccca
2161 agaccaagct tagtctctgg agaggacag gacttcgag aggcaagcga ccgagccctc
2221 cccaagagg ccgcccctgc ccgggctccc acaccgtcag gtactcctgc cagggactg
2281 gctgctgctg ccccaggccc cgcctctctc tgcctctgctc agctgcgccc ccttcttctg
2341 agctgcccag cccctcctcc ctgcccctcg gtctcccac ctgcaactcca tccagctaca
2401 ggagagatag aagcctctcg tcccgtccct ccttctctc cgcctgtcca cagccctta
2461 agggaaaggt aggaagagag gtccagcccc ccaggctgccc cagagctgct ggtctcattt
2521 gggggcgttc gggaggtttg gggggcatca acccccgcac tgtgctgctc gcgaaggtcc
2581 cacagccctg agatgggccc gccccttcc tggcccctca tggcgggact ggagaaatgg
2641 tccgcttctc tggagccaat ggcccggccc ctctgactc atccgctggt cccgggaaatg
2701 aatggggagg ccgctgaacc caccggccc atatccctgg ttgctctatg gccagcggcc
2761 ctcagcctct gccactgtga accggctccc accctcaagg tgcggggaga agaagcggcc
2821 aggcggggcg cccaagagc ccaaaagagg gcacaccgccc atcctctgccc tcaaatctcg
2881 cgttttttgg ttaaatgtta tatctgatgc tgctatatcc actgtccaac gg

```

Fig.2

Transferencia Western DE CÉLULAS TRANSFECTADAS CON WNT3A

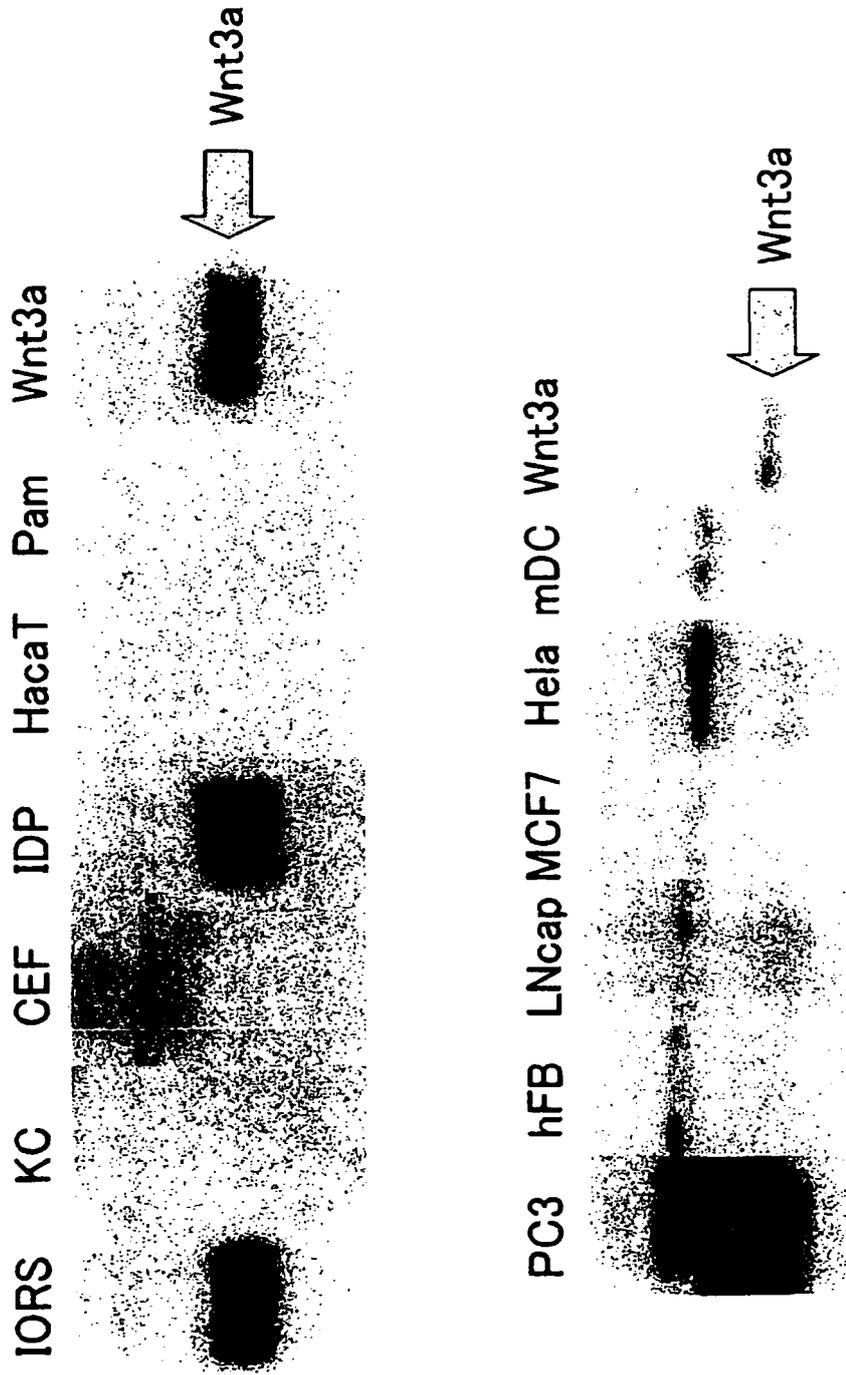
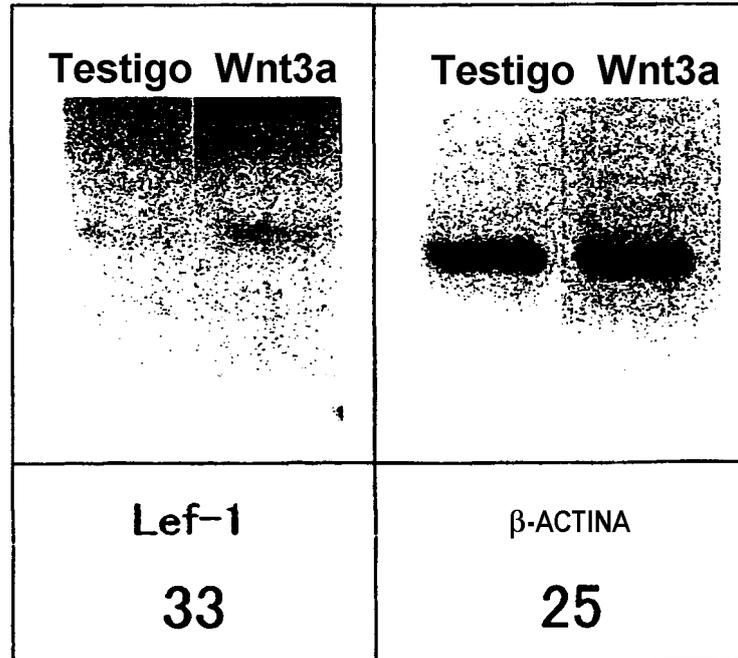


Fig.3

CONFIRMACIÓN DE LA EXPRESIÓN FUNCIONAL DE WNT3A
INTRODUCIDO, POR EXPRESIÓN ACELERADA DE Lef-1



PARTE SUPERIOR: GEN; PARTE INFERIOR: Nº DE CICLOS DE PCR