

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 493**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07 (2010.01)

C07K 14/475 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 35/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2004 E 04737880 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 1639097**

54 Título: **Métodos y composiciones para modular el crecimiento de células pluripotenciales y la diferenciación**

30 Prioridad:

25.06.2003 US 482014 P

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

11.12.2013

73 Titular/es:

**OTTAWA HOSPITAL RESEARCH INSTITUTE
(100.0%)
725 Parkdale Avenue
Ottawa, ON K1Y 4E9 , CA**

72 Inventor/es:

**RUDNICKI, MICHAEL;
SEALE, PATRICK;
POLESSKAYA, ANNA y
FORTIN, ANOUK**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 433 493 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

Métodos y composiciones para modular el crecimiento de células pluripotenciales y la diferenciación

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de los terapéuticos de células pluripotenciales y en particular a composiciones para inducir o inhibir el compromiso de linaje o la proliferación de células pluripotenciales.

10 **Antecedentes de la invención**

La familia Wnt de genes codifica más de veinte glucoproteínas segregadas ricas en cisteína que actúan por medio de unión a receptores Frizzled (Fzd) sobre células diana. La unión de Wnt a Fzd puede iniciar la señalización por medio de uno o varios mecanismos. En el mecanismo denominado canónico, la activación de Disheveled conduce a la inactivación de la glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK-3 β), una serina-treonina quinasa citoplasmática. La diana-gsk-3 β , β -catenina, se estabiliza de este modo y experimenta translocación hasta el núcleo en el que activa la transcripción dependiente del (factor celular-T) TCF de promotores específicos (Wodarz, 1998; Dierick, 1999). En el mecanismo de polaridad tisular plano o no canónico, la unión de Wnt a Fzd también activa Disheveled (Krasnow y col., (1995). Development 121, 4095-4102) que en este caso activa RhoA, una pequeña proteína g (Strutt y col., (1997). Nature 387, 292-295). Posteriormente, RhoA señala a través de JNK (quinasa terminal Jun N) y Rock (Rho asociada a quinasa) (Boutros y col., (1998). Cell 94, 109-118) para regular la dinámica citoesquelética durante la gastrulación. Las proteínas Wnt también se conocen por señalar a través de la modulación de calcio intracelular. Se piensa que esto activa la proteína quinasa C (PKC) (Sheldahl y col., (1999). Curr Biol 9, 695-698) y conduce a la translocación nuclear del factor de transcripción NFAT.

Recientemente, se ha determinado que los mecanismos de señalización de Wnt son capaces de dirigir la determinación de destino celular en varios tejidos, incluyendo riñón (Labus, 1998; Vainio, 2000), CNS (Patapoutian, 2000), hematopoyético (Van Der Berg, 1998) y músculo esquelético (Cossu, 1999). También se ha implicado la señalización Wnt en la cicatrización de heridas de pos-nacimiento y en la regeneración tisular en pez cebra e hidra (Hobmayer 2000; Labus, 1998; Poss, 2000).

Se ha descrito la implicación de la señalización de Wnt en la proliferación y diferenciación de células pluripotenciales hematopoyéticas procedentes del tejido fetal o de médula ósea. Por ejemplo las patentes de EE.UU. Nos 5.851.984 y 6.159.462 describen el uso de polipéptidos Wnt para mejorar la proliferación, diferenciación y/o mantenimiento de las células progenitoras o pluripotenciales hematopoyéticas y la patente de EE.UU. n° 6.465.249 describe el uso de β -catenina para la expansión *in vitro* del progenitor o de las células pluripotenciales, en particular células pluripotenciales hematopoyéticas. La patente de EE.UU. n° 6.165.748 describe nuevas proteínas, las proteínas de Frazzled, que están implicadas en los mecanismos de señalización Wnt y su uso para inducir la expresión de factores y/o la diferenciación de tejidos y órganos. La solicitud de patente canadiense n° 2.353.804 describe el uso de Wnt3a para estimular la miogénesis en células de carcinoma embrionarias P19 y sugiere que la miogénesis se puede controlar por medio de la modulación de la actividad Wnt, en particular que la miogénesis se puede inhibir por medio de la inhibición de un polipéptido Wnt.

La solicitud de patente de EE.UU. n° 20010055790 describe nuevos polipéptidos Wnt 7a; el uso de polipéptidos Wnt 7a y polinucleótidos en el tratamiento de determinadas enfermedades; y métodos de evaluación de la función Wnt 7a y los niveles, con fines de diagnóstico y para la identificación de moduladores potenciales de Wnt 7a.

La solicitud de patente de EE.UU. n° 20030040051 describe un conjunto de nuevos miembros de la familia de genes de Frizzled de vertebrados y métodos de identificación de compuestos que afectan a la unión de un Wnt a los polipéptidos codificados por estos genes.

Rudnicki Michael A, FASEB JOURNAL, Vol. 17, n°. 4-5, marzo de 2003, páginas Abstract n°. 487.1 describe la regulación molecular de la especificación de células pluripotenciales adultas en músculo. Se afirma que los mioblastos primarios expresan Wnt 5a y un co cultivo de células pluripotenciales adultas CD45+/Sca-1+ con fibroblastos que expresan Wnt fue suficiente para inducir su especificación miogénica.

Las células pluripotenciales presentan potencial para proporcionar un beneficio en una variedad de configuraciones clínicas, pero se han encontrado un número de limitaciones a muchas aplicaciones incluyendo, por ejemplo, la obtención de un número suficiente de células diana y la estimulación de la diferenciación terminal de estas células pluripotenciales para dar lugar a células maduras y específicas de tejidos.

Existe la necesidad en la técnica de métodos y composiciones que sean capaces de modular la proliferación, diferenciación o tanto la proliferación como la diferenciación de células pluripotenciales.

Se proporciona esta información de antecedentes con la finalidad de hacer que la información conocida por el solicitante sea de posible relevancia para la presente invención. No necesariamente se pretende admitir, ni se debe

interpretar, que cualquier información anterior constituye la técnica anterior con respecto a la presente invención.

Es un objetivo de la invención solucionar estas desventajas de la técnica anterior.

- 5 El objetivo anterior se alcanza por medio de las combinaciones de características de las reivindicaciones principales, comentando las sub-reivindicaciones realizaciones más ventajosas de la invención.

Sumario de la invención

10 Los inventores describen el uso de mecanismos de señalización de Wnt para modular la diferenciación de células pluripotenciales. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para modular la proliferación de una población de células pluripotenciales adultas que comprende poner en contacto dicha población con uno o más moduladores de los mecanismos de señalización Wnt.

15 Los inventores describen un método para inducir el compromiso de linaje de una población de células pluripotenciales adultas para dar lugar a células progenitoras que comprende poner en contacto dicha población con uno o más activadores de los mecanismos de señalización Wnt.

20 Los inventores describen un método para aumentar la supervivencia de una población de células pluripotenciales adultas que comprende poner en contacto dicha población con uno o más activadores de los mecanismos de señalización Wnt.

25 Los inventores describen un método para inducir la diferenciación terminal de una población de células pluripotenciales miogénicas que comprende poner en contacto dicha población con uno o más activadores de los mecanismos de señalización Wnt.

30 Los inventores describen un método para inducir la proliferación y/o el compromiso de linaje de una población de células pluripotenciales residentes en un tejido adulto que comprende poner en contacto dichas células con uno o más activadores de los mecanismos de señalización de Wnt.

Los inventores describen un compuesto que se une y que inhibe la actividad de una proteína soluble relacionada de Frizzled y que es capaz de inducir la proliferación y/o el compromiso de linaje de células pluripotenciales adultas.

35 Los inventores describen un compuesto que se une y que inhibe la actividad de un receptor de Frizzled y que es capaz de inhibir la proliferación y/o el compromiso de linaje de células pluripotenciales adultas.

Los inventores describen un método para identificar compuestos que modulan los mecanismos de señalización de Wnt que comprende:

- 40 (a) proporcionar una población de ensayo de células pluripotenciales adultas,
(b) poner en contacto dicha población de ensayo con un compuesto candidato,
45 (c) controlar la proliferación de dicha población de ensayo,
(d) comparar la proliferación de dicha población de ensayo con la proliferación de una población de control que no entra en contacto con dicho compuesto candidato;

50 en el que una diferencia en la proliferación de dicha población de ensayo y dicha población de control es indicativa de un compuesto que modula los mecanismos de señalización de Wnt.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición para uso en un método de tratamiento de un sujeto, en el que el sujeto se caracteriza por exhibir o presentar degeneración muscular o agotamiento muscular, caracterizada por modular la proliferación, diferenciación o tanto la proliferación como la diferenciación de células pluripotenciales musculares CD45+:Sca1+, comprendiendo dicha composición Wnt 7a y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

60 en la que las células pluripotenciales musculares CD45+:Sca1+ no son células pluripotenciales embrionarias humanas.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de Wnt 7a para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto, en el que dicho sujeto se caracteriza por exhibir o tener degeneración muscular o agotamiento muscular, caracterizado por modular la proliferación, diferenciación o tanto la proliferación como la diferenciación de las células pluripotenciales musculares CD45+:Sca1+ de dicho sujeto;

65 en el que las células pluripotenciales musculares CD45+:Sca1+ no son células embrionarias humanas.

- De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método ex vivo para modular la proliferación, diferenciación o tanto la proliferación como la diferenciación de una población de células pluripotenciales musculares CD45+:Sca1+ que comprende poner en contacto dicha población con una composición que comprende Wnt 7a y un vehículo o diluyente;
- 5 en el que las células pluripotenciales musculares CD45+:Sca1+ no son células pluripotenciales embrionarias humanas.
- 10 Los inventores describen una composición que comprende Wnt 5a, Wnt 5b, Wnt 7a, Wnt 7b para uso para modular la proliferación, diferenciación o tanto la proliferación como la diferenciación de células pluripotenciales musculares CD45+:Sca1+.
- 15 Los inventores describen un método como se ha definido anteriormente en el que uno o más activadores de señalización de wnt comprenden uno o más compuestos que se unen a y que inhiben la actividad de una o más proteínas solubles relacionadas de Frizzled (sFRPs). Los compuestos pueden ser una o más moléculas, polipéptidos, proteínas, macromoléculas o su combinación. En una realización, uno o más polipéptidos comprenden uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen a sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4 o una de sus combinaciones.
- 20 También se contempla por medio del método descrito anteriormente que la modulación puede inhibir la proliferación, diferenciación o tanto la proliferación como la diferenciación de células pluripotenciales, y la composición puede comprender uno o más inhibidores de señalización wnt, por ejemplo, pero sin limitarse a, una o más proteínas solubles relacionadas de Frizzled (sFRPs), preferentemente una o más de sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4 o una de sus combinaciones. En una realización de la presente invención, que no significa que sea limitante en modo alguno, unas o más proteínas solubles relacionadas de Frizzled pueden comprender sFRP2 y sFRP3. En otra realización, las proteínas relacionadas de Frizzled son proteínas humanas relacionadas de Frizzled.
- 25 El sujeto descrito en el método de uso de la presente invención como se ha definido anteriormente puede ser un sujeto mamífero, por ejemplo, pero sin limitarse a, ratón, vaca, oveja, cabra, cerdo, perro, gato, ratón conejo, primate o humano. En una realización, que no significa que sea limitante, el sujeto es un humano.
- 30 El método de uso que se ha definido anteriormente también contempla que el sujeto humano exhiba o tenga una degeneración muscular o agotamiento muscular. La degeneración muscular o el agotamiento muscular pueden estar provocados, en su totalidad o en parte, por una enfermedad, por ejemplo sida, cáncer, una enfermedad degenerativa muscular, o una de sus combinaciones. Ejemplos de enfermedades degenerativas musculares incluyen, pero sin limitarse a distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (BMD), distrofia miotónica (enfermedad de Steinert), distrofias musculares de cintura-extremidades, distrofia muscular facioescapulohumeral (FSH), distrofias musculares congénitas, distrofia muscular oculofaríngea (OPMD), distrofias musculares distales o distrofia muscular de Emery-Dreifuss.
- 35 La presente invención también contempla un método de uso como se ha definido anteriormente en el que el sujeto exhibe o tiene daño del músculo esquelético. El daño del músculo esquelético puede estar relacionado con enfermedad o no. Por ejemplo, sin pretender ser limitación en modo alguno, se puede emplear el método para tratar el agotamiento muscular debido a la inactividad, por ejemplo, pero sin limitarse a, después de la cirugía y similares. Alternativamente, se puede emplear el método de la presente invención para aumentar el número de células musculares en un sujeto, y/o se puede emplear para aumentar el tamaño, resistencia de la masa muscular de uno o más músculos en el sujeto.
- 40 También se contempla por parte del método o el uso que se han definido anteriormente que la composición puede comprender un compuesto que mejore la supervivencia de células pluripotenciales, por ejemplo, pero sin limitarse a, una proteína sonic hedgehog (Shh).
- 45 La presente invención también contempla que la composición que se ha definido anteriormente se emplee para favorecer la proliferación, diferenciación o tanto la proliferación como la diferenciación de células pluripotenciales en el sujeto, y en la que uno o más activadores de la señalización de wnt comprende además uno o más compuestos que se unen y que inhiben la actividad de una o más proteínas solubles relacionadas de Frizzled (sFRPs). Uno o más compuestos pueden comprender una o más moléculas pequeñas, por ejemplo, pero sin limitarse a, moléculas sintetizadas químicamente, o uno o más compuestos pueden comprender uno o más polipéptidos, por ejemplo, pero sin limitarse a, uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpo.
- 50 Los inventores describen que uno o más compuestos que se unen e inhiben las proteínas solubles relacionadas de Frizzled (sFRP) sFRP 1, sFRP 2, sFRP 3, sFRP 4 o una de sus combinaciones. Los inventores también describen uno o más compuestos que se unen a e inhiben la actividad de las proteínas solubles relacionadas de Frizzled sFRP 2 y sFRP 3. Las sFRP pueden ser, pero sin limitarse a, sFRPs humanas, sus variantes o derivados que exhiben sustancialmente la misma actividad que la sFRP de tipo natural.
- 55
- 60
- 65

Los inventores describen que la presente invención, como se ha definido anteriormente, comprende además un compuesto que mejora la supervivencia de las células pluripotenciales, por ejemplo una proteína de sonic hedgehog. También la composición puede comprender una o más células pluripotenciales, por ejemplo, pero sin limitarse a, células pluripotenciales CD45+:Sca 1+. Las células pluripotenciales CD45+:Sca1+ pueden ser neonatales, por ejemplo procedentes de un sujeto en cualquier momento posterior al nacimiento.

Este resumen de la invención no necesariamente describe todas las características de la invención sino que la invención también puede estar basada en una sub-combinación de las características descritas.

Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente memoria descriptiva en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos en los cuales:

La figura 1 muestra una selección miogénica de células CD45+:Sca1+ en el músculo en regeneración. (A) Los análisis citométricos de las células procedentes de músculo esquelético demostraron que la proporción de células que expresan los marcadores hematopoyéticos CD45 y Sca1 aumentó drásticamente en el músculo en regeneración (4 y 7 días después de la inyección de cardiotoxina (ctx)). Se muestra la disposición de las células CD45+:Sca1^{alto} para el momento del día 4. (B) Los experimentos de proliferación celular *in vivo* indicaron que un 60 % y un 18 % de las células BrdU+ fueron CD45+:Sca-1+ y CD45+:Sca1+ respectivamente a los 4 días después de la lesión (rojo = células BrdU+; azul = células totales). (C) ~ 7-10 % de las células CD45+:Sca1^{alto} purificadas a partir de músculo esquelético *Myf5nLacZ* en regeneración pero no lesionado co-expresó CD45, Sca1 y *Myf5nLacZ* según se detecta por medio de reacción de X-Gal. (D) las células CD45+:Sca1^{alto} separadas dieron lugar a células de músculo esquelético que expresaba MyoD y Desmin en cultivo. Además, una proporción similar de células CD45+:Sca1^{alto} se diferenciaron hasta miotubos que expresaban una Cadena Pesada de Miosina (MHC). (E) El número de células satélite *Myf5nLacZ+* fue de ~ 30 veces más bajo, 18 horas después de la inyección de cardiotoxina en comparación con el músculo no lesionado. (F) El análisis cuantitativo indicó que las fracciones de CD45+:Sca1^{alto} (rojo) y CD45+:Sca1+ (azul) dieron lugar a una media de $1,54 \times 10^5$ y $3,9 \times 10^5$ células miogénicas respectivamente, mientras que la fracción CD45+:Sca1+ (negro) contenía actividad miogénica despreciable.

La figura 2 muestra una selección miogénica de células CD45+:Sca1+ inducidas por un co-cultivo con mioblastos o exposición a Litio. (A) Las células CD45+:Sca1^{alto} que expresan EGFP sometidas a co-cultivo con mioblastos primarios dieron lugar a miocitos mononucleares que expresaban una Cadena Pesada de Miosina (MHC) a una frecuencia de un 0,5 %. En co-cultivos complementados con LiCl 10 mM, 7,5 % de las células EGFP+:CD45+:Sca1^{alto} formó miocitos MHC+ (puntas de flecha). Las flechas indican células no miogénicas de EGFP+. (B) las células CD45+:Sca1^{alto} cultivadas solas en el medio de diferenciación completamente con LiCl 10 mM formaron MHC mononucleares (puntas de flecha).

La figura 3 muestra la sobre-regulación de Wnts y sFRPs en el músculo en regeneración. (A) Los análisis de RT-PCR indicaron una mayor expresión de *Wnts 5a, 5b, 7a, 7b* en el músculo TA en regeneración. Por el contrario, la expresión de *Wnt4* estuvo infra-regulada tras la lesión. Se observó una mayor expresión de sFRPs 1, 2, 3 pero no de sFRP4 en el músculo en regeneración. (B) Los estudios de RT-PCR mostraron que *Wnts 5a* y *5b* se expresan en fibras musculares (fibras) y en mioblastos en proliferación (mb); *Wnt7a* se expresa principalmente en fibras y miotubos sometidos a cultivo (mt) (3 días de diferenciación en cultivo). *sFRPs 1-4* se expresaron en mioblastos, miotubos y fibras. (C) Los receptores *Wnt, Fzd 1,4* y *Fzd 1,4,7* se expresaron en células CD45+:Sca1+ purificadas procedentes de músculo no lesionado y en regeneración (4 días después de la lesión), respectivamente.

La figura 4 muestra células CD45+:Sca-1+ que sobre-regulan β -catenina durante la regeneración. (A) El análisis de inmunotransferencia Western reveló niveles mayores de proteína de β -catenina en extractos de músculo en regeneración. (B) Se observaron niveles elevados de proteína de β -catenina en células CD45+:Sca1+ y CD45+:Sca1+ separadas a partir de la regeneración (4 días después de la lesión), pero no músculo esquelético no lesionado.

La figura 5 muestra que los Wnts ecotópicos inducen el compromiso miogénico de células CD45+:Sca1+. (A) Las células CD45+:Sca1+ que expresan EGFP a partir de músculo no lesionado mostraron acumulación nuclear y/o citoplasmática de proteína de β -catenina (puntas de flecha) tres días después de co-cultivo con líneas celulares que expresaban *Wnts 5a, 5b, 7a* y *7b* (mezcla de Wnt). Por el contrario, se confinó la expresión de β -catenina a la membrana plasmática en CD45+:Sca1+ co-cultivadas con células sometidas a transfección con vector pLNCX vacío (control). (B) Las células CD45+:Sca1+ expresaron MyoD y Pax7 después de tres días de co-cultivo con células que expresan *Wnt 5a, 5b, 7a* y *7b*. Las células CD45+:Sca1+ se diferenciaron en forma de miocitos que expresan Cadena Pesada de Miosina (MHC) tras la exposición de co-cultivos a condiciones de bajo contenido de mitogen. (C) Las células CD45+:Sca1+ no iniciaron la expresión de MyoD, Pax7 o MHC en co-cultivo con líneas celulares sometidas a transfección estable con el vector vacío de control (pLNCX).

La figura 6 muestra que la inyección de sFRPs disminuye de forma marcada la selección de células CD45+:Sca1+

durante la regeneración. (A-C) El análisis citométrico de flujo para CD45 y Sca1 reveló una menor proporción de células CD45⁺:Sca1^{alto} en el músculo en regeneración tratado diariamente con sFRPs 2 y 3 (C) en comparación con el músculo en regeneración inyectado con PBS (B). La inyección de sFRPs en un músculo lesionado (A) no indujo la regeneración o ejerció influencia alguna sobre las proporciones de células CD45⁺ y Sca1⁺. (D) La proporción de células CD45⁺:Sca1^{alto} que co-expresaron *Myf5nLacZ* se redujo en 6 veces tras el tratamiento del músculo en regeneración con sFRP 2 y 3. (E) Se recuperó una reducción de 7 veces en el número de mioblastos que expresaban Desmina a partir del músculo en regeneración tratado con sFRPs.

La figura 7 muestra el papel de la señalización de Wnt en la selección miogénica de células pluripotenciales adultas. Los experimentos sugieren la hipótesis de que las señales de Wnt segregadas por fibras dañadas, mioblastos residentes y posiblemente otros tipos celulares en músculo lesionado inducen la activación de los factores de transcripción miogénicos, y el compromiso de las células pluripotenciales hacia los precursores musculares. La señalización Wnt puede converger sobre la activación del gen Pax7 para inducir la especificación miogénica. Tras la reparación, la secreción de los antagonistas Wnt, sFRP 2 y 3, bloquea las señales de Wnt, interrumpiendo de este modo la selección miogénica de las células pluripotenciales.

La figura 8 muestra el diseño experimental y los resultados de los experimentos que demuestran un aumento de las células comprometidas con la miogénesis en respuesta al tratamiento *in vivo* con litio. (Figura 8A) Diagrama de flujo de diseño experimental. Se tratan ratones *Myf5nLacZ* con inyecciones IP diarias de LiCl (2 mg/Kg/día) durante un período de 14 días. En el día 10, se induce la regeneración muscular en el músculo TA por medio de inyección de cardiotoxina. Cuatro días más tarde, se sacrifican los animales y se aíslan las células mononucleares totales a partir de TAs, se colocan en placas y se someten a tinción 24 horas después para evaluar la β -galactosidasa. (Figura 8B) Los resultados indican que la proporción de células B-Gal positivo (células miogénicas) es casi más del doble en los animales tratados con LiCl frente a los animales de control a los que se inyectó PBS.

La figura 9 muestra los resultados de inmunotransferencia Western que demuestran que los polipéptidos wnt modulan la expresión de Pax7 en células de mioblastos primarios.

Descripción de realización preferida

La siguiente descripción es una realización preferida a modo únicamente de ejemplo y sin limitación a la combinación de características necesarias para llevar a efecto la invención.

La presente invención proporciona métodos y usos para modular la proliferación y el compromiso de linaje de células pluripotenciales adultas por medio de la modulación de los mecanismos de señalización de Wnt. La invención además proporciona moduladores de los mecanismos de señalización de Wnt y su uso para inducir o inhibir la proliferación de células pluripotenciales y/o el compromiso de linaje. Los moduladores de los mecanismos de señalización de Wnt incluyen tanto activadores como inhibidores. Se puede usar un modulador para inhibir los mecanismos de señalización de Wnt y de este modo inhibir la proliferación y/o evitar el compromiso de linaje de las células pluripotenciales. Alternativamente, se puede usar un modulador para activar los mecanismos de señalización de Wnt y de este modo inducir la proliferación y/o el compromiso de linaje de células pluripotenciales. De acuerdo con una realización de la presente invención, el compromiso de linaje de las células pluripotenciales que se induce por medio de la acción de un modulador es un compromiso con la generación de células de progenitor miogénico. Además, se puede usar la activación de los mecanismos Wnt para aumentar la supervivencia de células pluripotenciales adultas y/o células de progenitor comprometidas. Se puede usar la modulación Wnt para modular la diferenciación terminal de células de progenitor comprometidas.

De este modo, la presente invención proporciona métodos y usos para inducir la proliferación y/o el compromiso de linaje de células pluripotenciales adultas que comprenden poner en contacto las células con uno o más moduladores de los mecanismos de Wnt. El modulador puede estar en forma de un polipéptido, un péptido, o una molécula de ácido nucleico, o el modulador puede estar en forma de una célula que expresa un polipéptido, o un péptido. Los métodos o usos de la presente invención se pueden llevar a cabo *in vitro* o *in vivo*, y son particularmente útiles para la estimulación *in vivo* de la proliferación y/o el compromiso celular de células pluripotenciales residentes en un tejido. La presente invención además proporciona métodos y usos para aumentar el número de células de progenitor comprometidas en un tejido que comprenden poner en contacto las células con uno o más activadores de los mecanismos de Wnt, proporcionando de este modo una regeneración mejorada del tejido y métodos para inducir la diferenciación terminal de células de progenitor comprometidas que comprenden poner en contacto las células con uno o más activadores de los mecanismos de Wnt.

La aplicación terapéutica de la presente invención pertenece a enfermedades y trastornos en los cuales es necesario un aumento del número de células pluripotenciales residentes o células de precursor comprometidas, por ejemplo, para sustituir tejido dañado o defectuoso, o para evitar la atrofia muscular o la pérdida de masa muscular, en particular en relación con enfermedades y trastornos tales como distrofia muscular, enfermedades neuromusculares y nerodegenerativas; enfermedad cardiovascular, apoplejía, fallo cardíaco, infarto de miocardio, cáncer, infección por VIH, SIDA, diabetes de tipo II y similares.

Definiciones

- 5 A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el se comprende comúnmente por parte de un experto en la técnica a la cual pertenece la invención.
- 10 La expresión "polipéptido Wnt", según se usa en la presente memoria, engloba proteínas de Wnt que tienen una secuencia de polipéptido que corresponde a la secuencia de tipo natural así como a secuencias de polipéptido variantes, fragmentos de polipéptido y polipéptidos quiméricos que tienen una actividad de polipéptido Wnt de tipo natural. Se conoce un número de proteínas de Wnt en la técnica, incluyendo los Wnts humanos: Wnt 1, Wnt 2, Wnt 3, Wnt 4, Wnt 5a, Wnt 5b, Wnt 7a y Wnt 7b, y los Wnt de ratón: Wnt 1, Wnt 2, Wnt 3a, Wnt 3b, Wnt 4, Wnt 5a, Wnt 5b, Wnt 6, Wnt 7a, Wnt 7b, Wnt 8a, Wnt 8b, Wnt 10a, Wnt 10b, Wnt 11 y Wnt 12. Se puede encontrar una variedad de polipéptidos wnt a partir de varias especies en <http://www.stanford.edu/~musse/wntwindow.html>
- 15 La expresión "mecanismos de señalización de Wnt", según se usa en la presente memoria, se refiere a mecanismos de señalización celular mediados por proteínas Wnt que están implicadas en la diferenciación de células pluripotenciales.
- 20 El término "modulador", según se usa en la presente memoria, se refiere tanto a activadores como inhibidores de los mecanismos de señalización Wnt. De este modo, un "modulador" de los mecanismos de señal de Wnt es un compuesto o molécula que estimula o inhibe la actividad de un polipéptido de Wnt bien directamente, por medio de acción sobre un gen o proteína Wnt, o bien indirectamente, por medio de acción sobre una o más proteínas, o genes que codifican proteínas, que actúan aguas arriba (activadores) o aguas abajo (efectores) de la proteína Wnt en los mecanismos de señalización. Se proporciona un listado de secuencias de nucleótido que codifican para proteínas wnt a partir de varias especies en <http://www.Stanford.edu/~musse/wntwindow.html>.
- 25 La expresión "célula pluripotencial", según se usa en la presente memoria, se refiere a una célula que es capaz de diferenciarse en un número de tipos celulares finales y diferenciados. Las células pluripotenciales pueden ser totipotenciales o pluripotenciales. Las células totipotenciales normalmente son de origen embrionario. Típicamente, las células pluripotenciales son células de una línea de células pluripotenciales capaces de diferenciarse para dar lugar a tipos celulares finales diferenciados diferentes. Las células unipotenciales y pluripotenciales se pueden originar a partir de varios sistemas tisulares o de órganos, incluyendo, pero sin limitarse a, sangre, nervios, músculos, piel, intestino, hueso, riñón, hígado, páncreas, timo y similares. De acuerdo con la presente invención, la célula pluripotencial procede de un órgano o tejido adulto o neonatal.
- 30 La expresión "célula de progenitor", según se usa en la presente memoria, se refiere a una célula que está comprometida con un linaje celular particular y que da lugar a células de este linaje por medio de una serie de divisiones celulares. Un ejemplo de célula de progenitor sería un mioblasto, que es capaz de diferenciarse en únicamente un tipo de célula, pero que por sí misma no está completamente madura o totalmente diferenciada.
- 35 Los términos "proliferación" y "expansión", según se usan de manera intercambiable en la presente memoria, con referencia a células, se refieren a un aumento del número de células del mismo tipo por medio de división.
- 40 El término "diferenciación", según se usa en la presente memoria, se refiere a un proceso de desarrollo en el que las células se vuelven especializadas para una función particular, por ejemplo, en el que las células adquieren una o más características morfológicas y/o funciones diferentes de las del tipo celular inicial. El término "diferenciación" incluye tanto el compromiso de linaje como los procesos de diferenciación terminales. La diferenciación se puede evaluar, por ejemplo, por medio del control de la presencia o ausencia de marcadores de linaje, usando inmunohistoquímica u otros procedimientos conocidos por el trabajador experto en la técnica. Las células descendientes diferenciadas procedentes del progenitor pueden estar, pero no necesariamente, relacionadas con la misma capa de germen o tejido que el tejido fuente de las células pluripotenciales. Por ejemplo, las células de progenitor neuronales y las células de progenitor musculares se pueden diferenciar para dar lugar a linajes celulares hematopoyéticos.
- 45 Las expresiones "compromiso de linaje" y "especificación", según se usan de manera intercambiable en la presente memoria, se refieren a un proceso que experimenta una célula pluripotencial por medio del cual la célula pluripotencial da lugar a una célula de progenitor comprometida con la formación de un intervalo limitado particular de tipos celulares diferenciados. Con frecuencia, las células de progenitor comprometidas son capaces de la auto-renovación o división celular.
- 50 La expresión "diferenciación terminal", según se usa en la presente memoria, se refiere a una diferenciación final de una célula para dar lugar a una célula madura completamente diferenciada. Por ejemplo, las células de progenitor neuronales y las células de progenitor musculares se pueden diferenciar para dar lugar a linajes celulares hematopoyéticos, cuya diferenciación terminal conduce a células sanguíneas maduras o a un tipo celular específico.
- 55 Normalmente, la diferenciación terminal está asociada a la extracción a partir de un ciclo celular y a la interrupción de la proliferación.
- 60
- 65

"De origen natural", según se usa en la presente memoria en referencia a un objeto, indica que el objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido de origen natural o secuencia de polinucleótido sería uno que esté presente en un organismo, y que se pueda aislar a partir del organismo y que no se modifique intencionadamente por parte del hombre en el laboratorio.

Según se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a +/- 5 % de variación a partir del valor nominal. Debe entenderse que dicha variación se incluye siempre en cualquier valor dado proporcionado en la presente memoria, se haga referencia o no específica al mismo.

Se usan otros términos de química empleados en la presente memoria de acuerdo con el uso convencional en la técnica, como viene ejemplificado en The MacGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (ed. Parker, S., 1985), McGraw-Hill, San Francisco.

15 Moduladores candidatos de los mecanismos de señalización de Wnt

Los inventores describen moduladores candidatos de los mecanismos de señalización de Wnt que son compuestos y moléculas que estimulan o inhiben la actividad de un polipéptido de Wnt, bien directa o indirectamente. Los moduladores directos actúan sobre un polipéptido de Wnt, o un gen que codifica un polipéptido de Wnt, mientras que los moduladores indirectos actúan sobre una o más proteínas, o genes que codifican proteínas, que actúan aguas arriba ("activadores") o aguas abajo ("efectores") de un polipéptido de Wnt en los mecanismos de señalización de Wnt. De este modo, un modulador puede actuar a nivel genético, por ejemplo para sobre-regular o infra-regular la expresión de un gen que codifica un polipéptido de Wnt o un activador o un efector de un polipéptido de Wnt, o a nivel de proteína para interferir con la actividad de un polipéptido de Wnt o una proteína de activador o efector de un polipéptido de Wnt. También se contemplan moduladores que son por sí mismos polipéptidos de Wnt, o fragmentos activos de sus variantes, que pueden aumentar el nivel de Wnt en la célula. Un modulador puede ser, por ejemplo, un polipéptido, péptido, polinucleótido, oligonucleótido, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o un activador o inhibidor de molécula pequeña. Los moduladores de molécula pequeña pueden ser orgánicos o inorgánicos. En el contexto de la presente invención, la actividad de un polipéptido de Wnt se refiere a la actividad que conduce a la diferenciación y/o proliferación de células pluripotenciales.

Los inventores describen un modulador que actúa a nivel genético para sobre-regular la expresión de un gen que codifica un polipéptido de Wnt. En otra realización, el modulador comprende un gen que codifica un polipéptido de Wnt que actúa para aumentar la cantidad total de Wnt en una célula y, de este modo, aumentar la actividad de Wnt en los mecanismos de señalización. Los inventores describen un modulador que actúa a nivel de proteína para mejorar la actividad de un polipéptido de Wnt o para aumentar el nivel de un polipéptido de Wnt en una célula.

(i) *Polipéptidos y péptidos*

Los términos "polipéptido" y "péptido", según se usan en la presente memoria, se refieren a una secuencia de residuos de amino ácido unidos por medio de enlaces de péptido o enlaces de péptido modificados. Normalmente, un polipéptido tiene una longitud de al menos seis aminoácidos y un péptido tiene una longitud de al menos 3 aminoácidos. El polipéptido o el péptido pueden ser de origen natural, recombinante, sintético o una combinación de estos. El polipéptido o péptido puede ser un fragmento de una proteína o polipéptido de origen natural. Los términos polipéptido y péptido también engloban análogos de péptido, derivados de péptido y compuestos peptidomiméticos. Dichos compuestos se conocen bien en la técnica y pueden presentar ventajas significativas con respecto a los péptidos de origen natural, incluyendo, por ejemplo, mayor estabilidad química, mayor resistencia frente a la degradación proteolítica, mejores propiedades farmacológicas (tales como, vida media, absorción, potencia y eficacia), especificidad modificada (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas) y/o menor carácter antigénico.

Un "derivado de péptido" es una sustancia química adicional que contiene péptido o restos bioquímicos que normalmente no son parte de un péptido de origen natural. Los derivados de péptido incluyen péptidos en los cuales una o más cadenas laterales de aminoácidos y/o el extremo amino y/o el extremo carboxilo se han derivatizado con un grupo sustituyente químico apropiado, así como también péptidos cíclicos, péptidos duales, multímeros de los péptidos, péptidos condensados con otras proteínas o vehículos, péptidos glucosilados, péptidos fosforilados, péptidos conjugados a restos lipófilos (por ejemplo, caproilo, laurilo, restos de estearoilo), y péptidos conjugados a un anticuerpo u otro ligando biológico.

Ejemplos de grupos sustituyentes químicos que se pueden usar para derivatizar un péptido incluyen, pero sin limitarse a, grupos alquilo, cicloalquilo y arilo; grupos acilo, incluyendo grupos alcanilo y aroilo; ésteres; amidas; halógenos; hidroxilos; carbamilos, y similares. El grupo sustituyente también puede ser un grupo de bloqueo tal como Fmoc (fluorenilmetil-O-CO-), carbobenzoxi (bencil-O-CO-), monometoxisuccinilo, naftil-NH-CO, acetilamino-caproilo y adamantil-NH-CO-. Otros derivados incluyen derivados de hidroximetilo de C-terminal, derivados modificados con O (por ejemplo, éter de bencilo e hidroximetilo con C-terminal) y derivados modificados en posición N terminal que incluyen aminas sustituidas tales como alquilamidas e hidrazidas.

La expresión "péptido cíclico", según se usa en la presente memoria, se refiere a un derivado cíclico de un péptido al cual se han añadido, por ejemplo, dos o más residuos de amino ácido adicionales apropiados para el ciclado. Estos aminoácidos adicionales se pueden añadir en el extremo de carboxilo y en el extremo amino, o pueden estar en posiciones internas. Alternativamente, un péptido cíclico puede aprovechar los residuos de cisteína que aparecen de forma natural en la secuencia de aminoácidos para formar un enlace de disulfuro y de este modo ciclar el péptido. Un péptido cíclico puede contener bien un enlace disulfuro intermolecular, es decir, -S-S-, un enlace amida intramolecular entre los dos residuos añadidos, es decir, -CONH-, o NHCO-; o enlaces S-alquilo intramoleculares, es decir, -S-(CH₂)-CONH- o -NH-CO(CH₂)_n-S-, en la que n es 1, 2 o más.

Los péptidos cíclicos que contienen un enlace disulfuro intramolecular se pueden preparar por medio de síntesis convencional en fase sólida al tiempo que se incorporan residuos apropiados de homocisteína y cisteína protegidos con S en las posiciones seleccionadas para el ciclado (véase, por ejemplo, Sahm y col., 1996, *J. Pharm. Pharmacol.* 48:197). Tras completar el conjunto de cadena, se puede llevar a cabo el ciclado bien por medio de retirada selectiva de los grupos protectores S- con una oxidación posterior sobre un soporte de las correspondientes funciones SH, para formar enlaces S-S, seguido de la retirada convencional del producto a partir del soporte y un procedimiento apropiado de purificación, o bien por medio de retirada del péptido a partir del soporte junto con desprotección completa de la cadena lateral, seguido de oxidación de las funciones-SH en una disolución acuosa altamente diluida. Similarmente, se pueden preparar los derivados cíclicos que contienen un enlace de amida intramolecular por medio de síntesis convencional en fase sólida al tiempo que se incorporan derivados apropiados de aminoácidos protegidos con cadena lateral de amino y carboxilo en las posiciones seleccionadas para el ciclado, y se pueden preparar péptidos cíclicos que contienen enlaces de alquilo-S por medio de síntesis convencional en fase sólida al tiempo que se incorpora un residuo de amino ácido con una cadena lateral apropiada protegida con amino, y un residuo de homocisteína o cisteína protegida con S en las posiciones seleccionadas para el ciclado.

Un péptido dual consiste en dos péptidos iguales o diferentes, unidos uno a otro, bien directamente o a través de un espaciador tal como un tramo corto de residuos de alanina o un sitio putativo para la proteólisis (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.126.249 y la patente europea nº 495.049). Los multímeros son moléculas poliméricas formadas a partir de un número de péptidos iguales o diferentes o sus derivados. La polimerización se lleva a cabo con un agente de polimerización apropiado, tal como 0,1 % de glutaraldehído (véase, por ejemplo, Audibert y col., 1981, *Nature* 289-593).

Un "análogo de péptido" es un péptido que comprende uno o más aminoácidos de origen natural. Los ejemplos de aminoácidos de origen natural incluyen, pero sin limitarse a, aminoácidos-D (es decir, un amino ácido de quiralidad positiva con respecto a la forma de origen natural), aminoácidos de N- α -metilo, aminoácidos de C- α -metilo, aminoácidos de β -metilo, β -alanina (β -Ala), norvalina (Nva), norleucina (Nle), ácido 4-aminobutírico (γ -Abu), ácido 2-aminobutírico (Aib), ácido 6-aminohexanoico (E-Ahx), ornitina (orn), hidroxiprolina (Hyp), sarcosina, citrulina, ácido cisteico, ciclohexilalanina, ácido α -amino isobutírico, t-butilglicina, t-butilalanina, ácido 3-aminopropiónico, ácido 2,3-diaminopropionico (2,3-diaP), D- o L-fenilglicina, D- o L-2-naftilalanina (2-Nal), ácido 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-carboxílico (Tic), D- o L-2-tienilalanina (Thi), D- o L-3-tienilalanina, D- o L-1-, 2-, 3- o 4-pirenilalanina, D- o L-(2-piridinil)-alanina, D- o L-(3-piridinil)-alanina, D- o L-(2-pirazinil)-alanina, D- o L-(4-isopropil)-fenilglicina, D-(trifluorometil)-fenilglicina, D-(trifluorometil)-fenilalanina, D-p-fluorofenilalanina, D- o L-p-bifenilalanina, D- o L-p-metoxibifenilalanina, sulfóxido de metionina (MSO) y homoarginina (Har). Otros ejemplos incluyen D- o L-2-indol(alquil)aminas y D- o L-alquilalaninas, en las que alquilo es metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, pentilo, isopropilo, iso-butilo o iso-pentilo sustituido o no sustituido y aminoácidos que no son de carboxilato fosfono- o sulfatados (por ejemplo, -SO₃H).

Como se sabe en la técnica, la sustitución de todos los aminoácidos-L por aminoácidos-D dentro de un péptido puede tener como resultado un péptido "inverso", o un péptido "retro-inverso" (véase Goodman y col. "Perspectives in Peptide Chemistry" pp. 283-294 (1981); patente de EE.UU. nº 4.522.752), ambos considerados análogos en el contexto de la presente invención. Un péptido "inverso" es uno en el que todos los aminoácidos L de la secuencia han sido reemplazados por aminoácidos-D, y un péptido "retro inverso" es uno en el que la secuencia de aminoácidos se ha invertido ("retro") y todos los aminoácidos-L han sido reemplazados por aminoácidos-D. Por ejemplo, si el péptido padre es Thr-Ala-Tyr, la forma retro es Tyr-Ala-Thr, la forma inversa es thr-ala-tyr, y la forma retro-inversa es tye-ala-thr (las letras minúsculas indican aminoácidos-D). En comparación con el péptido padre, un péptido retro-inverso tiene una cadena principal inversa al tiempo que conserva sustancialmente la conformación espacial original de cadenas laterales, dando como resultado un isómero con una topología que se parece estrechamente a la del péptido padre.

Peptidomiméticos son compuestos que son estructuralmente similares a los péptidos y contienen restos químicos que se asemejan a la función del polipéptido o péptido de la invención. Por ejemplo, si un polipéptido contiene dos restos químicos cargados que tienen actividad funcional, un mimético tiene dos restos químicos cargados en una orientación espacial y una estructura forzada de manera que la función química cargada se mantiene en el espacio de tres dimensiones. De este modo, se pretende que el término peptidomimético, incluya isómeros. El término "isómero", según se usa en la presente memoria, se refiere a una estructura química que puede estar sustituida por un polipéptido o péptido debido a que la conformación estérica de la estructura química es similar a la del péptido o

polipéptido, por ejemplo, la estructura encaja en un sitio de enlace específico para el polipéptido o el péptido. Ejemplos de peptidomiméticos incluyen péptidos que comprenden una o más modificaciones de la cadena principal (es decir, miméticos de enlace amida), que son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de miméticos de enlace amida incluyen, pero sin limitarse a, $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{SO}-$ (véase, por ejemplo, Spatola, Vega Data Vol. 1, Número 3, (1983); Spatola en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids Peptides and Proteins*, Weinstein, ed., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Morley, J. S., *Trends Pharm. Sci.* pp. 463-468 (1980); Hudson y col., *Int. J. Pept. Prot. Res.* 14:177-185 (1979); Spatola y col. *Life Sci.* 38-1243-1249 (1986); Hann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 307-314 (1982); Almquist y col., *J. Med. Chem.* 23:1392-1398 (1980); Jennings-White y col., *Tetrahedron Lett.* 23:2533 (1982); Szelke *et al.*, EP 45665 (1982); Holladay y col., *Tetrahedron Lett.* 24:4401-4404 (1983); y Hruby, *Life Sci.* 31:189-199 (1982)). Otros ejemplos de peptidomiméticos incluyen péptidos sustituidos con una o más moléculas de benzodiazepina (véase, por ejemplo, James, G. L. y col. (1993) *Science* 260:1937-1942) y péptidos que comprenden cadenas principales reticuladas para formar lactamas u otras estructuras cíclicas.

Un experto en la técnica apreciará que no es necesario modificar todos los aminoácidos de un péptido o polipéptido. Similarmente, no es necesario modificar todos los aminoácidos del mismo modo. Los derivados de péptidos, análogos y peptidomiméticos de la presente invención incluyen de este modo moléculas químicas que contienen dos o más regiones químicamente distintas, comprendiendo cada región al menos un amino ácido o su versión modificada.

Los activadores de polipéptido y péptido de los mecanismos de señalización Wnt incluyen los correspondientes a proteínas Wnt, por ejemplo, Wnt 1, Wnt 2, Wnt 3, Wnt 4, Wnt 5a, Wnt 5b, Wnt 7a y Wnt 7b humanas y Wnt 1, Wnt 2, Wnt 3a, Wnt 3b, Wnt 4, Wnt 5a, Wnt 5b, Wnt 6, Wnt 7a, Wnt 7b, Wnt 8a, Wnt 8b, Wnt 10a, Wnt 10b, Wnt 11 y Wnt 12 o sus fragmentos activos o sus variantes. También se incluyen polipéptidos correspondientes a un activador y proteínas de efector de proteínas Wnt, por ejemplo, Disheveled (Dvl); β -catenina; Fzd 1, 2, 3, ó 4; Tcf/LEF y Axina o sus fragmentos activos o sus variantes. Se conocen otros mecanismos de señalización para impactar en los mecanismos de señalización de Wnt, por ejemplo, los mecanismos mediados por caderina. De este modo, se puede considerar caderina con un efector de los mecanismos de Wnt. Los activadores de polipéptido y péptido de los mecanismos de señalización Wnt también engloban los que inhiben la actividad de las proteínas que inhiben o infra-regulan los mecanismos de señalización de Wnt, por ejemplo, glucógeno sintasa quinasa-3 α y 3 β (GSK-3 α y 3 β).

En la presente invención, el activador es una proteína Wnt, o un fragmento activo o su variante, y en particular el activador es una proteína 7a Wnt humana, o uno de sus fragmentos activos o sus variantes. Además, el activador puede comprender una combinación con proteínas wnt adicionales.

Los fragmentos activos son fragmentos de proteína de origen natural (o de tipo natural) que retienen sustancialmente la misma actividad que la proteína de tipo natural. Los fragmentos candidatos se seleccionan entre los fragmentos aleatorios generados a partir de la proteína de tipo natural o se pueden diseñar específicamente. Se somete a ensayo la actividad de los fragmentos y se compara con la de la proteína de tipo natural y se seleccionan aquellos fragmentos con sustancialmente la misma actividad que la proteína de tipo natural. Los métodos para generar fragmentos de polipéptidos se conocen en la técnica e incluyen, escisión enzimática, química o mecánica de la proteína de tipo natural o de una de sus versiones recombinantes, expresión de ácidos nucleicos que codifican dichos fragmentos, síntesis química y similares.

Un fragmento, polipéptido o proteína variante es uno en la que se han eliminado, añadido o sustituido uno o más residuos de amino ácido por los que aparecen en la secuencia de aminoácidos de la proteína de tipo natural. En el contexto de la presente invención, una variante también conserva sustancialmente la misma actividad que la proteína de tipo natural. Normalmente, cuando la variante contiene una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones "conservadoras". Una sustitución conservadora implica la sustitución de un residuo de amino ácido por otro residuo que tiene propiedades de cadena similares. Como se sabe en la técnica, se pueden agrupar los veinte aminoácidos de origen natural de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas de sus cadenas laterales. Los agrupamientos apropiados incluyen alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina y triptófano (cadenas laterales hidrófobas); glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina (cadenas laterales no cargadas y polares); ácido aspártico y ácido glutámico (cadenas laterales ácidas) y lisina, arginina e histidina (cadenas laterales básicas). Otro agrupamiento de aminoácidos es fenilalanina, triptófano y tirosina (cadenas laterales aromáticas). Una sustitución conservadora implica la sustitución de un amino ácido por otro amino ácido del mismo grupo.

En el contexto de la presente invención, se considera que un fragmento o una variante tiene sustancialmente la misma actividad que la proteína de tipo natural cuando exhibe aproximadamente 50 % de la actividad de la proteína natural. En una realización, la proteína variante o el fragmento exhiben aproximadamente 60 % de la actividad de la proteína de tipo natural. En otra realización, la proteína variante o el fragmento exhiben aproximadamente 75 % de la actividad de la proteína de tipo natural. En otra realización, la proteína variante o el fragmento exhiben aproximadamente 90 % de la actividad de la proteína de tipo natural.

Otros activadores de polipéptido contemplados por la presente invención incluyen polipéptidos y péptidos que se

unen y que inhiben una proteína que normalmente inhibe la actividad de un polipéptido de Wnt. Un ejemplo de dicha proteína sería un miembro de la proteína soluble relacionada con la familia de Frizzled (sFRP). Se conocen varios miembros de esta familia que existen en humanos, por ejemplo, sFRP 1, sFRP 2, sFRP 3 y sFRP 4.

5 Los inventores describen que el modulador puede incluir además un derivado de un péptido, análogo o peptidomimético que se une a sFRP y, de este modo, interfiere con la unión de un polipéptido Wnt al sFRP. Los inventores también describen que el modulador además incluye un derivado de péptido, análogo o peptidomimético que se une a sFRP2 o sFRP 3. Los métodos de identificación de polipéptidos o péptidos que se unen y que inhiben una proteína diana se conocen en la técnica. Un método ejemplar de identificar dichos péptidos es por medio de
 10 técnicas de presentación de bacteriófagos. Las bibliotecas de presentación de bacteriófagos de péptidos cortos aleatorios están disponibles comercialmente, por ejemplo, en New England Biolab, Inc., y se utilizan en el proceso de selección *in vitro* conocido como "selección". En su forma más simple, la selección implica en primer lugar incubar la biblioteca de los péptidos presentados por bacteriófagos con una placa, o perla, revestida con la molécula diana, posteriormente lavar las partículas de bacteriófago no ligadas, y finalmente eluir el bacteriófago específicamente
 15 unido. El(los) péptido(s) presentado(s) por el bacteriófago de unión específica se aísla(n) posteriormente y se somete(n) a secuenciación por medio de técnicas normalizadas. En algunos casos, también se puede evaluar la intensidad de la unión del péptido aislado usando técnicas normalizadas.

20 En el contexto de la presente invención, se considera que un fragmento, variante o proteína biológicamente activo tiene una actividad sustancialmente menor que la proteína de tipo natural cuando exhibe aproximadamente 75 % o menos de la actividad de la proteína de tipo natural. En otra realización, la proteína variante o el fragmento exhiben aproximadamente 60 % o menos de la actividad de la proteína de tipo natural. En otra realización, la proteína variante biológicamente activa o el fragmento exhiben aproximadamente 50 % o menos de la actividad de la proteína de tipo natural, por ejemplo, entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 40 % de la actividad de la proteína de
 25 tipo natural.

Se pueden preparar los polipéptidos y los péptidos de la presente invención por medio de métodos que se conocen en la técnica, tales como purificación a partir de extractos celulares o el uso de técnicas recombinantes. Las
 30 secuencias de aminoácidos de un gran número de polipéptidos de Wnt y otras proteínas implicadas en los mecanismos de señalización de Wnt se conocen en la técnica. La Tabla 1 proporciona los Nos de Acceso a GenBank representativos para proteínas conocidas en los mecanismos de señalización de Wnt. Los polipéptidos procedentes de una de estas secuencias, o de sus fragmentos, también se pueden sintetizar químicamente por medio de métodos que se conocen en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, síntesis exclusiva en fase sólida, síntesis parcial en fase sólida, condensación de fragmentos o síntesis en disolución clásica (Merrifield (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149; Merrifield (1986) *Science* 232:341). Se pueden purificar los polipéptidos y los péptidos usando
 35 técnicas normalizadas tales como cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad y cromatografía en columna de exclusión por tamaño o cromatografía de líquidos de alto rendimiento), centrifugación, solubilidad diferencial o por medio de otras técnicas que sean familiares para el trabajador experto en la técnica. Se ha presentado un protocolo de purificación para proteínas de Wnt por parte de Willert y col. (2003) *Nature*, 423, 448-452). Además, determinadas proteínas de los mecanismos de Wnt están disponibles comercialmente, por ejemplo, sFRP 2 y sFRP 3 (R&D Systems).
 40

Tabla 1: Números representativos de acceso a GenBank para proteínas en los mecanismos de señalización de Wnt

nº. Acceso	Identificación de proteína	Información Descriptiva
Secuencia de proteína Wnt		
Q93097	Precursor proteína Wnt-2b (Wnt-13)	gi 14424481 sp Q93097 WN2B_HUMANA[1442448]
O70283	Precursor proteína Wnt-2b (Wnt-13)	gi 6175249 sp O70283 WN2B_RATÓN[6175249]
P56705	Precursor proteína Wnt-4	gi 20532425 sp P56705 WNT4_HUMANA[20532425]
P56704	Precursor proteína Wnt-3a	gi 20532424 sp P56704 WNT3A_HUMANA[20532424]
P22724	Precursor proteína Wnt-4	gi 139761 sp P22724 WNT4_RATON[139761]
C36470	Precursor proteína Wnt-4-ratón	gi 111251 pir C36470 [111251]
P41221	Precursor proteína Wnt-5a	gi 731157 sp P41221 WN5A_HUMANA[731157]
P22725	Precursor proteína Wnt-5a	gi 139721 sp P22725 WN5A_RATON[139721]
D36470	Precursor proteína Wnt-5a-ratón	gi 111252 pir D36470 [111252]
P22726	Precursor proteína Wnt-5b	gi 14424475 sp P22726 WN5B_RATON[14424475]
Q9H1J7	Precursor proteína Wnt-5b	gi 20532427 sp Q9H1J7 WN5B_HUMANA[20532427]
E36470	Proteína Wnt-5b-ratón	gi 111253 pir E36470 [111253]

ES 2 433 493 T3

NP_033553	sitio 7A de integración MMTV relacionada sin alas; hemimelia pos-axial [<i>Mus musculus</i>]	gi 31543960 ref NP_033553.2 [31543960]
O00755	Precursor proteína Wnt-7a	gi 2501663 sp O00755 WN7A_HUMANA[2501663]
P24383	Precursor proteína Wnt-5a	gi 139731 sp P24383 WN7A_RATON[139731]
NP_004616	familia de sitio de integración MMTV de tipo sin alas, precursor de miembro 7A; proteína Wnt7a proto oncogen [<i>Homo sapiens</i>]	gi 17505191 ref NP_004616.2 [17505191]
G36470	Proteína Wnt-7a-ratón	gi 111255 pir G36470[111255]
P56706	Precursor proteína Wnt-7b	gi 20532426 sp P56706 WN7B_HUMANA[20532426]
P28047	Precursor proteína Wnt-7b	gi 139736 sp P28047 WN7B_RATON[139736]
H36470	Proteína Wnt-7b-ratón	gi 111256 pir H36470 [111256]
Secuencias de proteínas Frizzled		
NP_032081	Frizzled 4 [<i>Mus musculus</i>]	gi 31560701 ref NP_032081.2 [31560701]
Q9UP38	Precursor Frizzled 1 (Frizzled-1) (Fz-1) (hFz1) (FzE1)	gi 17433092 sp Q9UP38 FZD1_HUMANA[17433092]
Q9ULV1	Precursor Frizzled 4 (Frizzled-4) (Fz-4) (hFz4) (FzE4)	gi 17433090 sp Q9ULV1 FZD4_HUMANA[17433090]
Q14332	Precursor Frizzled 2 (Frizzled-2) (Fz-2) (hFz2) (FzE2)	gi 17433019 sp Q14332 FZD2_HUMANA[17433019]
NP_003459	Frizzled 5; receptor Wnt [<i>Homo sapiens</i>]	gi 27894385 ref NP_003459.2 [27894385]
NP_036325	Frizzled 4; receptor WNT frizzled-4 [<i>Homo sapiens</i>]	gi 22547161 ref NP_036325.2 [22547161]
Q9NPG1	Precursor Frizzled 3 (Frizzled-3) (Fz-3) (hFz3)	gi 17433071 sp Q9NPG1 FZD3_HUMANA[17433071]
Q9JIP6	Precursor Frizzled 2 (Frizzled-2) (Fz-2) (mFz2) (mFz10)	gi 17433064 sp Q9JIP6 FZD2_RATON[17433064]
Q61088	Precursor Frizzled 4 (Frizzled-4) (Fz-4) (mFz4)	gi 17433026 sp Q61088 FZD4_RATON[17433026]
Q61086	Precursor Frizzled 3 (Frizzled-3) (Fz-3) (mFz3)	gi 17433025 sp Q61086 FZD3_RATON[17433025]
O70421	Precursor Frizzled 1 (Frizzled-1) (Fz-1) (mFz1)	gi 17432987 sp O70421 FZD1_RATON[17432987]
NP_003496	Frizzled 1; Frizzled, drosófila, homólogo de, 1; receptor Wnt [<i>Homo sapiens</i>]	gi 4503825 ref NP_003496.1 [4503825]
NP_067433	Homólogo de Frizzled 3 [<i>Mus musculus</i>]	gi 10946846 ref NP_067433.1 [10946846]
NP_067432	Homólogo Frizzled 1; homólogo frizzled 1, (Drosófila) [<i>Mus musculus</i>]	gi 10946844 ref NP_067432.1 [10946844]
NP_065256	Homólogo Frizzled 2 [<i>Mus musculus</i>]	gi 10048406 ref NP_065256.1 [10048406]
NP_059108	Frizzled 3 [<i>Homo sapiens</i>]	gi 8393378 ref NP_059108.1 [8393378]
NP_001457	Frizzled 2 [<i>Homo sapiens</i>]	gi 4503827 ref NP_001457.1 [4503827]
AAH49774	Homólogo Frizzled 2 (Drosófila) [<i>Mus musculus</i>]	gi 29436746 gb AAH49774.1 [29436746]
JC7312	Proteína de Frizzled-3 - humana	gi 11359869 pir JC7312 [11359869]
JC7127	Proteína de Frizzled-4 - humana	gi 7522622 pir JC7127 [7522622]
JE0174	Proteína de Frizzled-2 - humana	gi 7512442 pir JE0174 [7512442]
JE0337	Proteína de Frizzled-1 - humana	gi 7451366 pir JC0337 [7451366]
JE0338	Proteína de Frizzled-2 - humana	gi 7451364 pir JE0338 [7451364]
AAH15256	Homólogo de Frizzled 4 (Drosófila) [<i>Mus musculus</i>]	gi 15929645 gb AAH15256.1 [15929645]
AAH25750	Homólogo de Frizzled 4 (Drosófila) [<i>Homo sapiens</i>]	gi 19343596 gb AAH25750.1 [19343596]
AAK77487	Frizzled 2 [<i>Mus musculus</i>]	gi 15011288 gb AAK77487.1 AF363723_1 [15011288]
AAF89088	Frizzled 3 [<i>Homo sapiens</i>]	gi 9664928 gb AAF89088.1 [9664928]
AAD41636	Frizzled 1 [<i>Homo sapiens</i>]	gi 5305407 gb AAD41636.1 AF072872_1 [5305407]

BAA86286	Receptor WNT Frizzled-4 [<i>Homo sapiens</i>]	gi 6277266 dbj BAA96286.1 [6277266]
AAD28286	Proteína Frizzled 2 [<i>Mus musculus</i>]	gi 4704822 gb AAD28286.1 AF139183_1 [4704822]
BAA34667	Frizzled 2 [<i>Homo sapiens</i>]	gi 3927885 dbj BAA34667.1 [3927885]
BAA34666	Frizzled 1 [<i>Homo sapiens</i>]	gi 3927883 dbj BAA34666.1 [3927883]
AAC01952	Frizzled 1 [<i>Mus musculus</i>]	gi 2222885 gb AAC01952.1 [2222885]
Secuencias de proteínas relacionadas con Frizzled segregadas/solubles		
P97401	Precursor de proteína relacionada con Frizzled (Frzb-1) (Frizzled) (Fritz) (proteína 3 de secuencia relacionada con frizzled segregada) (sFRP-3)	gi 14194747 sp P97401 FRZB_RATON[14194747]
Q92765	Precursor de proteína relacionad con Frizzled 1 (Frzb-1) (Frizzled) (Fritz)	gi 14194748 sp Q92765 FRZB_HUMANA[14194748]
NP_003005	Proteína 4 relacionada con Frizzled segregada [<i>Homo sapiens</i>]	gi 4506895 ref NP_003005.1 [4506895]
AAH34853	Proteína 4 de secuencia relacionada con frizzled segregada [<i>Mus musculus</i>]	gi 22028398 gb AAH34853.1 [22028398]
AAH14722	Proteína 2 de secuencia relacionada con frizzled segregada [<i>Mus musculus</i>]	gi 15928488 gb AAH14722.1 [15928488]
NP_057896	Proteína 4 de secuencia relacionada con frizzled segregada [<i>Mus musculus</i>]	gi 7710094 ref NP_057896.1 [7710094]
NP_038862	Proteína 1 de secuencia relacionada con frizzled segregada [<i>Mus musculus</i>]	gi 7305481 ref NP_038862.1 [7305481]
NP_035486	Proteína relacionada con frizzled; Proteína 3 de secuencia realacionada con Frizzled segregada [<i>Mus musculus</i>]	gi 6755476 ref NP_0354862.1 [6755476]
NP_033170	Proteína 2 de secuencia relacionada con frizzled segregada; factor 5 procedente de células estromales; proteína 5 de secuencia relacionada con frizzled segregada [<i>Mus musculus</i>]	gi 6677985 ref NP_033170.1 [6677985]
NP_003006	Proteína 5 relacionada con frizzled segregada; proteína 3 relacionada con apoptosis segregada [<i>Homo sapiens</i>]	gi 4506897 ref NP_003006.1 [4506897]
AAL14904	Proteína 4 relacionada con frizzled [<i>Mus musculus</i>]	gi 16151905 gb AAL14904.1 AF364906_1[16151905]
AAC53147	Proteína sFRP-3 relacionada con frizzled segregada [<i>Mus musculus</i>]	gi 1946345 gb AAC53147.1 [1946345]
AAC53146	Proteína sFRP-2 relacionada con frizzled segregada [<i>Mus musculus</i>]	gi 1946343 gb AAC53146.1 [1946343]
AAC53145	Proteína sFRP-1 relacionada con frizzled segregada [<i>Mus musculus</i>]	gi 1946341 gb AAC53145.1 [1946341]
NP_036325	frizzled 4; frizzled-4 de receptor WNT [<i>Homo sapiens</i>]	gi 22547161 ref NP_036325.2 [22547161]
NP_003003	Proteína 1 relacionada con frizzled segregada; proteína 2 relacionada con apoptosis segregada [<i>Homo sapiens</i>]	gi 8400732 ref NP_003003.2 [8400732]
Secuencias de proteínas Dishevelled		
AAH53050	Dishevelled 2, homólogo dsh [<i>Mus musculus</i>]	gi 31419842 gb AAH53050.1 [31419842]
Q92997	Homólogo Dishevelled DVL-3 de proteína de polaridad de segmento (Dishevelled -3) (homólogo DSH 3)	gi 6919875 sp Q92997 DVL3_HUMANA [6919875]
P51141	Homólogo Dishevelled DVL-1 de proteína de polaridad de segmento (Dishevelled -1) (homólogo DSH 1)	gi 1706529 sp P51141 DVL1_RATON[1706529]
NP_004412	Dishevelled 1; Dishevelled 1 (homólogo a Drosófila dsh) [<i>Homo sapiens</i>]	gi 4758214 ref NP_004412.1 [4758214]
NP_004414	Dishevelled 3; Dishevelled 3 (homólogo a Drosófila dsh) [<i>Homo sapiens</i>]	gi 6806887 ref NP_004414.2 [6806887]

NP_034221	Dishevelled, homólogo 1; Dishevelled homólogo dsh (Drosófila) [<i>Mus musculus</i>]	gi 675696 ref NP_034221.1 [675696]
NP_031915	Dishevelled 3, homólogo dsh, [<i>Mus musculus</i>]	gi 6681241 ref NP_031915.1 [6681241]
NP_031914	Dishevelled 2, homólogo dsh, [<i>Mus musculus</i>]	gi 6681239 ref NP_031914.1 [6681239]
NP_004413	Dishevelled 2; Dishevelled 2 (homólogo a Drosófila dsh) [<i>Homo sapiens</i>]	gi 675696 ref NP_034221.1 [675696]
JC5763	Proteína 3 Dishevelled - humana	gi 7512391 pir JC5763 [7512391]
AAH32459	Dishevelled, homólogo dsh 3 (Drosófila) [<i>Homo sapiens</i>]	gi 21595561 gb AAH32459.1 [21595561]
XP_147262	Dishevelled 3, homólogo dsh [<i>Mus musculus</i>]	gi 20892043 ref XP_147262.1 [20892043]
AAH14844	Dishevelled 2 (homólogo a Drosófila dsh) [<i>Homo sapiens</i>]	gi 15928771 gb AAH14844.1 AAH14844[15928771]
AAB65244	Dishevelled 3 [<i>Homo sapiens</i>]	gi 2291010 gb AAB65244.1 [2291010]
AAB65243	Dishevelled 2 [<i>Homo sapiens</i>]	gi 2291008 gb AAB65243.1 [2291008]
AAB65242	Dishevelled 1 [<i>Homo sapiens</i>]	gi 2291006 gb AAB65242.1 [2291006]
AAB84228	Dishevelled 3 [<i>Homo sapiens</i>]	gi 2612833 gb AAB84228.1 [2612833]
Secuencias de proteínas glucógeno sintasa quinasa-3 β		
P49841	Glucógeno sintasa quinasa-3 beta (GSK-3 beta)	gi 20455502 sp P49841 KG3B_HUMANA[20455502]
NP_002084	Glucógeno sintasa quinasa 3 beta [<i>Homo sapiens</i>]	gi 21361340 ref NP_002084.2 [21361340]
NP_062801	Glucógeno sintasa quinasa 3 beta [<i>Mus musculus</i>]	gi 9790077 ref NP_062801.1 [9790077]
AAD48517	Glucógeno sintasa quinasa 3 beta [<i>Homo sapiens</i>]	gi 570335 gb AAD48517.1 [570335]
Secuencias de proteínas beta-catenina		
NP_031640	Beta catenina; proteína asociada a caderina; beta-catenina [<i>Mus musculus</i>]	gi 6671684 ref NP_031640.1 [6671684]
P35222	Beta-catenina (PRO2286)	gi 461854 sp P35222 CTNB_HUMANA [461854]
Q02248	Beta-catenina	gi 399310 sp Q02248 CTNB_RATON [399310]
NP_001895	Catenina (proteína asociada a caderina), beta 1, 88 kDa; catenina (proteína asociada a caderina), beta 1 (88 kD); catenina (proteína asociada a caderina), beta 1 (88 kDa) [<i>Homo sapiens</i>]	gi 4503131 ref NP_001895.1 [4503131]

Secuencias de ácido nucléico

5 En una realización de la presente invención, se producen los polipéptidos y los péptidos por medio de técnicas recombinantes. Normalmente, esto implica la transformación (incluyendo transfección, transducción o infección) de una célula huésped apropiada con un vector de expresión que comprende todo o parte de ADN que codifica el polipéptido o el péptido. Las secuencias de genes para muchas proteínas implicadas en los mecanismos de señalización de Wnt se conocen en la técnica. La Tabla 2 proporciona los Nos de Acceso de GenBank representativos para genes que codifican proteínas conocidas en los mecanismos de señalización de Wnt.

10 Tabla 2: Números representativos de acceso a GenBank para genes que codifican proteínas en los mecanismos de señalización de Wnt

nº. Acceso	Identificación de proteína	Información Descriptiva
Secuencia de Nucleótidos Wnt		
NM_003392	Familia de sitio de integración MMTV de tipo sin alas <i>Homo sapiens</i> , miembro 5A (WNT5A), ARNm	gi 17402917 ref NM_003392.2 [17402917]
NM_009524	Sitio de integración 5A MMTV relacionado sin alas <i>Mus musculus</i> (Wnt5a), ARNm	gi 6678596 ref NM_009524.1 [6678596]

ES 2 433 493 T3

AK031512	ADNc de testículo macho embrionario de 13 días <i>Mus musculus</i> , biblioteca enriquecida de longitud completa RIKEN, clon: 6030445L03 producto: PRECURSOR DE PROTEÍNA WNT-5A, secuencia de inserto completa	gi 26327372 djb AK031512.1 [26327372]
AK078764	ADNc de testículo macho embrionario de 13 días <i>Mus musculus</i> , biblioteca enriquecida de longitud completa RIKEN, clon: 8030457G12 producto: PRECURSOR DE PROTEÍNA WNT-5A, secuencia de inserto completa	gi 26098096 dbj AK078764.1 [26098096]
AK032977	<i>Mus musculus</i> de conducto de Wolff macho embrionario de 12 días incluye ADNc de la región circundante, biblioteca enriquecida de longitud completa RIKEN, clon: 6720483L10 producto: PROTEÍNA WNT-5A	gi 26083139 dbj AK032977.1 [26083139]
U39837	Gen Wnt-5A humano, región de promotor	gi 1314288 gb US39837.1 HSU39837[1314288]
M89798	ARNm Wnt-5a de ratón, cds completo	gi 202403 gb M89798.1 MUSWNTVA[202403]
L20861	ARNm de proto-oncogen de Homo sapiens (Wnt-5a), cds completo	gi 348917 gb L20861.1 HUMWNT5A[348917]
NM_009525	Sitio de integración 5B de MMTV relacionado sin alas de <i>Mus musculus</i> (Wnt5b), ARNm	gi 31560626 ref NM_009525.2 [31560626]
NM_032642	Familia de sitio de integración MMTV de tipo sin alas <i>Homo sapiens</i> , miembro 5B (WNT5B), variante de transcripción 1, ARNm	gi 17402920 ref NM_032642.2 [17402920]
NM_030775	Familia de sitio de integración MMTV de tipo sin alas <i>Homo sapiens</i> , miembro 5B (WNT5B), variante de transcripción 2, ARNm	gi 17402918 ref NM_030775.2 [17402918]
AI894033	mg77a09 y 1. Clon de ADNc de <i>Mus musculus</i> NbME13.5 14.5 embrionario de ratón Soares	gi 5599935 gb AI894033.1 [5599935]
BC052266	Homólogo 2 de frizzled de <i>Homo sapiens</i> (Drosófila), ARNm (clon de ADNc IMAGEN: 6578442), cds parcial	gi 30353963 gb BC052266.1 [30353963]
NM_012193	Homólogo 4 de frizzled de <i>Homo sapiens</i> (Drosófila) (FZD4), ARNm	gi 22547160 ref NM_012193.2 [22547160]
NM_003505	Homólogo 1 de frizzled de <i>Homo sapiens</i> (Drosófila) (FZD1), ARNm	gi 4503824 ref NM_003505.1 [4503824]
NM_017412	Homólogo 3 de frizzled de <i>Homo sapiens</i> (Drosófila) (FZD3), ARNm	gi 22035685 ref NM_017412.2 [22035685]
AF139183	ARNm de proteína Frizzled-2 de <i>Mus musculus</i> , cds parcial	gi 4704821 gb AF139183.1 AF139183[4704821]
U82169	ARNm de de homólogo de Frizzled humano (FZD3), cds completo	gi 1906597 gb U82169.1 HSU82169[1906597]
U43205	ARNm de proteína de Frizzled-3 de <i>Mus musculus</i> , cds completo	gi 1151179 gb U43205.1 MMU43205[1151179]
Secuencias de Nucleótido Relacionado con Frizzled Segregado/Soluble		
NM_018780	Proteína 5 de secuencia relacionada con frizzled segregada de <i>Homo sapiens</i> (Sfrp5), ARNm	gi 31560420 ref NM_018780.2 [31560420]
BC008666	Proteína 2 relacionada con frizzled segregada de <i>Homo sapiens</i> , ARNm (clon de ADNc MGC: 9395)	gi 14250457 gb BC008666.1 [14250457]
XM_050625	Proteína 2 relacionada con frizzled segregada (SRFP2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	gi 27477718 ref XM_050625.2 [27477718]
NM_003014	Proteína 4 relacionada con frizzled segregada (SRFP4) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	gi 8400733 ref NM_003014.2 [8400733]
NM_003012	Proteína 1 relacionada con frizzled segregada de <i>Homo sapiens</i> IMAGEN: 439000 5' similar a gb: M89799 Raton Wnt-5b ARNm, cds completo (RATÓN);	gi 8400731 ref NM_003012.2 [8400731]
AI686324	tt93e10.x1 NCI_CGAP_Pr 28 clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGEN: 2249130 3' similar a SW: WN5B_RATON P22726 PRECURSOR DE PROTEÍNA WNT-5B, secuencia de ARNm	gi 4897618 gb AI686324.1 [4897618]
M89799	ARNm Wnt-5b de Ratón, cds completo	gi 202405 gb M89799.1 MUSWNTVB[202405]
NM_009527	Sitio de integración 7A de MMTV relacionado sin alas de <i>Mus musculus</i> (Wnt7a), ARNm	gi 31543959 ref NM_009527.2 [31543959]

ES 2 433 493 T3

NM_004625	Familia de sitio de integración MMTV, tipo sin alas de <i>Homo sapiens</i> , miembro 7A (WNT7A), ARNm1	gi 17505190 ref NM_004625.2 [17505190]
M89801	ARNm Wnt-7a de Ratón, cds completo	gi 202409 gb M89801.1 [202409]
NM_058238	Familia de sitio de integración MMTV, tipo sin alas de <i>Homo sapiens</i> , miembro 7B (WNT7B), ARNm	gi 17505192 ref NM_058238.1 [17505192]
NM_009528	Sitio de integración 7B de MMTV relacionada sin alas de <i>Mus musculus</i> (Wnt7b), ARNm	gi 6678604 ref NM_009528.1 [6678604]
M89802	ARNm Wnt-7b de Ratón, cds completo	gi 202411 gb M89802.1 MUSWNTVIIIB[202411]
Secuencia de Nucleótidos Frizzled		
BC051271	Homólogo 1 de frizzled de <i>Homo sapiens</i> (Drosófila), ARNm (clon de ADNc MGC: 59857 IMAGEN: 4874253), (SFRP1) completo, ARNm	gi 30410973 gb BC051271.1 [30410973]
BC034853	Proteína 4 de secuencia relacionada con frizzled segregada de <i>Mus musculus</i> , ARNm (clon de ADNc)	gi 22028397 gb BC034853.1 [22028397]
BC032921	Proteína 5 de secuencia relacionada con frizzled segregada de <i>Mus musculus</i> , ARNm (clon de ADNc MGC:41101 IMAGEN: 1395864), cds completo	gi 21411182 gb BC032921.1 [21411182]
BC014722	Proteína 2 de secuencia relacionada con frizzled segregada de <i>Mus musculus</i> , ARNm (clon de ADNc)	gi 15928487 gb BC014722.1 [15928487]
BC050435	Proteína 5 relacionada con frizzled segregada, <i>Homo sapiens</i> , clon IMAGEN: 6189478, ARNm	gi 29791957 gb BC050435.1 [29791957]
NM_016687	Proteína 4 de secuencia relacionada con frizzled segregada de <i>Mus musculus</i> (Sfrp4), ARNm	gi 7710093 ref NM_016687.1 [7710093]
NM_003015	Proteína 5 de secuencia relacionada con frizzled segregada de <i>Mus musculus</i> (SFRP5), ARNm	gi 8400734 ref NM_003015.2 [8400734]
NM_013834	Proteína 1 de secuencia relacionada con frizzled segregada de <i>Mus musculus</i> (Sfrp1), ARNm	gi 7305480 ref NM_013834.1 [7305480]
NM_011356	Proteína relacionada con frizzled de <i>Mus musculus</i> (Frzb), ARNm	gi 6755475 ref NM_011356.1 [6755475]
NM_0009144	Proteína 2 de secuencia relacionada con frizzled segregada de <i>Mus musculus</i> (Sfrp2), ARNm	gi 6677894 ref NM_009144.1 [6677894]
NM_001463	Proteína relacionada con frizzled de <i>Homo sapiens</i> (FRZB), ARNm	gi 4503788 ref NM_001463.1 [4503788]
BC047684	<i>Homo sapiens</i> , similar a proteína 4 relacionada con frizzled segregada, clon	gi 28839285 gb BC047684.1 [28839285]
BC026165	<i>Homo sapiens</i> , similar a proteína 4 relacionada con frizzled segregada; proteína 4 relacionada con frizzled segregada, clon MGC: 26778 IMAGEN: 4837530, ARNm, cds completo	gi 20072880 gb BC026165.1 [20072880]
BC_004466	<i>Homo sapiens</i> , similar a proteína 1 relacionada con frizzled segregada; clon IMAGEN: 3501872, ARNm	gi 14709105 gb BC004466.1 BC004466[14709105]
Secuencias de Nucleótidos Dishevelled		
CD579766	1074 hEx1 (RZPD nº 800) clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> 11960 5'similar a HOMÓLOGO DVL-1 DISHEVELEDEDE PROTEÍNA DE POLARIDAD DE SEGMENTO (DISHEVELLED-1) (HOMÓLOGO DSH-1). Fuente: SWISSPROT; Acc: O14640], secuencia de ARNM	gi 31744091 gb CD579766.1 [31744091]
BC053050	Dishevelled 2 de <i>Mus musculus</i> , homólogo de dsh (Drosófila), ARNm (clón de ADNc MGC: 62321 IMAGEN: 6402000), cds completo	gi 31419841 gb BC053050.1 [31419841]
NM_004421	Dishevelled de <i>Homo sapiens</i> , homólogo dsh 1 (Drosófila) (DVL1), ARNm	gi 4758213 ref NM_004421.1 [4758213]
NM_004423	Dishevelled de <i>Homo sapiens</i> , homólogo dsh 3 (Drosófila) (DVL3), ARNm	gi 6806886 ref NM_004423.2 [6806886]

NM_010091	Dishevelled de <i>Mus musculus</i> , homólogo dsh 1 (Drosófila) (Dvl1), ARNm	gi 6753695 ref NM_010091.1 [6753695]
NM_007889	Dishevelled 3 de <i>Mus musculus</i> , homólogo de dsh (Drosófila) (Dv13), ARNm	gi 6681240 ref NM_007889.1 [6681240]
NM_007888	Dishevelled 2 de <i>Mus musculus</i> , homólogo de dsh (Drosófila) (Dv12), ARNm	gi 6681238 ref NM_007888.1 [6681238]
NM_004422	Dishevelled de <i>Homo sapiens</i> , homólogo dsh 2 (Drosófila) (DVL2), ARNm	gi 4758215 ref NM_004422.1 [4758215]
BC025292	<i>Homo sapiens</i> , Dishevelled, homólogo dsh 1 (Drosófila), clon IMAGEN: 4554266, ARNm	gi 19263756 gb BC025292.1 [19263756]
U28138	Proteína 1 Dishevelled de <i>Mus musculus</i> (Dv11) gen, cds completo	gi 930346 gb U28138.1 [930346]
BC014844	<i>Homo sapiens</i> , Dishevelled 2 (homólogo a Drosófila dsh), clon MGC: 9545 IMAGEN: 3852554, ARNm	gi 15928770 gb BC014844.1 BC014844[15928770]
U41285	ARNm Dishevelled -3 de <i>Mus musculus</i> (Dvl-3), cds completo	gi 1353660 gb U41285.1 MMU41285[1353660]
Secuencias de Nucleótidos de Glucógeno Sintasa Quinasa-3 Beta		
XN_291773	<i>Homo sapiens</i> , similar a glucógeno sintasa quinasa-3 beta (GSK-3 beta) (LOC340894), ARNm	gi 29740969 ref XM_291773.1 [29740969]
BC006936	<i>Mus musculus</i> glucógeno sintasa quinasa 3 beta, ARNm (clón de ADNc MGC: 6814)	gi 13905273 gb BC006936.1 [13905273]
NM_002093	<i>Homo sapiens</i> glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3B), ARNm	gi 21361339 ref NM_002093.2 [21361339]
NM_019827	<i>Mus musculus</i> glucógeno sintasa quinasa 3 beta (Gsk3b), ARNm	gi 9790076 ref NM_019827.1 [9790076]
AY123976	<i>Homo sapiens</i> glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3B) ARNm, cds parcial, empalmado de forma alternativa	gi 27764568 gb AY123976.1 [27764568]
AF156099	<i>Mus musculus</i> glucógeno sintasa quinasa 3 beta ARNm, cds completo	gi 7025914 gb AF156099.2 AF156099[7025914]
AF098789	<i>Homo sapiens</i> glucógeno sintasa quinasa 3-beta gen, cds parcial	gi 3800882 gb AF098789.1 [3800882]
Secuencia de Nucleótidos de Beta-Catenina		
NM_007614	<i>Mus musculus</i> catenina beta (Catnb), ARNm	gi 31560726 ref NM_007614.2 [31560726]

- Las secuencias de ácido nucleico que codifican un modulador de polipéptido o péptido de acuerdo con la presente invención se pueden purificar fácilmente a partir de una fuente apropiada por medio de técnicas normalizadas, o se pueden sintetizar por vía química. Los ácidos nucleicos pueden ser ADN genómico, ARN, ADNc preparado a partir de ARNm aislado, o ADN amplificado a partir de una secuencia de ácidos nucleicos de origen natural por medio de técnicas normalizadas. Las fuentes apropiadas para obtener ácidos nucleicos son aquellas células que se sabe que expresan proteínas de Wnt y otras proteínas en la cascadas de señalización de Wnt. Un ejemplo de dichas células serían los mioblastos primarios.
- 10 Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican fragmentos o variantes de proteínas de tipo natural se pueden construir por medio de eliminación, adición y/o sustitución de uno o más nucleótidos dentro de la secuencia de codificación usando técnicas normalizadas, tal como mutagénesis dirigida a un sitio.
- 15 Los polipéptidos y los péptidos de la presente invención también se pueden producir en forma de proteínas de condensación. Un uso de dichas proteínas de condensación consiste en mejorar la purificación o detección del polipéptido o péptido. Por ejemplo, se puede condensar un polipéptido o péptido a un dominio de inmunoglobulina Fc y se puede purificar fácilmente la proteína resultante usando una columna de proteína A. Otros ejemplos de proteínas de condensación incluyen polipéptidos o péptidos condensados a marcas de histidina (permitiendo la purificación sobre columnas de resina de Ni²⁺), a glutatión-S-transferasa (permitiendo la purificación sobre columnas de glutatión) o a biotina (permitiendo la purificación sobre columnas de estreptavidina o con perlas magnéticas marcadas con estreptavidina).
- 20 Se pueden requerir señales específicas de iniciación para la translación eficaz de secuencias de ácido nucleico clonadas. Estas señales incluyen el codon de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En los casos en los que se inserta un gen de tipo natural entero o ADNc, incluyendo su propio codon de iniciación y secuencias adyacentes, en el vector de expresión apropiado, puede ocurrir que no sean necesarias señales de control traslacional adicionales. En otros casos, se pueden proporcionar señales exógenas de control traslacional, incluyendo, quizás, el codon de
- 25

5 iniciación ATG. Además, el codon de iniciación debe estar en fase con el bloque de lectura de la secuencia de codificación deseada para garantizar la traslación de todo el inserto. Las señales exógenas de control traslacional y los codones de iniciación pueden ser naturales o sintéticos. Se puede mejorar la eficacia de expresión por medio de la inclusión de elementos apropiados mejoradores de la transcripción y/o terminadores de transcripción (Bittner y col. (1987) *Methods in Enzymol.* 153, 516).

10 Los vectores de expresión apropiados para uso con las secuencias de ácido nucleico de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, plásmidos, fagómidos, partículas víricas y vectores, bacteriófagos y similares. Para las células de insectos, los vectores de expresión de baculovirus son apropiados. Para células de plantas los vectores de expresión víricos (tales como el virus de mosaico de la coliflor y el virus mosaico del tabaco) y los vectores de expresión de plásmidos (tales como el plásmido Ti) son apropiados. Se puede integrar el vector de expresión completo, o una de sus partes, en el interior del genoma de una célula huésped. En algunas circunstancias, resulta deseable emplear un vector de expresión inducible, por ejemplo, el Sistema de Expresión Inducible LACSWITH™ (Stratagene, LaJolla, CA).

15 Los expertos en el campo de la biología molecular comprenderán que se puede usar una amplia variedad de sistemas de expresión para proporcionar el polipéptido recombinante o el péptido. La célula huésped precisa usada no es crítica para la invención. Se pueden producir el polipéptido o el péptido en un huésped procarionta (por ejemplo, *E. coli* o *B. subtilis*) o en un huésped eucariota (por ejemplo, *Saccharomyces* o *Pichia*; células de mamíferos, tales como COS, NIH 3T3, CHO, BHK, 293, 293-T, ATt-20, o células de HeLa; células de insectos; o células de plantas). Los métodos de transformación o transfección y la elección del vector de expresión dependerán del sistema de huésped seleccionado y se pueden determinar fácilmente por parte de un experto en la técnica. Los métodos de transformación y transfección se describen, por ejemplo, en Ausubel y col. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York; y se pueden escoger varios vectores de expresión a partir de los proporcionados, por ejemplo, en *Cloning Vectors: A Laboratory Manual* (Pouwels y col., 1985, Supp. 1987).

30 Además, se puede escoger una célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto de gen de una forma deseada y específica. Dichas modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesado (por ejemplo, escisión) de los productos de proteína pueden ser importantes para la actividad de la proteína. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesado pos-traslacional y la modificación de proteínas y productos génicos. Se pueden escoger líneas celulares apropiadas o sistemas de huésped por parte del experto en la técnica, con el fin de garantizar la correcta modificación y procesado de la proteína extraña expresada.

35 Las células huésped que albergan el vehículo de expresión se pueden someter a cultivo en un medio con nutrientes convencional adaptado, según sea necesario, para la activación de un gen seleccionado, represión de un gen seleccionado, selección de transformantes o amplificación de un gen seleccionado.

40 (iii) Oligonucleótidos

La presente invención también contempla inhibidores de nucleótidos y activadores que son dirigidos a un gen Wnt o un gen que codifica un activador o un efector de una proteína Wnt o gen. En el contexto de la presente invención, las expresiones "inhibidor de oligonucleótido" y "activador de oligonucleótido" engloban oligonucleótidos antisentido, moléculas de ARN interferente corto (ARNsi), ribozimas y oligonucleótidos de formación de hélice triple.

45 El término "oligonucleótido", según se usa en la presente memoria, se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN) o sus versiones modificadas, o miméticos de ARN o ADN. Este término, por tanto, incluye oligonucleótidos formados por nucleobases de origen natural, azúcares y uniones covalentes entre nucleósidos (cadena principal) así como también oligonucleótidos que tienen partes que no son de origen natural, que funcionan de forma similar. Con frecuencia, se prefieren dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos con respecto a las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, una captación celular mejorada, una afinidad mejorada por la diana de ácido nucleico y una estabilidad mejorada en presencia de nucleasas. El término también incluye oligonucleótidos quiméricos. Los oligonucleótidos quiméricos son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, comprendiendo cada región al menos una unidad monomérica. Los oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención pueden ser de hebra individual o de hebra doble.

60 Ejemplos de oligonucleótidos útiles en la presente invención incluyen los que contienen cadenas principales modificadas o uniones entre nucleótidos de origen no natural tales como fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosfoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros fosfonatos de alquilo que incluyen fosfonatos de 3'-alquilo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforoamidatos que incluyen 3'-amino fosforoamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforoamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen uniones 3'-5' normales, análogos de estos con unión 2'-5' y análogos que tienen polaridad invertida en los cuales los pares adyacentes de unidades de nucleósido están unidos 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen varias sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

- Otros ejemplos de cadenas principales modificadas contempladas por la presente invención incluyen las formadas por uniones entre nucleósidos de cicloalquilo o alquilo de cadena corta, uniones mixtas entre nucleósidos de cicloalquilo o alquilo y heteroátomo, o una o más uniones entre nucleósidos heterocíclicas o heteroatómicas de cadena corta. Dichas cadenas principales incluyen uniones morfolino (formadas en cierto modo a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; sulfuro, sulfóxido y cadenas principales de sulfona; cadenas principales de formaceto y tioformaceto; cadenas principales de metil formaceto y tioformaceto; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metilenoimino y metilenoimidazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otros que tienen N, O, S y partes de componentes de CH₂ mixtas.
- El término "alquilo", según se usa en la presente memoria, se refiere a grupos alquilo monovalentes que tienen de 1 a 20 átomos de carbono. Ejemplos de grupos alquilo apropiados incluyen, pero sin limitarse a, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo n-hexilo y similares.
- El término "cicloalquilo" se refiere a grupos ciclo alquilo de 3 a 20 átomos de carbono que tienen un anillo cíclico individual o anillos condensados múltiples. Ejemplos de grupos cicloalquilo apropiados incluyen, pero sin limitarse a, estructuras de anillo individuales tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclooctilo y similar, o estructuras de anillo múltiple tales como adamantilo y similares.
- La presente invención también contempla miméticos de oligonucleótido en los cuales se sustituyen tanto la unión de azúcar como la unión entre nucleósidos de las unidades de nucleótido por grupos nuevos. Se mantienen las unidades de base para la hibridación con una diana apropiada de ácido nucleico. Un ejemplo de dicho mimético de oligonucleótido, que se ha visto que tiene propiedades de hibridación excelentes, es un ácido nucleico de péptido (PNA) [Nielsen y col., *Science*, 254:1497-1500 (1991)]. En los compuestos de PNA, se sustituye la cadena principal de azúcar de un oligonucleótido por una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Se conservan las nucleobases y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno-aza de la parte de amida de la cadena principal.
- La presente invención también contempla oligonucleótidos que comprenden "ácidos nucleicos bloqueados" (LNAs) que son análogos nuevos de oligonucleótido con restricción conformacional que contienen un puente de metileno que conecta el O-2' de la ribosa con el C-4' (véase Singh y col., *Chem. Commun.*, 1998, 4:455-456). Los LNA y los análogos de LNA muestran estabildades térmicas de duplicidad muy elevadas con ADN complementario y ARN, estabilidad frente a la degradación de 3'-exonucleasa, y buenas propiedades de solubilidad. Se han descrito la síntesis de análogos de LNA de adenina, citosina, guanina, 5-metilcitosina, timina y uracilo, su oligomerización, y las propiedades de reconocimiento de ácido nucleico (véase Koshkiny col., *Tetrahedron*, 1998, 54:3607-3630). Los estudios de secuencias emparejadas muestran que LNA obedece las reglas de emparejamiento de bases de Watson-Crick con una selectividad generalmente mejorada en comparación con las correspondientes hebras de referencia no modificadas.
- Se han descrito los oligonucleótidos antisentido que contienen LNAs (Wahlestedt y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 2000, 97:5633-5638), que fueron eficaces y no tóxicos. Además, los copolímeros de LNA/ADN no se degradaron fácilmente en suero sanguíneo y extractos celulares. Las LNAs forman duplas con ADN complementario o ARN o con LNA complementario, con elevadas afinidades térmicas. Se ha enfatizado la universalidad de la hibridación mediada por LNA por medio de la formación de duplas LNA:LNA sumamente estables (Koshin y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120:13252-13253). Se comprobó que la hibridación LNA:LNA era el sistema de duplas de tipo ácido nucleico más estable térmicamente, y se estableció el carácter que tiene LNA de imitación de ARN a nivel de dupla. La introducción de los tres monómeros de LNA (T o A) dio como resultado puntos de fusión significativamente mayores para los complementos de ADN.
- Se ha descrito la síntesis de 2'-amino-LNA (Singh y col., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039) y 2'-metilamino-LNA y la estabilidad térmica de sus duplas con hebras de ADN y ARN complementario presentadas. También se ha descrito la preparación de fosforotionato-LNA y 2'-tio-LNA (Kumar y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8:2219-2222).
- Los oligonucleótidos modificados de acuerdo con la presente invención pueden también contener uno o más restos de azúcar sustituido. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden comprender azúcares con uno de los siguientes sustituyentes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, en el que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ sustituido o no sustituido o alqueno C₂ a C₁₀ y alquino. Ejemplos de dichos grupos son: O[(CH₂)_nO]CH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, en las que n y m son de 1 a aproximadamente 10. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden comprender uno de los siguientes sustituyentes en la posición 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SHC₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂, CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, y un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para la mejora de las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para la mejora de las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Ejemplos específicos incluyen 2'-O-

metil(2'-O-CH₃), 2'-metoxietoxi(2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietil) o 2'-MOE) [Martin y col., *Helv. Chim. Acta*, 78:486-504(1995)], grupo 2'-dimetilaminooxietoxi (2'-O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro(2'-F).

- 5 También se pueden llevar a cabo modificaciones similares en otras posiciones del oligonucleótido, en particular en la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en los oligonucleótidos con unión 2'-5' y en la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden comprender miméticos de azúcar tales como restos de ciclobutilo en lugar del azúcar de pentofuranosilo.
- 10 Los oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención también pueden incluir modificación o sustituciones en la nucleobase. Según se usa en la presente memoria, nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G) y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Nucleobases modificadas incluyen otros nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C); inosina; 5-hidroximetil citosina; xantina; hipoxantina; 2-aminoadenina; derivados de 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina; derivados de 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina; 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina; 5-halouracilo y citosina; 5-propinil uracilo y citosina; 6-azo uracilo, citosina y timina; 5-uracilo (seudouracilo); 4-tiouracilo; 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras guaninas y adeninas con sustitución-8; 5-halo en particular 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos con sustitución-5 y citosinas; 7-metilguanina y 7-metiladenina; 8-azaguanina y 8-azaadenina; 7-deazaguanina y 7-deazaadenina; 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Nucleobases adicionales incluyen las descritas en la patente de EE.UU. n.º. 3.687.808; *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering*, (1990) pp 858-859, Kroschwitz, J. I., ed John Wiley & Sons; *Englisch y col, Angewandte Chemie, Int. Ed.*, 30:613 (1991); y Sanghvi, Y.S., (1993) *Antisense Research and Applications*, pp 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., ed. CRC Press. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de enlace de los compuestos oligoméricos de la invención. Estas incluyen pirimidinas con sustitución-5, 6-azapirimidinas y purinas con sustitución N-2, N-6 y O-6, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha comprobado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad de la dupla de ácidos nucleico en 0,6~1,2 °C [Sanghvi, Y.S., (1993) *Antisense Research and Applications*, pp 276-278, Crooke, S.T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, Boca Raton]. Otra modificación de oligonucleótido incluida en la presente invención es la unión química al oligonucleótido de uno o más restos o conjugados que mejoran la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Dichos restos incluyen, pero sin limitarse a, restos de lípidos tales como un resto de colesterol [Letsinger y col, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 86:6553-6556 (1989)], ácido cólico [Manoharan y col, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 4:1053-1060 (1994)], un tioéter, por ejemplo hexil-S-tritilol [Manoharan y col., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660:306-309 (1992); Manoharan y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 3:2765-2770 (1993)], un tiocolesterol [Oberhauser y col., *Nucl. Acids Res.*, 20:533-538 (1992)], una cadena alifática, por ejemplo dodecandiol o residuos de undecilo [Saison-Behmoaras y col., *EMBO J.*, 10:1111-1118 (1991); Kabanov y col., *FEBS Lett.*, 259:327-330 (1990); Svinarchuk y col., *Biochimie*, 75:49-54 (1993)], un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio [Manoharan y col., *Tetrahedron Lett.*, 36:3651-3654 (1995); Shea y col., *Nucl. Acids Res.*, 18:3777-3783 (1990)], una poliamina o una cadena de polietilen glicol [Manoharan y col., *Nucleosides & Nucleotides*, 14:969-973 (1995)] o ácido adamantan acético [Manoharan y col., *Tetrahedron Lett.*, 36:3651-3654 (1995)], un resto de palmitilo [Mishra y col., *Biochim., Biophys. Acta*, 1264:229-237 (1995)] o un resto de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol [Crooke y col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 227:923-937 (1996)].

45 El experto en la técnica reconocerá que no es necesario que todas las posiciones del oligonucleótido dado se modifiquen de manera uniforme. Por tanto, la presente invención contempla la incorporación de más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas para dar lugar a un oligonucleótido individual o incluso a un nucleósido individual dentro del oligonucleótido.

50 Como se ha comentado anteriormente, los oligonucleótidos que son compuestos químicos se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Los oligonucleótidos químicos normalmente contienen al menos una región en la que el oligonucleótido se modifica de manera que confiera una mayor resistencia frente a la degradación de nucleasa, mayor captación celular y/o mayor afinidad de enlace por el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN.

55 En el contexto de la presente invención, un oligonucleótido es "resistente a nucleasa" cuando bien ha sido modificado de manera que no sea susceptible a la degradación por parte de ADN o ARN nucleasas o bien, alternativamente, ha sido colocado en un vehículo de suministro que protege por sí mismo el oligonucleótido frente a ADN y ARN nucleasas. Los oligonucleótidos resistentes a nucleasas incluyen, por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosfotriésteres y morfolino oligómeros. Los vehículos de suministro apropiados para conferir resistencia a nucleasas incluyen, por ejemplo, liposomas.

La presente invención además contempla oligonucleótidos que contienen grupos para mejorar las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas del oligonucleótido.

65 La expresión "oligonucleótido antisentido", según se usa en la presente memoria, indica un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótido que es complementaria a una parte del ARNm transcrito a partir de un gen de interés.

En el contexto de la presente invención, un gen de interés es un gen que codifica una proteína de interés, es decir, una proteína de los mecanismos de señalización de Wnt y los oligonucleótidos antisentido se dirigen a ese gen. El proceso de dirección incluye la determinación de un sitio, o sitios, dentro de esta secuencia de ácido nucleico para que tenga lugar la interacción antisentido de manera que suceda el efecto deseado, es decir, la modulación de la expresión de la proteína codificada por el gen. Una vez que se ha identificado el sitio diana, o sitios, se escogen los oligonucleótidos que son suficientemente complementarios (es decir, hibridan con suficiente intensidad y especificidad) con la diana para dar el resultado deseado.

Generalmente, existen cinco regiones de un gen, o de su forma transcrita de ARNm, que pueden ser consideradas diana para la modulación antisentido: la región 5' no sometida a translación (5'-UTR), la región del codon de iniciación (o comienzo) de translación, el tramo de lectura abierta (ORF), la región del codon de terminación (o interrupción) de translación y la región 3' no sometida a translación (3'-UTR).

Como se sabe en la técnica, algunas fracciones transcritas eucariotas son sometidas a translación directamente, sin embargo, la mayoría de los genes de mamíferos, o tramos de lectura abierta (ORFs), contienen una o más secuencias, conocidas como "intrones", que se escinden a partir de una fracción transcrita antes de que se produzca la translación. Las partes expresadas (no escindidas) de ORF son denominadas "exones" y se empalman juntas para formar una fracción transcrita de ARNm (Alberts y col., (1983) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing Inc., Nueva York, pp. 411-415). En el contexto de la presente invención, ambos intrones y exones pueden servir como dianas para antisentido así como también para sitios de empalme de intrones/exones. Además, las moléculas de ARNm poseen una región de cubierta 5' que también puede servir como diana para antisentido. La cubierta 5' de un ARNm comprende un residuo de guanosina metilado unido al residuo más en la posición 5' del ARNm por medio de un enlace trifosfato 5'-5'. Se considera que la región de cubierta 5' del ARNm incluye la propia estructura de cubierta 5' así como también los primeros 50 nucleótidos adyacentes a la cubierta.

Los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la presente invención están seleccionados entre una secuencia complementaria de un gen de interés de manera que la secuencia exhiba la mínima probabilidad de formación de duplas, horquillas, o de contener repeticiones de homooligómero/secuencia. El oligonucleótido además puede contener un elemento de sujeción GC. El experto en la técnica apreciará que se pueden determinar estas propiedades cuantitativamente usando varios programas de modelización por ordenador, por ejemplo, el programa OLIGO® Primer Analysis Software, Versión 5.0 (distribuido por National Biosciences, Inc., Plymouth, MN).

Se comprende en la técnica que no es necesario que un oligonucleótido antisentido tenga un 100 % de identidad con el complemento de su secuencia diana con el fin de resultar eficaz. Los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la presente invención, por tanto, tienen una secuencia que es al menos aproximadamente 70 % idéntica al complemento de la secuencia diana. En una realización de la presente invención, los oligonucleótidos antisentido tienen una secuencia que es al menos aproximadamente 80 % idéntica al complemento de la secuencia diana. En otras realizaciones, presentan una secuencia que es al menos aproximadamente 90 % idéntica o al menos aproximadamente 95 % idéntica al complemento de la secuencia diana, permitiendo huecos o desajustes de varias bases. Se puede determinar la identidad, por ejemplo, mediante el uso de un soporte lógico de programa BLASTIN del Grupo de Computación (GCG) de la Universidad de Wisconsin.

Con el fin de que los oligonucleótidos antisentido de la presente invención funcionen para inhibir la expresión de un gen de interés, es necesario que demuestren la especificidad apropiada para la secuencia diana y no se unan a otras secuencias de ácido nucleico de la célula. Por tanto, además de poseer un nivel apropiado de identidad de secuencia con el complemento de la secuencia diana, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención no deberían parecerse estrechamente a otras secuencias conocidas. Por tanto, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención, deberían ser menos de 50 % idénticos a cualquier otra secuencia de ácido nucleico de mamíferos.

Los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la presente invención tienen normalmente entre 7 a 1000 nucleótidos de longitud. En una realización, los oligonucleótidos antisentido comprenden de aproximadamente 7 a aproximadamente 50 nucleótidos, o análogos de nucleótido. En otra realización, los oligonucleótidos antisentido comprenden de aproximadamente 7 a aproximadamente 35 nucleótidos, o análogos de nucleótido. En otras realizaciones, los oligonucleótidos antisentido comprenden de aproximadamente 12 a aproximadamente 35 nucleótidos, o análogos de nucleótido, y de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleótidos, o análogos de nucleótido.

La presente invención también contempla moduladores de oligonucleótido que son moléculas cortas de ARN de doble hebra de interferentes (ARNsi). En la técnica, se sabe que la interferencia de ARN mediada por ARNsi juega un papel importante en el silenciado génico pos-transcripcional [Zamore, *Nature Struct Biol.*, 8:746-750 (2001)]. En esencia, las moléculas de ARNsi normalmente tienen una longitud de 21-22 pares de bases y se generan cuando se escinden moléculas de ARN largas de doble hebra por medio de la acción de una ribonucleasa endógena. Recientemente, se ha demostrado que la transfección de células de mamíferos con moléculas de ARNsi sintéticas que tienen una secuencia idéntica a una parte del gen diana conduce a una reducción de los niveles de ARNm del gen diana [Elbashir y col., *Nature*, 411:494-498 (2001)].

Los inhibidores de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención pueden ser moléculas de ARNsi que actúan como dianas para un gen de interés de manera que la secuencia de ARNsi corresponde a una parte cuya longitud es de 30 pares de bases para contribuir a evitar que inicien mecanismos de interferencia de ARN no específicos en la células por medio de la respuesta de interferones. De este modo, en una realización de la presente invención, las moléculas de ARNsi tienen una longitud entre aproximadamente 15 y aproximadamente 25 pares de bases. En otra realización, tienen una longitud entre aproximadamente 19 y aproximadamente 22 pares de bases.

Las moléculas de ARNsi de doble hebra pueden además comprender salientes en los extremos 3' y 5' para minimizar la degradación de las moléculas mediada por ARNasa. Normalmente, los salientes en los extremos 3' y 5' comprenden dos residuos de timidina o dos residuos de uridina. El diseño y la construcción de moléculas de ARNsi se conoce en la técnica [véase, por ejemplo, Elbashir y col., *Nature*, 411:494-498 (2001); Bitko y Barik, *BMC Microbiol.*, 1:34 (2001)]. Además, los estuches que proporcionan un medio rápido y eficaz para construir moléculas de ARNsi por medio de transcripción *in vitro* también se encuentran comercialmente disponibles (Ambion, Austin, TX; New England Biolabs, Beverly, MA) y se pueden usar para construir moléculas de ARNsi de la presente invención.

La presente invención además contempla moduladores de oligonucleótido de ribozima que se dirigen específicamente a ARNm que codifica una proteína de interés. Como se sabe en la técnica, las ribozimas son moléculas de ARN que tienen una actividad enzimática que permite que la ribozima provoque la escisión repetidamente de moléculas de ARN separadas de manera específica con la secuencia de nucleótidos. Dichas moléculas enzimáticas de ARN se pueden dirigir virtualmente a cualquier fracción transcrita de ARNm, pudiéndose conseguir una escisión eficaz *in vitro* [Kim y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 84:8788 (1987); Haseloff y Gerlach, *Nature*, 334:585, (1988); Cech, *JAMA*, 260:3030, (1988); Jefferies y col., *Nucleic Acids Res.*, 17:1371, (1989)].

Normalmente, una ribozima comprende dos partes que se mantienen en estrecha proximidad: una parte de unión de ARNm que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de ARNm diana, y una parte catalítica que actúa para provocar la escisión del ARNm diana. Una ribozima actúa en primer lugar reconociendo y uniéndose a un ARNm diana por medio de emparejamiento de bases complementarias a través de la parte de unión de ARNm diana de la ribozima. Una vez que se ha unido específicamente a su diana, la ribozima cataliza la escisión del ARNm diana. Dicha escisión estratégica destruye la capacidad del ARNm para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Habiéndose unido y provocado la escisión de su diana de ARNm, la ribozima se libera y se puede unir repetidamente y provocar la escisión nuevas moléculas de ARNm diana.

Una de las moléculas de ribozima mejor caracterizadas es la "ribozima de cabeza de martillo". Las ribozimas de cabeza de martillo comprenden una región de hibridación que es complementaria a la secuencia de nucleótidos, al menos en parte, del ARNm diana, y una región catalítica que se adapta para provocar la escisión del ARNm diana. En general, la región de hibridación contiene al menos 9 nucleótidos. Por tanto, la presente invención contempla inhibidores de oligonucleótidos que son ribozimas de cabeza de martillo que tienen una región de hibridación que comprende al menos 9 nucleótidos que son complementarios con un gen que codifica una proteína de interés, y que se une a un dominio catalítico apropiado. La construcción y producción de dichas ribozimas se conocen bien en la técnica [véase, por ejemplo, Haseloff y Gerlach, *Nature*, 334:585-591 (1988)].

Las ribozimas de acuerdo con la presente invención también incluyen endoribonucleasas ARN (en lo sucesivo "ribozimas de tipo Cech") como la de origen natural en *Tetrahymena thermophila* (conocida como IVS, o L-19 IVS RNA), que se ha descrito ampliamente en la bibliografía [véase, Zaug, y col., *Science*, 224:574-578 (1984); Zaug y Cech, *Science*, 231:470-475 (1986); Zaug y col., *Nature*, 324:429-433 (1986); patente de EE.UU. 4.987.071; Been y Cech, *Cell*, 47:207-216 (1986)]. Las ribozimas de tipo Cech comprenden un sitio activo de 8 nucleótidos que hibrida a una secuencia de ARNm diana con la posterior escisión del ARNm diana por medio de la ribozima.

El experto en la técnica comprenderá que existe un intervalo estrecho de energías libres de unión entre una ribozima y su sustrato que producirá una actividad máxima de ribozima. Se puede optimizar dicha energía de unión provocando sustituciones de G a I (inopina) y de U a BrU (bromouracilo) (o sustituciones equivalentes como se conoce en la técnica) en la parte de unión de ARNm de las ribozimas. Dichas sustituciones permiten la manipulación de la energía libre de unión sin modificar la secuencia de reconocimiento diana, la longitud de la parte de unión de ARNm, o la parte enzimática de la ribozima. Se pueden determinar fácilmente la forma de la curva de energía libre frente a actividad de la ribozima, usando datos procedentes de experimentos normalizados conocidos en la técnica en los cuales cada base (o varias bases) está modificada o no está modificada, y sin la complicación de modificar el tamaño de la interacción de la ribozima/sustrato.

Si fuese necesario, se pueden usar dichos experimentos para indicar la estructura más activa de la ribozima. De este modo, el uso de bases modificadas permite un "ajuste fino" de la energía libre de unión para garantizar una actividad máxima de la ribozima y se considera dentro del alcance de la presente invención. Además, la sustitución de dichas bases, por ejemplo, G por I, puede permitir un nivel más elevado de especificidad del sustrato cuando la escisión del ARN que no actúa como diana constituye un problema.

La presente invención además contempla moduladores de oligonucleótidos que se hibridan y forman estructuras de hélice triple en el extremo 5' del gen diana y que, de este modo, se pueden usar para la transcripción de bloques. Los oligonucleótidos que forman la triple hélice se pueden diseñar y preparar como se ha descrito anteriormente para los oligonucleótidos antisentido.

5 Se pueden preparar los moduladores de oligonucleótido de la presente invención por medio de técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar oligonucleótidos usando síntesis en fase sólida, empleando un equipo comercialmente disponible, tal como el equipo disponible en Applied Biosystems Canada Inc. (Mississauga, Canada). Como se sabe bien en la técnica, también se pueden
10 preparar fácilmente los oligonucleótidos modificados, tales como fosforotioatos y derivados alquilados, por medio de métodos similares.

15 Alternativamente, se pueden preparar los moduladores de oligonucleótido por medio de digestión enzimática y/o amplificación del gen diana que origen natural o ARNm, o de ADNc sintetizado a partir de ARNm, usando técnicas normalizadas conocidas en la técnica. Cuando los inhibidores de oligonucleótido comprenden ARN, se pueden preparar por medio de métodos de transcripción *in vitro* también conocidos en la técnica. Como se ha comentado anteriormente, las moléculas de ARNs también se pueden preparar de manera conveniente usando estuches de transcripción *in vitro* comercialmente disponibles.

20 También se pueden preparar oligonucleótidos usando técnicas de ADN recombinante. Por tanto, la presente invención, engloba vectores de expresión que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican los inhibidores de oligonucleótido y la expresión posterior de los oligonucleótidos codificados en una célula huésped apropiada. Dichos vectores de expresión se pueden construir fácilmente usando los procedimientos conocidos en la técnica [véase, por ejemplo, Asubel, y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY.
25 (1989 y actualizaciones)].

(i) Moduladores de moléculas pequeñas

30 Los inventores también describen moduladores de moléculas pequeñas de los mecanismos de señalización de Wnt, que incluyen péptidos, oligonucleótidos y moléculas orgánicas e inorgánicas sintetizadas y de origen natural. A modo de ejemplo, cloruro de litio (LiCl) es un conocido estimulador de los mecanismos de señalización de Wnt en células pluripotenciales que actúa a través de la inhibición de GSK-3 β con la consiguiente estabilización de β -catenina (Hedgepeth y col., (1997), *Dev. Biol.*, 185:82-91).

35 Se pueden diseñar o seleccionar aleatoriamente o racionalmente los compuestos candidato cuya capacidad para actuar como moduladores de los mecanismos de señalización de Wnt en células pluripotenciales se puede someter a evaluación. Según se usa en la presente memoria, se dice que un compuesto candidato se escoge selectivamente cuando se selecciona sin considerar las interacciones específicas implicadas en su asociación potencial con los
40 componentes moleculares de las células pluripotenciales, u otras células si se usa un co-cultivo. Un ejemplo de selección aleatoria de compuestos candidato es el uso de una biblioteca química o una biblioteca combinatoria de péptidos, o un caldo de proliferación de un organismo. Según se usa en la presente memoria, se dice que un compuesto candidato se escoge o diseña racionalmente cuando el compuesto se escoge en una base no aleatoria que tiene en cuenta la secuencia y o conformación de un sitio diana o un proceso junto con la acción del compuesto. Los compuestos candidato se pueden escoger racionalmente o se pueden diseñar racionalmente, por ejemplo,
45 mediante el uso de secuencias de nucleótido o péptido que constituyen los sitios diana. Por ejemplo, un péptido seleccionad racionalmente puede ser un péptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica o es un derivado de un sitio de acuerdo funcional.

50 Se puede aislar o no el compuesto candidato, en forma pura, se puede purificar parcialmente, o puede estar en forma de mezcla bruta, por ejemplo, puede estar en forma de una célula, lisato o extracto procedente de una célula, o una molécula procedente de una célula. Cuando el compuesto candidato está presente en una composición que comprende más de una entidad molecular, se contempla que la composición se puedan someter a ensayo como tal y/o se pueda separar opcionalmente por medio de un procedimiento apropiado y se pueda someter a ensayo la muestra fraccionada usando el método de la invención u otro método para identificar una fracción o componente
55 particular de la composición que actúe como modulador de los mecanismos de señalización de Wnt. Se contempla además la posibilidad de re-separar y someter a ensayo repetidamente sub-fracciones de las composiciones de ensayo usando los métodos de la invención con el objetivo último de excluir los componentes inactivos de la sub-combinación identificada como modulador de los mecanismos de señalización de Wnt. Se pueden incluir etapas participantes de aislamiento del compuesto, purificación y/o caracterización, según sea necesario o resulte apropiado.
60

65 Se pueden obtener los compuestos candidatos en forma de bibliotecas grandes de compuestos naturales o sintéticos. Actualmente, se usan numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de compuestos basados en sacáridos, péptidos y ácidos nucleicos y se conocen bien en la técnica. Las bibliotecas de compuestos sintéticos se conocen bien en la técnica a partir de un número de compañías que incluyen Maybridge Chemical Co (Trevillet, Cornwall, Reino Unido), Comgenex (Princeton, N.J.), Brandon Associates (Merrimack, N.H.) y Microsource (New

Milford, Conn.). Una biblioteca química poco común está disponible en Aldrich (Milwaukee, Wis.). Las bibliotecas combinatorias también se encuentran disponibles o se pueden preparar de acuerdo con los métodos normalizados. Alternativamente, las bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos de bacterias, hongos, plantas y animales están disponibles en, por ejemplo, Pan Laboratories (Bothell, Wash.) o MycoSearch (Carolina del Norte), o se pueden producir de forma sencilla. Adicionalmente, las bibliotecas naturales y producidas sintéticamente y los compuestos se modifican de forma sencilla a través de medios químicos, físicos y bioquímicos.

Selección de Moduladores de los Mecanismos de Señalización de Wnt

Los inventores describen además métodos de evaluación de compuestos candidato en cuanto a su capacidad para modular la proliferación y/o el compromiso de linaje de células pluripotenciales adultas a través de la modulación de los mecanismos de señalización de Wnt. En general, dichos métodos comprenden la etapa de poner en contacto una población de células pluripotenciales adultas con un compuesto candidato y controlar uno o más indicadores de proliferación y/o compromiso de linaje de la célula.

Si se requiere, se pueden evaluar los moduladores candidatos inicialmente en cuanto a su capacidad para inhibir o activar su gen o proteína diana. Por ejemplo, para los polipéptidos o péptidos (o sus derivados, análogos o peptidomiméticos) que se unen a una proteína específica en los mecanismos de señalización de Wnt, se puede determinar la capacidad de unión por medio del uso de una variedad de ensayos de unión conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Coligan y col., (eds.) *Current Protocols in Protein Science*, J. Wiley & Sons, Nueva York, NY). Para los moduladores de oligonucleótidos se pueden controlar la sobre- y la infra-regulación del gen diana en células tratadas por medio de, por ejemplo, análisis de inmunotransferencia Nothern, análisis de RT-PCR o análisis de microseries. Alternativamente, se puede controlar el aumento o disminución de la proteína correspondiente, por ejemplo, por medio de análisis de inmunotransferencia Western.

Se pueden usar varios inmunoensayos para evaluar la identificación de anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Se conocen numerosos protocolos para la unión competitiva o ensayos de inmunotransferencia que usan bien anticuerpos monoclonales o bien policlonales, con especificidades establecidas en la técnica. Normalmente, dichos inmunoensayos implican la medición de la formación de complejos entre la proteína diana y sus anticuerpos específicos. Ejemplos de dichas técnicas incluyen ELISA, radio-inmunoensayos (RIAs) y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Alternativamente, se puede usar un inmunoensayo basado en monoclonales de dos sitios que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos frente a epítopos no interferentes, o un ensayo de unión competitiva (véase, Maddox, D.E. y col. (1983) *J. Exp. Med.* 158:1211-1216). Estos y otros ensayos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Hampton R., y col. (1990) *Serological Methods: A Laboratory Manual*, APS Press, St Paul, Minn., Sección IV; Coligan, J. E. y col. (1997, y suplementos periódicos) *Current Protocols in Immunology*, Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.; Maddox, D. E. y col. (1983) *J. Exp. Med.* 158:1211-1216).

Los moduladores candidatos de los mecanismos de señalización de Wnt se someten a ensayo de manera adicional en cuanto a su capacidad para promover o inhibir la proliferación de células pluripotenciales adultas y/o el compromiso de linaje. Normalmente, las células pluripotenciales se someten a cultivo en presencia y ausencia del modulador candidato y al menos un indicador de proliferación y/o posteriormente se controla el compromiso de linaje en las células para determinar si la proliferación y/o el compromiso de linaje se han modulado en el cultivo celular expuesto al modulador. Alternativamente, se somete a co-cultivo una población de células pluripotenciales con células de educador, se exponen las células pluripotenciales o las células de educador al modulador candidato y al menos un indicador de proliferación y/o compromiso de linaje controlado. Se pueden usar células pluripotenciales adultas o células de progenitor a partir de una variedad de tejidos para evaluar la capacidad de los moduladores candidatos para aumentar o disminuir la proliferación y/o el compromiso de linaje. Ejemplos incluyen, pero sin limitarse a, células pluripotenciales procedentes de músculo cardíaco, músculo esquelético, adiposas, cutáneas, pancreáticas, neuronales y de tejido hepático, células pluripotenciales procedentes de médula ósea, células hematopoyéticas, mioblastos, hepatocitos, tímocitos, cardiomiocitos y similares.

Se han empleado varios marcadores superficiales celulares para identificar poblaciones de células pluripotenciales incluyendo estuche-c, Sca1, CD34 y CD45. Por tanto, las células pluripotenciales usadas para evaluar los moduladores candidato pueden ser células estuche-c⁺, Sca1⁺, CD34⁺ o CD45⁺, o pueden expresar una combinación de dos o más de estos marcadores. Además, las células pluripotenciales pueden expresar uno o más de los marcadores anteriores en combinación con uno o más de AC133, CD31, FTT1, FLK1, BRCP1 y Fzd1, 2, 3 ó 4. Se pueden identificar las células de población secundaria (o SP), que son un tipo de células pluripotenciales adultas que se ha identificado en músculo esquelético y cardíaco, sobre la base de tinción con colorante de Hoescht como se sabe en la técnica (véase, por ejemplo, Gussoni, E. y col., (1999) *Nature* 401, 390-394; Jackson, K. A. y col., (1999) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 96, 14482-14486; Hierlihy, A.M. y col., (2002) *FEBS Lett.* 530, 239-243).

En la presente invención, las células pluripotenciales proceden de tejido de músculo esquelético adulto. En otra realización, las células pluripotenciales son células CD45⁺ procedentes de músculo adulto. En otra realización, las células son células CD45⁺/Sca1⁺ procedentes de músculo adulto.

Los métodos para mantener las células pluripotenciales en cultivo se conocen en la técnica (véase, por ejemplo,

Madlambayan, G.J. y col., (2001) *J. Hematother. Stem Cell Res.* 10, 481-492; Hierlihy, A.M. y col., (2002) *FEBS Lett.* 530, 239-243; Asakura, A. y col., (2002) *J. Cell Biol.* 159, 123-124). Las células pluripotenciales se pueden someter a cultivo solas (monocultivo) o se pueden someter a co-cultivo con otras células (educador). A modo de ejemplo, un co-cultivo podría incluir una población de células pluripotenciales derivadas de músculo (u otras células pluripotenciales) y mioblastos (células de educador) que se combinan tras el aislamiento con o sin una fase de mantenimiento en un cultivo separado. Alternativamente, se podrían someter a co-cultivo las dos poblaciones celulares como explantes (por ejemplo, explante de músculo de extremidad posterior de ratón) sin haber sido nunca aisladas a partir de sus tejidos fuente. Se entiende y se espera que los cultivos de células pluripotenciales también puedan contener otras poblaciones celulares si la población de células pluripotenciales y/o la población de células de educador no es completamente pura.

Se pueden incluir etapas adicionales en los métodos de evaluación antes, durante o después del período de cultivo, tal como etapas para identificar o aislar poblaciones celulares o, de otro modo, contribuir al éxito del ensayo. Por ejemplo, se pueden emplear factores de proliferación y otros compuestos para aislar y expandir la población de células pluripotenciales. Se ha usado EGF y FGF para este fin con células pluripotenciales neuronales como se describe por parte de Gritti y col. (*J. Neurosci.* (1999) 19:3287-3297) y se ha usado Bcl-2 en el aislamiento de poblaciones de "células pluripotenciales de músculo" (véase la patente de EE.UU. n.º. 6.337.184). Otros compuestos útiles en el aislamiento y/o mantenimiento de cultivos de células pluripotenciales incluyen Shh, Lhh, BMP, BMP-antagonistas, SCF y varias citocinas.

Las células pluripotenciales de los ensayos de evaluación pueden ser principalmente células o líneas de células pluripotenciales sometidas a cultivo aisladas o procedentes de un mamífero adulto normal. Alternativamente, se pueden aislar las células pluripotenciales o pueden proceder de un mamífero que experimenta una mutación en uno o más genes que codifican una proteína en los mecanismos de señalización de Wnt o un mamífero que expresa un gen indicador en un locus específico de tejido. Por ejemplo, se puede determinar la diferenciación de las células pluripotenciales de músculo residente para dar lugar a miocitos en respuesta a un modulador de la invención, usando células aisladas procedentes de ratones inoculados con *Myf5nLacZ* de heterocigoto. En estos ratones indicadores, la expresión de *LacZ* recapitula fielmente el patrón de expresión del gen *Myf5* endógeno, que se induce rápidamente tras el compromiso miogénico (Tajbakhsh y Buckingham, 1995, *Development*, 122:3765-3773). De este modo, la expresión de *Myf5LacZ* en estas células indica un compromiso miogénico en respuesta a un modulador candidato.

Generalmente, se somete a ensayo un modulador candidato en un intervalo de concentraciones, normalmente aproximadamente un intervalo de 1000 veces, y se puede establecer fácilmente un protocolo de exposición apropiado por parte del experto en la técnica. Cuando se usa un co-cultivo, la exposición de la célula pluripotencial a un modulador candidato puede ocurrir antes, durante y/o después de la exposición inicial de las células pluripotenciales a las células de educador. Alternativamente, cuando el modulador de candidato es una molécula de ácido nucleico o un polipéptido o péptido codificado por una molécula de ácido nucleico, se pueden someter las células pluripotenciales a transfección con la molécula de ácido nucleico, o un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico, usando métodos normalizados descritos en la presente memoria y en otros sitios, de manera que se produce el modulador de candidato de forma endógena.

Se contempla además que no es posible exponer directamente las células pluripotenciales al modulador candidato. Por ejemplo, se puede exponer directamente una población de células de educador o un tercer tipo celular al modulador y posteriormente se puede someter a co-cultivo con las células pluripotenciales. Alternativamente, se puede someter a transfección una población de células de educador o un tercer tipo celular con la molécula de ácido nucleico, o un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico, que expresa el modulador de candidato y las células posteriormente sometidas a co-cultivo con las células pluripotenciales. También se pueden exponer indirectamente las células pluripotenciales por medio de la adición de un medio que se ha acondicionado por medio de una población celular que se ha expuesto a un modulador, pero que no se incluye por sí misma en el co-cultivo. Además, se contempla que las células o explantes del ensayo se pueden exponer a un modulador candidato por medio de la incorporación del modulador en un medio no líquido del cultivo, por ejemplo, un soporte de proliferación sólido, de gel o semi-sólido tal como agar, un almacén polimérico, una matriz u otra estructura.

Se pueden controlar cualitativa y cuantitativamente los puntos finales representativos de la proliferación de células pluripotenciales y/o el compromiso de linaje en el ensayo y controlar las poblaciones de células pluripotenciales. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo observaciones cualitativas o cuantitativas sobre los cambios en la morfología bruta, histología, inmunohistoquímica, número total de células, número de células diferenciadas u otros puntos finales del ensayo, y se pueden controlar las células o explantes o sus secciones. Alternativamente, se puede controlar la presencia o ausencia de un marcador celular específico. Normalmente, los marcadores celulares son proteínas específicas de linaje, cuya presencia o ausencia o niveles relativos se pueden analizar usando un número de técnicas normalizadas que incluyen, por ejemplo, técnicas histoquímicas, técnicas inmunológicas, electroforesis, análisis de inmunotransferencia Western, análisis FACS, citometría de flujo y similares. Alternativamente, se pueden determinar la presencia o ausencia o los niveles relativos de ARNm que codifica la proteína de marcador celular, por ejemplo, usando técnicas de PCR, técnicas de microscopía, análisis de inmunotransferencia Northern, el uso de sondas de oligonucleótidos apropiadas y similares.

Los marcadores apropiados celulares específicos de linaje que se pueden controlar se conocen en la técnica. Por ejemplo, se puede medir el compromiso de linaje de células pluripotenciales procedentes de músculo examinando las células en cuanto a la expresión de uno o más proteínas de marcador de miocito, tal como cadena pesada de miosina, MyoD hipofosforilada, miogenina, Myf5, Pax7 y troponina T. Se puede determinar el compromiso de linaje de células pluripotenciales de músculo cardíaco, tal como las células de la población secundaria cardíaca (SP) presentes en el corazón adulto (Hierlihy y col., A.M. y col. (2002), *FEBS Lett.* 530, 239-243) controlando el aspecto de los marcadores específicos de cardiomiocitos, tal como conexina-43, MEF2C y/o cadena pesada de miosina. Se puede determinar el compromiso de linaje de células pluripotenciales neuronales, procedentes de neuroesferas o como fracciones de células SP, controlando la expresión de GFAP, MAP2 y/o tubulina β -III (véase, por ejemplo, Hitoshi, S. y col., (2002) *Genes & Dev.* 16, 846-858) y se puede determinar el compromiso de linaje de células pluripotenciales pancreáticas controlando la expresión de PDX-1 y/o insulina. También se puede determinar la diferenciación terminal de precursores comprometidos controlando los marcadores específicos de linaje tales como los descritos anteriormente.

Aplicaciones

La presente invención además proporciona métodos y usos para inducir la proliferación y/o el compromiso de linaje de células pluripotenciales adultas por medio de la puesta en contacto de las células, directa o indirectamente, con uno o más moduladores de los mecanismos de señalización de Wnt. También se pueden usar los moduladores proporcionados por la presente invención para mejorar la supervivencia de las células pluripotenciales o células de progenitor comprometidas y para inducir la diferenciación terminal en las células de progenitor comprometidas. Los métodos y moduladores de los mecanismos de señalización de Wnt proporcionados por medio de la presente invención tienen un número de aplicaciones. Por ejemplo, se pueden usar los métodos y moduladores *in vitro* para favorecer la proliferación de células pluripotenciales adultas y/o para favorecer el compromiso de linaje de las células pluripotenciales en las que las células están destinadas para uso *in vitro* posterior, por ejemplo, con fines de investigación. Los compuestos y los métodos que favorecen la proliferación y/o favorecen el compromiso de linaje de las células pluripotenciales también tienen aplicaciones potenciales en el desarrollo de nuevos modelos *in vitro* para la evaluación de fármacos. Los moduladores de la invención que aumentan la supervivencia de las células pluripotenciales y de las células de progenitor son particularmente útiles para facilitar el cultivo *in vitro* y el mantenimiento de estas células.

Alternativamente, se pueden usar los métodos y moduladores para promover la proliferación *ex vivo* de células pluripotenciales, y/o promover o inhibir el compromiso de linaje de estas células, y de este modo proporcionar una población de células apropiadas para el trasplante. La expansión *ex vivo* de células pluripotenciales tiene unas indicaciones terapéuticas obvias para el tratamiento de numerosos estados de enfermedad.

Los métodos y moduladores de la presente invención son particularmente útiles *in vivo* para promover la proliferación, y opcionalmente el compromiso de linaje, de células pluripotenciales adultas en tejidos adultos y, de este modo, contribuir a la sustitución o restitución del tejido dañado. Por ejemplo, se ha demostrado que la población residente de células pluripotenciales en tejidos musculares adultos aumenta 10 veces tras la lesión muscular. Por tanto, los métodos y moduladores se pueden aplicar en tejido lesionado para promover la proliferación y el compromiso de linaje de estas células pluripotenciales residentes y, de este modo, acelerar la restitución del tejido dañado. Alternativamente, se pueden usar los métodos y moduladores para contribuir a aliviar enfermedades degenerativas o trastornos estimulando la proliferación, y opcionalmente el compromiso de linaje, de la población de células pluripotenciales residentes latentes, sustituyendo de este modo el tejido dañado como resultado de la enfermedad o trastorno.

Se ha comprobado que los moduladores de los mecanismos de señalización de Wnt, incluyendo Wnts 5a, 5b, 7a, 7b y sFRP 2 y 3, son eficaces a la hora de modular la proliferación y el compromiso de linaje de poblaciones de células pluripotenciales residentes en tejido muscular adulto. Las poblaciones de células pluripotenciales residentes se pueden identificar, por ejemplo, por medio de tinción de Hoescht (para células SP), por medio de expresión de CD45⁺ y/o Sca1. CD45 y Sca1 son marcadores pan-hematopoyéticos que se pueden usar para contribuir a identificar poblaciones de células pluripotenciales residentes en una variedad de tejidos adultos.

En una realización de la presente invención, se usan los métodos y moduladores para inducir la proliferación y/o el compromiso de linaje en células pluripotenciales de músculo adulto. En otra realización, se usan los métodos y los moduladores para inducir la proliferación y/o el compromiso de linaje en células pluripotenciales de músculo esquelético adulto. En otra realización, se usan los métodos y moduladores para inducir la proliferación y/o el compromiso de linaje de células pluripotenciales que son CD45⁺. En otra realización, se usan los métodos y los moduladores para inducir la proliferación y/o el compromiso de linaje de células pluripotenciales de músculo CD45⁺. En otra realización, los métodos implican el uso de polipéptidos de Wnt7a, fragmentos activos o variantes, o una de sus combinaciones, como modulador(es).

Se pueden usar los moduladores y los métodos de la invención además de o de manera concurrente con otras terapias o tratamientos celulares. En particular, la presente invención contempla métodos en los cuales una

- población de células pluripotenciales, bien *in vivo* o *in vitro*, se pone en contacto en primer lugar con un agente que estimula la proliferación y permite la expansión de la población celular así como también con un modulador de la invención para mejorar la proliferación y/o para inducir el compromiso de linaje. Se pueden proporcionar el agente y el modulador a las células de manera concurrente, o se pueden proporcionar de forma secuencial, por ejemplo, se pueden poner en contacto las células inicialmente con un agente que induzca la proliferación y posteriormente con uno o más moduladores de la invención para inducir el compromiso de linaje y mejorar la supervivencia de las células. Ejemplos de agentes que se pueden usar junto con los moduladores de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, cardiotropina-1 (CT-1), Shh, Lhh, BMP, antagonistas de BMP, SCF y varias citocinas.
- En una realización de la invención, el método para inducir la proliferación y/o el compromiso de linaje de las células pluripotenciales comprende poner en contacto las células con uno o más moduladores de los mecanismos de Wnt y CT-1. En otra realización, el método para inducir la proliferación y el posterior compromiso de linaje de las células pluripotenciales comprende poner en contacto las células con CT-1 y posteriormente con uno o más moduladores de los mecanismos Wnt.
- Por tanto, las aplicaciones terapéuticas de los métodos y moduladores de la presente invención, normalmente pertenecen a situaciones en las cuales es necesario sustituir tejido dañado o perdido, por ejemplo, tras quimioterapia o terapia de radiación, tras lesiones musculares, con el fin de evitar la atrofia muscular o la pérdida de masa muscular, o en el tratamiento de enfermedades y trastornos tales como trastornos musculares degenerativos, cáncer (incluyendo leucemias), enfermedades hepáticas degenerativas, incluyendo cirrosis y hepatitis, diabetes, trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, trastornos cardíacos degenerativos o isquémicos, infección por VIH y complicaciones relacionadas y enfermedades neuromusculares.
- Para aplicaciones terapéuticas, la presente invención además proporciona composiciones farmacológicas que comprenden uno o más moduladores de los mecanismos de señalización de Wnt y un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas y los métodos de preparación de composiciones farmacéuticas se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en "*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*" (antiguamente "*Remingtons Pharmaceutical Sciences*"); Gennaro, A., Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2000).
- La administración de los moduladores o de las composiciones farmacéuticas que comprenden los moduladores puede ser por medio de un número de rutas dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área objeto de tratamiento. Normalmente, los moduladores se administran localmente al área objeto de tratamiento. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a membranas mucosas incluyendo administración vaginal y rectal), pulmonar (por ejemplo, por medio de inhalación o insuflado de polvos o aerosoles, incluyendo por medio de un nebulizador), intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. La administración parenteral incluye administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o inyección intramuscular o infusión, o intracraneal, por ejemplo intratecal o intraventricular.
- Los moduladores de la presente invención se pueden suministrar en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. De manera ideal, dicho vehículo mejoraría la estabilidad y/o las propiedades de administración. La presente invención también proporciona la administración de moduladores que usan un vehículo apropiado, tal como un liposoma, micropartícula o microcápsula. En varias realizaciones de la invención, el uso de dichos vehículo puede resultar beneficioso para conseguir una liberación prolongada del componente activo.
- Cuando se formulan para administración parenteral, los moduladores se usan en forma de disolución estéril que contiene otros solutos, por ejemplo, suficiente disolución salina o glucosa para preparar la disolución isotónica.
- Para administración por medio de inhalación o insuflado, se pueden formular los moduladores para dar lugar a una disolución acuosa o parcialmente acuosa, que se puede utilizar posteriormente en forma de un aerosol. Para uso tópico, se pueden formular los moduladores en forma de polvos de espolvoreo, cremas o lociones en vehículos farmacéuticamente aceptables, que se aplican a las partes afectadas de la piel.
- Los requisitos de dosificación para los moduladores de la presente invención varían con las composiciones particulares empleadas, la ruta de administración y el sujeto particular objeto de tratamiento. Se pueden determinar los requisitos de dosificación por medio de técnicas clínicas normalizadas conocidas por el trabajador experto en la técnica. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosificaciones pequeñas menores que la dosis óptima del compuesto. Posteriormente, se aumenta la dosificación hasta que se alcanza el efecto óptimo en dichas circunstancias. En general, los moduladores o las composiciones farmacéuticas que comprenden los moduladores se administran a una concentración que generalmente permite resultados eficaces sin provocar ningún efecto secundario nocivo y perjudicial. La administración puede ser bien en forma de dosis unitaria individual o, si se desea, la dosificación se puede dividir en subunidades apropiadas que se administran en momentos concretos durante el día.
- Terapia génica*

La presente invención también contempla la administración de moduladores de oligonucleótido o moléculas de ácido nucleico que codifican moduladores (que posteriormente expresan el producto codificado *in vivo*) por medio de métodos de "terapia génica" conocidos en la técnica. La terapia génica incluye técnicas tanto *ex vivo* como *in vivo*. De este modo, se pueden someter las células huésped a estudio técnico *ex vivo* con un modulador de oligonucleótidos o una molécula de ácido nucleico que codifica el modulador, proporcionándose las células sometidas a estudio técnico a un paciente objeto de tratamiento. Se pueden formular cultivos celulares para administración a un paciente, por ejemplo, por medio de disociación de las células (por ejemplo, por medio de disociación mecánica) y mezcla íntima de las células con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato). Alternativamente, se pueden someter las células a cultivo en un soporte biocompatible y se pueden trasplantar en un paciente. Normalmente, las células sometidas a estudio técnico son autólogas para evitar un rechazo xenogénico o alotípico. Dichos métodos *ex vivo* se conocen bien en la técnica.

Alternativamente, se pueden someter las células a estudio técnico *in vivo* por medio de la administración de la molécula de oligonucleótido o ácido nucleico usando técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, se pueden administrar oligonucleótidos y otras moléculas de ácido nucleico por medio de inyección directa de una molécula "desnuda" de ácido nucleico (Felgner y Rhodes, (1991) *Nature* 349: 351-352, patente de EE.UU. nº. 5.679.647) o una molécula de ácido nucleico formulada en una composición con uno o más de otros agentes que facilitan la captación de la molécula de ácido nucleico por parte de la célula, tal como saponinas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº. 5.739.118) o poliaminas catiónicas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº. 5.837.533); por medio de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, mediante el uso de una "pistola génica"; Biolistic, Dupont); por medio de revestimiento de la molécula de ácido nucleico con lípidos, receptores de superficie celular o agentes de transfección; por medio de encapsulado de la molécula de ácido nucleico en liposomas, micropartículas, o microcápsulas; por medio de la administración de la molécula de ácido nucleico unida a un péptido que se sabe que penetra en el núcleo; o por medio de la administración de la molécula de ácido nucleico unida a un ligando sometido a endocitosis con mediación de receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432) que se pueden usar para dirigirse a tipos celulares que expresan específicamente los receptores.

Alternativamente, se puede formar un complejo de ácido nucleico-ligando en el que el ligando comprende un péptido vírico fusogénico para romper endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica; o se puede elegir como objetivo la molécula de ácido nucleico para la captación específica y la expresión *in vivo* eligiendo como objetivo un receptor específico (véase por ejemplo, las Solicitudes de Patente Internacional WO 92/06180, WO 92/22635, WO 92/20316, WO 93/14188 y WO 93/20221). Además, un método eficaz para la introducción, expresión y acumulación de oligonucleótidos antisentido en el núcleo celular se describe en la patente de EE.UU. nº. 6.265.177, que permite hibridar el oligonucleótido antisentido con el ARNm sentido en el núcleo, y de este modo evita que el oligonucleótido antisentido sea bien procesado o bien transportado al interior del citoplasma. La presente invención también contempla la introducción intracelular de la molécula de ácido nucleico y la posterior incorporación en el interior del ADN de la célula huésped para la expresión por medio de recombinación homóloga (véase, por ejemplo, Koller y Smithies (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86:8932-8935; Zijlstra y col. (1989) *Nature* 342-435-438).

También se puede incorporar el polinucleótido a un vector de expresión apropiado. Se conoce un número de vectores apropiados para aplicaciones de terapia génica en la técnica (véase, por ejemplo, *Viral Vectors: Basic Science and Gene Therapy*, Eaton Publishing Co. (2000)).

El vector de expresión puede ser un vector de plásmido. Los métodos de generación y purificación de ADN de plásmidos son rápidos y directos. Además, normalmente el ADN del plásmido no se integra en el interior del genoma de la células huésped, sino que se mantiene en una ubicación episomal, en forma de entidad discreta, eliminando los aspectos de genotoxicidad que la integración cromosómica pudiera provocar.

Actualmente existe una variedad de plásmidos que están disponibles comercialmente e incluyen los derivados de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, estando muchos diseñados en particular para uso en sistemas de mamíferos. Ejemplos de plásmidos que se pueden usar en la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, vectores de expresión eucariotas pRc/CMV (Invitrogen), pCR2.1 (Invitrogen), pAd/CMV y pAd/TR5/GTFq (Massie y col., (1998) *Cytotechnology* 28:53-64). En una realización ejemplar, el plásmido es pRc/CMV, pRc/CMV2 (Invitrogen), pAdCMV5 (IRB-NRC), pcDNA3 (Invitrogen), pAdMLP5 (IRB-NRC) o pVAX (Invitrogen).

Alternativamente, el vector de expresión puede ser cualquier vector de base vírica. Ejemplos de vectores de base vírica incluyen, pero sin limitarse a, los procedentes de la replicación de retrovirus deficientes, lentivirus, adenovirus y adeno virus asociados. Los vectores de retrovirus y los adeno virus asociados son actualmente el sistema de suministro de genes recombinantes que se elige para la transferencia de oligonucleótidos exógenos o genes *in vivo*, en particular en humanos. Estos vectores proporcionan el suministro eficaz de genes en las células, y los ácidos nucleicos transferidos se integran de forma estable en el ADN cromosómico del huésped. Un requisito principal para el uso de retrovirus consiste en garantizar la seguridad de uso, en particular con respecto a la posibilidad de dispersión del virus de tipo natural en la población celular. Los retrovirus, de los cuales proceden los vectores retrovíricos, incluyen, pero sin limitarse a, Virus de Leucemia Murina de Moloney, virus de necrosis del bazo, retrovirus tales como Virus de Sarcoma de Rous, Virus de Sarcoma de Harvey, virus de leucosis aviar, virus de

leucemia de mono de Gibbon, virus de inmunodeficiencia humana, adenovirus, Virus de Sarcoma Mieloproliferativo y virus tumoral mamario. Los retrovirus específicos incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM, que se conocen bien por parte de los expertos en la técnica.

- 5 Los oligonucleótidos o la secuencia de ácido nucleico que codifica el modulador normalmente se incorporan en el vector bajo el control de un promotor apropiado que permite la expresión del oligonucleótido o el ácido nucleico *in vivo*. Promotores apropiados que se pueden emplear incluyen, pero sin limitarse a, promotores adenovíricos, tales como el promotor tardío principal adenovírico, el promotor E1A, el promotor tardío principal (MLP) y las secuencias de lector asociado o el promotor E3; el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor de virus sincitial respiratorio (RSV); promotores inducibles, tales como promotor de MMT, promotor de metalotioneína; promotores de choque térmico; promotor de albúmina; promotor de ApoA1; promotores de globina humana; promotores víricos de timidina quinasa, tales como promotor de timidina quinasa de Herpes Simple; LRT retrovírico; histona, pol III y promotores de β -actina; promotor de parvovirus B19; promotor de SV40 y promotores de hormona de crecimiento humana. El promotor también puede ser un promotor nativo para el gen de interés. La selección de un promotor apropiado
10
15 dependerá del vector, la célula huésped y la proteína codificada y se considera dentro de la experiencia común de un trabajador de la técnica.

El desarrollo de líneas celulares especializadas (denominadas "células encapsuladas") que producen únicamente retrovirus con defecto de replicación ha aumentado la utilidad de los retrovirus para terapia génica, y los retrovirus defectuosos están bien caracterizados para uso en transferencia génica con fines de terapia génica (para una revisión véase Miller, A.D. (1990) Blood 76:271). De este modo, se pueden construir retrovirus recombinantes en los cuales parte de la secuencia de codificación retrovírica (gag, pol, env) ha sido sustituida por una molécula de ácido nucleico de la invención y da como resultado el retrovirus de replicación defectuosa. Posteriormente, el retrovirus de replicación defectuosa se encapsula en el interior de viriones que se pueden usar para infectar una célula diana a través del uso de un virus cooperador por medio de técnicas normalizadas. Los protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células *in vitro* o *in vivo* con dichos virus se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, Asusubel, F. M. y col. (eds.), J. Wiley & Sons, (1989), Secciones 9.10-9.14 y otros manuales de laboratorio normalizados. Ejemplos de líneas de virus encapsulados apropiados para la preparación de sistemas tanto ecotrópicos como anfotrópicos incluyen Crip, Cre, 2 y Am. Otros ejemplos de células encapsuladas incluyen, pero sin limitarse a, líneas celulares PE501, PA317, ψ -2, ψ -AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+E-86, GP+envAm12 y DAN como se describe en Miller, Human Gene Therapy, Vol. 1, pgs. 5-14 (1990).
20
25
30

Además, se ha comprobado que es posible limitar el espectro de la infección de los retrovirus y por consiguiente de los vectores basados en retrovirus, modificando las proteínas encapsuladas víricas sobre la superficie de la partícula vírica (véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO93/25234 y WO94/06920). Por ejemplo, las estrategias para la modificación del espectro de infección de los vectores retrovíricos incluyen: acoplamiento de anticuerpos específicos para antígenos de superficie celular a la proteína env vírica (Roux y col. (1989) PNAS 86:9079-9083; Julan y col. (1992) J. Gen. Virol 73:3251-3255; y Goud y col. (1983) Virology 163:251-254); o el acoplamiento de ligandos receptores de superficie celular a las proteínas env víricas (Neda y col. (1991) J Biol Chem 266:14143-14146). El acoplamiento puede ser en forma de reticulación química con una proteína u otra variedad (por ejemplo, lactosa para convertir la proteína env en una asialoglicoproteína), así como también por medio de la generación de proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión env/anticuerpo de cadena individual). Esta técnica, al tiempo que resulta útil para limitar o de lo contrario dirigir la infección hacia determinados tipos de tejidos, también se puede usar para convertir un vector ecotrópico en un vector anfotrópico.
35
40
45

Además, se puede mejorar más el uso de un suministro génico retrovírico por medio de la utilización de secuencias reguladoras transcripcionales específicas de la célula o del tejido, que controlan la expresión de las moléculas de ácido nucleico de la invención presentes en el vector.

Otro vector vírico útil en las técnicas de terapia génica es un vector procedente de adenovirus. El genoma de un adenovirus se puede manipular de manera que codifique y exprese un producto de un gen de interés pero sea inactivo en términos de su capacidad para replicar en un ciclo de vida vírico lítico normal. Véase por ejemplo Berkner y col. (1988) BioTechniques 6:616; Rosenfeld y col. (1991) Science 252:431-343; y Rosenfeld y col. (1992) Cell 68:143-155. Vectores adenovíricos apropiados procedentes de la estirpe de adenovirus Ad de tipo 5 dl324 u otras estirpes de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7 etc.) se conocen bien por parte de los expertos en la técnica. Los adenovirus recombinantes pueden ser útiles en determinadas circunstancias en las cuales se usan para infectar una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo las células nerviosas periféricas. Además, la partícula de virus es relativamente estable y susceptible de purificación y concentración, y como se ha comentado anteriormente, se puede modificar para provocar un efecto sobre el espectro de ineffectividad. De manera adicional, el ADN adenovírico introducido (y el ADN extraño presente en el mismo) no se integra en el genoma de una célula huésped sino que permanece episomal, evitando de este modo problemas potenciales que pueden surgir como resultado de una mutagénesis de inserción en situaciones en las que el ADN introducido se integra en el interior del genoma huésped (por ejemplo, el ADN retrovírico). Además, la capacidad de transporte del genoma adenovírico para ADN extraño es grande (hasta 8 kilobases) con respecto a otros vectores de suministro de genes (Berkner y col., citado y mencionado anteriormente; Haj-Ahmand y Graham (1986) J. Virol. 57:267). La mayoría de los vectores adenovíricos con defecto de replicación actualmente en uso y contemplados por la presente invención se eliminan para todos o
50
55
60
65

parte de los genes víricos E2 y E3 pero se conservan en una cantidad de hasta 80 % del material genético adenovírico (véase, por ejemplo, Jones y col. (1979) Cell 16:683; Berkner y col., mencionado anteriormente; y Graham y col., en Methods in Molecular Biology, E. J. Murray, Ed. (Humana, Clifton, N.J., 1991) vol. 7, pp. 109-127).

5 La generación y propagación de los vectores de adenovirus humano con defecto de replicación requiere una única línea celular de cooperador. Las líneas celulares de cooperador pueden proceder de células humanas tales como células de riñón embrionarias humanas, células musculares, células hematopoyéticas u otras células epiteliales o mesenquimales embrionarias humanas. Alternativamente, las células cooperadoras pueden proceder de células de otras especies de mamíferos que son permisivas en cuando al adenovirus humano, es decir, que proporcionan, en trans, una secuencia necesaria para permitir la replicación de un virus con replicación deficiente. Dichas células incluyen, por ejemplo, células 293, células Vero u otras células epiteliales o mesenquimales embrionarias de mono. También se contempla el uso de vectores de adenovirus no humanos, tales como vectores de adenovirus bovino y porcino. La selección de un vector vírico apropiado y una línea celular de cooperador se encuentra dentro de la experiencia de un trabajador de la técnica.

15 En una realización de la presente invención, el vector de terapia génica es un vector procedente de adenovirus. En otra realización, el vector de terapia génica es un vector procedente de adenovirus que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una o más proteínas de Wnt.

20 Estuches

La presente invención proporciona de manera adicional estuches terapéuticos que contienen uno o más moduladores de mecanismos de señalización Wnt en composiciones farmacéuticas. Los componentes individuales del estuche se pueden envasar en recipientes separados y, asociado a dichos recipientes, puede haber un cartel en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o comercialización de productos biológicos o farmacéuticos, al tiempo que el cartel refleja la aprobación por parte de la agencia de fabricación, uso o comercialización para administración en humanos.

30 Cuando se proporcionan los componentes del estuche en una o más disoluciones líquidas, la disolución líquida puede ser una disolución acuosa, por ejemplo, una disolución acuosa estéril. En este caso, el medio de recipiente puede ser por sí mismo un inhalador, jeringa, pipeta, cuentagotas u otro aparato similar, a partir del cual se puede administrar la composición a un paciente.

También se pueden proporcionar los componentes del estuche en forma seca o liofilizada y el estuche puede contener adicionalmente un disolvente apropiado para reconstitución de los componentes liofilizados. Independientemente del número o tipo de los recipientes, los estuches de la invención también pueden contener un instrumento para ayudar en la administración de la composición al paciente. Dicho instrumento puede ser un inhalador, jeringa, pipeta, pinzas, cuchara de dosificación, cuentagotas o cualquier otro vehículo de administración médicamente aprobado.

40 Las células pluripotenciales referidas en la presente memoria pueden estar presentes en un sujeto durante el desarrollo, por ejemplo, pero sin limitarse a, desde un neonato a un adulto o en cualquier momento durante el período comprendido entre los mismos. En una realización, que no pretende ser limitante en modo alguno, las células pluripotenciales pueden estar presentes en un sujeto inmediatamente después del nacimiento, o en aproximadamente 1 día, 2 días, 5 días, 1 semana, 5 semanas, 10 semanas, 25 semanas, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años, 20 años, 40 años, 50 años, 60 años, 90 años o en cualquier momento comprendido entre ellos. También es posible asilar y/o purificar las células pluripotenciales a partir de un sujeto apropiado por medio de cualquier método conocido en la técnica. Se entiende que dichos métodos de aislamiento y/o purificación queden englobados por la presente invención. En el caso de que las células se aislen a partir de un sujeto, preferentemente el sujeto está vivo. No obstante, también es posible obtener células pluripotenciales a partir de sujetos recién fallecidos.

55 La presente invención también contempla métodos para aumentar la proliferación, diferenciación o tanto la proliferación como la diferenciación de células pluripotenciales en un sujeto para aumentar a) el número de células musculares en uno o más músculos de un sujeto, b) la masa muscular de uno o más músculos de un sujeto c) la fortaleza de uno o más músculos del sujeto. En una realización preferida, el sujeto es un humano. No obstante, también se contempla que se pueden emplear las células pluripotenciales para aumentar la masa muscular en otros sujetos.

60 Los métodos de la presente solicitud como se describen en la presente memoria se pueden poner en práctica *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, sin pretender que se consideren limitantes en modo alguno, la presente invención contempla una o más etapas de aislamiento de células pluripotenciales a partir de un sujeto, purificación de las células pluripotenciales, cultivo de las células pluripotenciales, tratamiento de las células pluripotenciales con uno o más activadores o inhibidores de proliferación, diferenciación o tanto proliferación como diferenciación, transformación de las células pluripotenciales con una o más estructuras de nucleótido, por ejemplo que producen uno o más activadores o inhibidores de proliferación, diferenciación o tanto proliferación como diferenciación, o una de sus combinaciones.

La presente invención también contempla métodos y composiciones que además comprenden una o más moléculas pequeñas, tales como, pero sin limitarse a, cloruro de litio que se puede emplear para aumentar la proliferación, diferenciación o tanto la proliferación como la diferenciación de células pluripotenciales en un sujeto. Por ejemplo, sin pretender la consideración de limitante en modo alguno, se proporciona un método para aumentar la proliferación, diferenciación o tanto la proliferación como la diferenciación de células pluripotenciales en un sujeto que comprende además administrar una composición que comprende cloruro de litio al sujeto.

La composición se puede administrar en una o más dosis durante el transcurso de uno o más días, por ejemplo, de aproximadamente un día a 30 días, de aproximadamente un día a aproximadamente 14 días o en cualquier otro período de tiempo apropiado, según se requiera. Se puede determinar fácilmente una dosis terapéutica por parte de una persona experta en la técnica. Por ejemplo, sin pretender que sea limitante en modo alguno, puede estar presente cloruro de litio en la composición en una cantidad de aproximadamente 0,001 mg/kg (basado en el peso del sujeto) a aproximadamente 200 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 2 mg/kg. La dosificación puede variar dependiendo de la ruta de administración contemplada, el sujeto particular, la salud del sujeto, etc como resultará evidente para una persona experta en la técnica.

También se contemplan que las composiciones que además de comprender cloruro de litio pueden comprender por ejemplo otros compuestos.

En una realización, la composición se administra a un sujeto que exhibe degeneración muscular o agotamiento muscular, por ejemplo, pero no limitado a ellos, como resultado de una enfermedad o de otro estado que no sea de enfermedad. En un ejemplo específico, que no se pretende sea limitante en modo alguno, se puede administrar la composición a un sujeto que tiene o exhibe una enfermedad tal como cáncer, sida o similar. En otra realización alternativa, se puede administrar la composición a un sujeto para aumentar el número de células musculares en un sujeto y/o para aumentar la resistencia, tamaño, o ambos de uno o más músculos en el sujeto. A este respecto, sin pretender ser limitante o quedar ligado a teoría alguna, se pueden emplear los métodos y composiciones que se definen a lo largo de la presente memoria para evitar y/o tratar la degeneración muscular, el agotamiento o similar, asociados a una o más enfermedades tales como cáncer, sida, diabetes, por ejemplo, diabetes de tipo 2, enfermedades degenerativas musculares y similares. Además, se pueden emplear los métodos y las composiciones que se definen a lo largo de la presente memoria para evitar y/o tratar la degeneración muscular o el agotamiento muscular como resultado de uno o más procesos que no constituyen una enfermedad, por ejemplo, pero sin limitarse a, atrofia muscular por ejemplo, pero sin limitarse a, como resultado de la falta de uso de uno o más músculos. También se pueden emplear el método para evitar y/o tratar la incontinencia. De igual forma, se pueden emplear los métodos y las composiciones que se definen a lo largo de la presente memoria para aumentar el número de células pluripotenciales de un sujeto, aumentar el tamaño de uno o más músculos de un sujeto, aumentar la resistencia de uno o más músculos de un sujeto o cualquiera de sus combinaciones.

Las composiciones que se definen en la presente memoria se pueden administrar por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, pero sin limitarse a, por vía oral, por medio de inyección, por ejemplo, pero sin limitarse a intravenosa, intraperitoneal (IP), intramuscular, subcutánea y similares. En una realización en la que está presente litio en la composición, preferentemente se administra por medio de inyección intraperitoneal (IP) o intramuscular, más preferentemente inyección IP. No obstante, también se contemplan otras rutas de administración de la composición.

Se puede formular la composición que se define a lo largo de la presente memoria para dar lugar a una forma de dosificación apropiada, por ejemplo, comprimido, disolución, suspensión, emulsión, microemulsión o similar, como se sabe en la técnica.

Haciendo referencia ahora a la figura 8, se muestra un diseño experimental y los resultados de los experimentos que demuestran un incremento de las células comprometidas con la miogénesis en respuesta al tratamiento con litio *in vivo*. La figura 8A muestra un diagrama de flujo de diseño experimental en el que se tratan ratones Myf5nLacZ con inyección IP diaria de LiCl (2 mg/Kg/día) durante un período de 14 días. En el día 10, se induce la regeneración muscular en el músculo TA por medio de inyección de cardiotoxina. Cuatro días más tarde, se sacrifican los animales y se aíslan las células mononucleares totales a partir de los TAs, se colocan en placas y se someten a tinción 24 horas más tarde para evaluar la β -galactosidasa. La figura 8B muestra los resultados que indican que la proporción de células B-Gal positivo (células miogénicas) es casi el doble en los animales tratados con LiCl frente a los animales de control a los que se les inyectó PBS.

Con el fin de obtener una mejor comprensión de la invención descrita en la presente memoria, se explican los siguientes ejemplos. Debería entenderse que estos ejemplos son únicamente con fines ilustrativos. Por tanto, no deberían limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

No se pretende que la memoria descriptiva anterior limite la invención reivindicada en modo alguno, además, la combinación comentada de características podría no ser absolutamente necesaria para la solución de la invención.

Ejemplos

EJEMPLO 1: LA SEÑALIZACIÓN WNT ACTIVA LA SELECCIÓN DE CÉLULAS PLURIPOTENCIALES CD45+ ADULTAS DURANTE LA REGENERACIÓN MUSCULAR

Materiales y métodos

Clasificación celular

Se obtuvieron células mononucleares a partir de músculos de extremidades posteriores de ratones transgénicos β -actina-EGFP (Hadjantonakis, 1998, Mech Dev 76, 79-90), o ratones transgénicos *Myf5nLacZ* (Tajbakhsh, 1995, Development 125, 4155-4162). Se recuperaron células musculares como se ha descrito anteriormente (Megene, 1996, Genes Dev 10, 1173-1183). Se lavaron dos veces las células mononucleares con DMEM complementado con 5% de FBS, y se suspendieron a una concentración de $2-3 \times 10^6$ células/ml. Se llevó a cabo la tinción durante 30-45 min en hielo usando los anticuerpos: CD45-APC, clon 30-F11 o CD45.2-FITC (clon 104), Sca1-PE, clon D7 (BD Pharmingen). Alternativamente, se usó CD45-biotina, clon 30-F11, seguido de incubación durante 10 min con Conjugado Tri-Color de Estreptavidina (Caltag Labs). Se diluyeron los anticuerpos primarios a 1:200 y se diluyó el Conjugado Tri-Color de Estreptavidina 1:1000. Tras dos lavados con DMEM a 4 °C, se separaron las células en un citómetro MoFlo (DakoCytomation), equipado con 3 láseres. Se definieron estrictamente barreras de clasificación en base a las células pluripotenciales de control de isotipo y a la tinción de anticuerpo individual. Se excluyeron las células muertas y los residuos estableciendo barreras en los perfiles de dispersión de avance y lateral. Se llevó a cabo la clasificación usando un modo celular individual con el fin de lograr la pureza más elevada posible. De forma común, la pureza de las poblaciones clasificadas fue > 98 %.

Para el análisis directo de las poblaciones celulares clasificadas, se lavaron las células y se suspendieron en disolución salina tamponada con fosfato (PBS), y se sometieron a cito-centrifugado sobre portaobjetos silanizados (DAKO). Se llevó a cabo la tinción X-gal como se ha descrito previamente (Kablir, 1997, Development, 124, 4729-4738).

Cultivo celular y líneas celulares estables

Se aislaron mioblastos primarios a partir de músculo de extremidades posteriores de ratón Balb/c de 3 semanas, y se mantuvieron en medio F-10 de HAM (Invitrogen) complementado con 20 % de PBS, y 2,5 ng/ml de bFGF (Invitrogen). Se prepararon las fibras musculares individuales a partir de músculo largo extensor de los dedos como se ha descrito previamente (Rosenblatt, 1995). Se obtuvieron células AtT-20, BOSC 23, C3H10T1/2 y Cos1 a partir de ATCC y se mantuvieron en DMEM complementado con 10 % de PBS. Se derivaron las líneas celulares estables que expresaban proteínas HA-Wnt como se ha descrito previamente (Shimizu, 1997, Cell Growth Differ 8, 1349-1358). Se confirmó la expresión de HA-Wnts por medio de análisis de inmunotransferencia de Western con anticuerpo anti-HA (HA-7, Sigma).

Experimentos de co-cultivo e inmunohistoquímica

Para los experimentos de co-cultivo, se mezclaron mioblastos primarios o células que expresaban Wnt con células CD45+ Sca1 purificadas en una proporción de 1:1, y se sembraron sobre Portaobjetos de Cámara Permanox de 20 pocillos revestidos con colágeno (Lab-Tek). La densidad fue de 2×10^4 células/cámara para el co-cultivo en condiciones de proliferación, y de 4×10^4 células/cámara para los experimentos de diferenciación. Se mantuvieron los co-cultivos en medio F-10 de HAM, se complementaron con 20 % de FBS, durante 3 días, y se sustituyeron por DMEM/ 5 % de Suero de Caballo para los experimentos de diferenciación. Para los experimentos de conversión de Li2+ o Shh, se añadió LiCl (Sigma) a 10 mM, o Shh-N (R&D Systems) a 10 o 100 ng/ml al medio de diferenciación. Para el análisis inmunohistoquímico, se fijaron las células con 2 % de PFA durante 15 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizaron con 0,05 % de Triton-X durante 15 min, se bloquearon con 1 % de BSA/ 5% de HS en PBS, y se sometieron a tinción durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpos: MyoD, clon 5.8A (BD Pharmingen); Cadena Pesada de Miosina, clon MF-20 (Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)); Pax7 (DSHB); o β -catenina (BD Transduction Laboratories). Se usaron anticuerpos conjugados con fluoresceína o rodamina (Chemicon) para la detección secundaria. Se montaron los cubreobjetos sobre los portaobjetos y se analizó usando un microscopio fluorescente Zeiss Axioscop.

RT-PCR, clonación y secuenciación.

Se sometió a extracción ARN total usando estuches de RNAeasy (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para los análisis de la expresión de gen de *Frizzled*, se llevó a cabo RT-PCR con primeros completamente degenerados que correspondían a secuencias de *frizzled* conservadas YPERPIIF y WWVILSLTW, como se ha descrito previamente (Malik, 2000, Biochem J 349 Pt 3, 829-834). Se clonaron los productos para dar lugar al vector TOPO-PCR II (Invitrogen) y se sometieron a secuenciación. Se llevó a cabo el análisis RT-PCR de ARNm de Wnt usando el estuche GeneAmp PCR Core (Perkin-Elmer). Se usaron los siguientes primeros: Wnt1 (5'-

acgtacagtggccgctg-3'; 5'-acgcgctgtgctgctgcagtt-3'; 203 bp); Wnt3a (5'-ggagatggtgtagagaaa-3'; 5'-atagacacgtgtgcactc-3'; 322 bp); Wnt4 (5'-agccccgttctgctgctgctgctg-3'; 5'-actccaccgcatgtgtgca-3'; 607 bp); Wnt5a (5'-aatggctttggccagctttt-3'; 5'-tgattcgttccctt-3'; 541 bp); Wnt 5b (5'-agtgagagaccggagattc-3'; 5'-ffcaagttcttctcaccg-3'; 459 bp); Wnt7a (5'-agcgcgctgctgctgctgctg-33; 5'-cttcagaaaggtggccgctgttt-3'; 752 bp);
 5 Wnt7b (5'-ccgacacctgcccggggccgac-3'; 5'-gtcggccccggcgaggtgctg-3'; 180 bp); Wnt10a (5'-aagtcctacgagagccc-3', 5'-cagcttccgacgaaagctt-3'), Wnt10b (5'-cggctgcccaccacagcgc-3', 5'-cagcttgctctaagccggt-3') sFRP1 (5'-cgcccgtctgtctggaccg-3'; 5'-ctcgttgcacagagatgt-3', 257 bp); sFRP2 (5'-ttcggccagcccgacttctcc-3'; 5'-taggtcgtcgagacagacagggg-3', 324 bp); sFRP3 (5'-atttctatggatcaagtactg-3'; 5'-ttgacttcttaccagccgatcctt-3'; 396 bp); sFRP4 (5'-tggatagacatcacaccagatat-3'; 5'-cctgaagcctcttcca-3', 423 bp).

10 REGENERACIÓN INDUCIDA POR CARDIOTOXINA

Se anestesiaron ratones de 5 a 8 semanas con gas halotano. Se inyectaron 25 µl de cardiotoxina 10 µM (Latoxan) directamente en el músculo TA, usando una jeringa de insulina 29 G 1/2. Para los ensayos de proliferación celular, se inyectaron por vía intraperitoneal 0,3 mg/kg de 5-bromo-desoxiuridina (BrdU, Sigma) 90 minutos antes de sacrificar los animales. Se detectaron las células que había incorporado BrdU por medio de citometría de flujo usando un anticuerpo anti-BrdU conjugado con FITC (BD Pharmingen). Para los experimentos de sFRP, se inyectaron 100 ng de sFRP 2 y 3 recombinante (R&D Systems) en músculo TA en regeneración. Los animales de control recibieron inyecciones de volúmenes iguales de PBS. Para los análisis de poblaciones celulares TA totales, se colocaron 1×10^4 células mononucleares sobre portaobjetos de cámara revestida con colágeno durante la noche y posteriormente se sometieron a tinción con anticuerpo anti-Desmina (DAKO) a 1:200. Se usaron FITC anti-ratón de mono (Chemicon) a 1:500 para la detección secundaria.

25 *Análisis de inmunotransferencia Western*

Se congelaron de forma instantánea músculos TA no lesionados y en regeneración en nitrógeno líquido, se trocearon y se sometieron a lisis en tampón de extracción (50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 0,1 % de Triton-X100, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM, Na F 50 mM, inhibidores de proteasa (Compleat, Roche). Se normalizaron los extractos en cuanto al contenido de proteínas usando un colorante de Bio-Rad. Se separaron 50 µg de lisato por medio de electroforesis de gel de poliacrilamida-sulfato de dodecil sodio (SDS-PAGE) y se transfirieron sobre filtros de nitrocelulosa. Se sondaron los filtros con anticuerpos hasta Wnt5a, 1:200 (AF645, R&D Systems); β-catenina, 1:250 (BD Transduction Laboratories), α-tubulina, 1:2000 (T 9026, Sigma). Se llevó a cabo una detección secundaria con anticuerpos conjugados de peroxidasa de rábano rusticano (BioRad). Se visualizó la expresión de las proteínas usando un estuche ECL Plus (Amersham).

35 *Perfil de expresión de Affimetrix del músculo en regeneración*

Se llevó a cabo el perfil de expresión génica y los datos de análisis de músculo gastrocnemio en regeneración de ratón en CNMC Research Center como se describe por parte de Zhao, 2002, J Biol Chem 277, 30091-30101. Brevemente, se inyectaron 100 µl de cardiotoxina 10 mM (ctx) (Calbiochem) a los músculos gastrocnemios. Se preparó ARN procedente de 4 músculos individuales en el momento 0 (sin inyección), 12 h, 1 día, 2 días y 10 días después de la inyección de ctx. Se obtuvo ARNc marcado con biotina para cada fracción replicada, se fragmentó y se sometió a hibridación hasta obtener microplaquetas de genoma U74A murino versión 1 (Affymetrix). Los datos principales y los análisis de comparación se llevaron a cabo usando Affymetrix Microarray Suite 4.0 como se ha descrito previamente (Chen, 2000, J Cell Bio 151, 1321-1336).

Resultados

50 *Compromiso miogénico de células CD45+:Sca1+ durante la regeneración muscular*

Se purificaron células que expresaban el marcador CD45 pan-hematopoyético y el Antígeno-1 de Células Pluripotenciales de marcador de células pluripotenciales, a partir de músculo *tibialis anterior* (TA) y en diferentes momentos después de la regeneración inducida por cardiotoxina (ctx) (figura 1A). La proporción de células que expresan CD45 y Sca1 aumentó de media 10 veces durante la regeneración (n= 6) (figura 1A). De manera interesante, la incorporación selectiva de BrdU al interior de las células CD45⁺:Sca1⁺ (60 % de BrdU + células) y CD45⁺:Sca1⁺ (18 % de BrdU + células) en los 4 días posteriores a la inyección sugirió que estas células experimentan la proliferación extensiva durante la regeneración (figura 1B). Estas observaciones demuestran que las células musculares que expresan CD45 y Sca1 se activan y proliferan en respuesta al daño muscular.

60 Para identificar específicamente las células que habían entrado en el programa miogénico, se indujo la regeneración muscular en animales inoculados con *Myf5nLacZ* de heterocigoto, en los cuales el gen LacZ se expresa a partir del locus del gen *Myf5*. En estos ratones indicadores, la expresión de LacZ recapitula fielmente el patrón de expresión del gen *Myf5* endógeno y se induce rápidamente tras el compromiso miogénico (Tajbakhsh, 1995, Development, 121, 4077-4083). Se separaron las células CD45+:Sca1+ partir de músculo no lesionado en regeneración 4 días
 65 después de la inyección de ctx y se usaron inmediatamente para preparar centrifugados celulares.

De manera importante, las células CD45⁺:Sca1⁺ y CD45⁻:Sca1⁺ purificadas procedentes de músculo no lesionado fueron siempre *Myf5nLacZ* negativo y nunca dieron lugar a células musculares determinadas *in vitro* (n=6). Sorprendentemente, sin embargo, las células 7,2+/-2,6 % de células CD45⁺:Sca1^{alto} (n=6) (véase la figura 1A) y 3,8 +/-1,8 % de células CD45⁻:Sca1⁺ (n=3) procedentes de músculos en regeneración 4 días después de la lesión co-expresaron *Myf5nLacZ* (figura 1C). Una proporción similar de células CD45⁺:Sca1^{alto} purificadas a partir de músculo en regeneración (4 días después de la lesión) expresó MyoD (figura 1D), la proteína de filamento intermedia específica del músculo, Desmina (figura 1D) y la proteína Pax7 específica de la célula satélite (datos no mostrados). Además, las células CD45⁺:Sca1⁺ separadas a partir de músculo en regeneración se diferenciaron para dar lugar a miocitos que expresaban la Cadena Pesada de Miosina (MHC) tras el cultivo en un medio de diferenciación (figura 1D). La ausencia completa de expresión de *Myf5nLacZ* en las células CD45⁺:Sca1⁻ durante toda la regeneración indicó la activación específica de miogénesis en las células CD45⁺:Sca1⁺ y CD45⁻:Sca1⁺. Se obtuvieron resultados similares en experimentos sobre células que habían sido clasificadas dos veces.

También se examinó el impacto de ctx sobre los números de progenitores miogénicos presentes dentro del músculo lesionado (véase también, Asakura, 2002, J Cell Biol 159, 123-134). De manera interesante, 18 horas después de la inyección de ctx, se redujo el número de células *Myf5nLacZ* en aproximadamente 30 veces con respecto al músculo no lesionado ($1,18 \times 10^5 \pm 1 \times 10^3$ en comparación con $4,1 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$ de células *Myf5nLacZ*/tejido) (figura 1E). Esta observación no se debe al silenciado del promotor de *Myf5* inducido por ctx ya que los ensayos de formación de colonias de todas las células musculares produjeron una disminución similar de las células miogénicas de MyoD⁺ y Desmina⁺ 18 horas después de la inyección de ctx.

Para determinar la contribución miogénica relativa de las células CD45⁺:Sca1⁺ durante la regeneración, se calcularon los números de células que expresaban *Myf5nLacZ* procedentes de las diferentes fracciones musculares. El análisis (n>3 en cada momento de tiempo) reveló que CD45⁺:Sca1^{alto}, CD45⁻:Sca1⁺; y CD45⁻:Sca1⁻ dieron lugar a una media de $1,5 \times 10^5$, $3,9 \times 10^5$ y 2×10^3 células de *Myf5nLacZ*/g de tejido respectivamente, 4 días después de la inyección de ctx (figura 1F). Estos números representan valores medios recopilados a partir de experimentos independientes en los cuales se usaron poblaciones separadas procedentes de músculo *Myf5nLacZ* para preparar centrifugados celulares. Particularmente, los progenitores miogénicos comprometidos (CD45⁻:Sca1⁻) alcanzaron una cantidad de $6,0 \times 10^6$ células *Myf5nLacZ*/g de tejido, 4 días después de la lesión. De este modo, la toxicidad aparente de ctx sobre las células satélite refuerza la cuestión de si la población de células satélite residentes representa de hecho la única fuente de progenitores miogénicos tras la lesión muscular inducida por ctx.

Tomados de manera conjunta, estos experimentos documentan la capacidad de las células CD45⁺ y Sca1⁺ de experimentar especificación miogénica en respuesta al daño muscular. De manera importante, esta observación demuestra que las células que no son satélites derivaron en progenitores que participan en los procesos normales de restitución.

Compromiso miogénico de células CD45⁺:Sca1⁺ inducido por co-cultivo con mioblastos o exposición a litio

Como se ha comentado anteriormente, las células CD45⁺:Sca1⁺ purificadas a partir de músculo esquelético no lesionado no forman células miogénicas de forma espontánea (véase también, Asakura, 2002, J Cell Biol 159, 123-134; MacKinney-Freeman, 2002, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 99, 1341-1346). No obstante, en el co-cultivo de mioblastos primarios, un 0,5±0,03% de introducción de células musculares CD45⁺:Sca1⁺ procedentes de ratones transgénicos EGFP formó miocitos que expresaban MHC mononucleares (figura 2A, control). La frecuencia de la diferenciación miogénica es una sobreestimación de la eficacia actual debido a que EGFP únicamente es detectable en 50 % de las células musculares procedentes de estos ratones transgénicos y la eficacia de preparación de cultivos de células CD45⁺:Sca1⁺ es baja. La ausencia completa de células miogénicas observada en las fracciones CD45⁺:Sca1⁺ cultivadas solas (n=6) excluyó cualquier contaminación posible de los co-cultivos con mioblastos debida a la clasificación.

Se activan los mecanismos de señalización de Wnt por medio de litio durante la inhibición GSK-3β, y la estabilización de β-catenina en las células tratadas (Hedgepeth, 1997, Dev Biol 185, 82-91). Por tanto, con el fin de investigar si los mecanismos de señalización Wnt estaban implicados en este fenómeno, se expusieron co-cultivos de células musculares CD45⁺:Sca1⁺ y mioblastos primarios a LiCl 10 mM. Sorprendentemente, los co-cultivos con LiCl 10mM dieron como resultado un aumento de 15 veces en la frecuencia de GFP⁺, miocitos que expresan una cadena pesada de miosina (MHC) hasta un 7,5 % de células de introducción (n = 3) (figura 2A). Además, las células CD45⁺:Sca1⁺ cultivadas sin mioblastos en un medio de diferenciación que contiene LiCl experimentaron diferenciación miogénica como queda evidenciado por medio de la expresión de MHC (figura 2B). No obstante, en condiciones de proliferación, LiCl indujo la muerte rápida de las células miogénicas en 48 h excluyendo el análisis adicional de estos cultivos. En resumen, estos resultados sugieren que la activación de los mecanismos de señalización de Wnt indujo especificación miogénica de las células CD45⁺:Sca1⁺ aisladas a partir de músculo esquelético adulto.

También se sometió a ensayo la capacidad de Sonic Hedgehog (Shh) para estimular la miogénesis en células musculares CD45⁺:Sca1⁺. La adición de Shh recombinante a 10 o 100 ng/ml sobre células CD45⁺:Sca1⁺ solas o en

co-cultivo con mioblastos no provocó influencia alguna sobre su eficacia de diferenciación miogénica. No obstante, se observó un aumento de 3-4 veces en la supervivencia de las células CD45⁺:Sca1⁺ tras la exposición a 100 ng/ml de Shh.

5 *Inducción de la expresión de Wnt y sFRP en músculo en regeneración*

10 Para analizar las cinéticas de expresión de los genes en la cascada de señalización Wnt durante la regeneración de músculo esquelético, se empleó análisis RT-PCR semi-cuantitativo. Se indujeron ARNm para Wnt 5a, 7a y 7b en músculo en regeneración (4 días después de la lesión), mientras que Wnt4 estuvo intensamente infra-regulado (figura 3A). En un segundo experimento usando PCR en tiempo real, la expresión de los genes en la cascada de señalización Wnt proporcionó los siguientes resultados adicionales listados en la Tabla 3.

Tabla 3: Expresión de productos génicos Wnt con el tiempo

Gen	Día 0	Día 2	Día 5	Día 7	Día 12
Wnt 1	-	-	-	-	-
Wnt 3	-	-	-	-	-
Wnt 5a	+	++	+++	++	+
Wnt 5b	+	+++	++	+	+
Wnt 7b	+	+	++	+	+
Wnt 10a	+	++	+++	++	+
Wnt 10b	+	+++	+	+	+

15 Con el fin de determinar si la sobre-regulación de Wnts a nivel de ARNm correspondió a una mayor expresión de la proteína, se llevó a cabo el análisis de inmunotransferencia de Western de la proteína Wnt5a. Se comprobó que Wnt5a se expresaba intensamente desde el día 2 hasta el día 10 de la regeneración en dos experimentos independientes. Wnt1 y Wnt3a no se expresaron en ninguna de las muestras analizadas. Se observó una inducción tardía pero intensa de sFRPs 1, 2 y 3 pero no de sFRP4 (figura 3A). Los Fzds no se expresaron en el músculo total, y no hubo inducción alguna durante la regeneración.

25 Además, se analizaron los experimentos de la matriz Affymetrix sobre el músculo gastrocnemio de ratón en regeneración llevados a cabo en CNMC Microarray Center. Se sometió a ensayo la expresión génica en músculo no lesionado (control) en 12 h, 1 día, 4 días y 10 días después de la inyección con 4 réplicas independientes llevadas a cabo para cada momento de tiempo (disponible públicamente en: <http://microarray.cnmcresearch.org>). Únicamente se estudiaron de manera adicional los genes que mostraron cambios de expresión > de 2 veces entre el control y las muestras experimentales (en regeneración) siguiendo 4 comparaciones posibles por pares. Los análisis de estos datos confirmaron que Wnts 5a, 5b, 7a y 7b estaban sobre-reguladas en un momento tan incipiente como 24 horas después de la lesión, manteniéndose niveles elevados de expresión durante el transcurso de tiempo de la regeneración de 10 días. Por el contrario, los sFRPs, estaban infra-regulados de manera tardía en la regeneración desde el día 4 al día 10 posteriores a la lesión. Específicamente, sFRP1, 2 y 4 estaban sobre-regulados 7,3+/- 1,2, 3,9+/-0,3 y 7,4+/-4,1 veces con respecto a los 10 días de regeneración relativos al músculo no lesionado (media de 4 comparaciones por pares). En resumen, los estudios de expresión génica sugieren posibles cometidos para los polipéptidos wnt incluyendo Wnts 5a, 5b, 7a, 7b, 10a y 10b en la regeneración muscular.

35 *Expresión de Wnt y sFRP en mioblastos, miotubos y fibras musculares aisladas*

40 Debido a la capacidad de las células CD45⁺:Sca1⁺ para experimentar la conversión miogénica en co-cultivo con mioblastos primarios (figura 2), se examinó la expresión de Wnts y sFRPs en mioblastos, miotubos y miofibras. De manera importante, Wnts5a y 5b se expresaron en mioblastos en proliferación, pero no en miotubos diferenciados. Por el contrario, Wnt7a se expresó en miotubos, pero no en mioblastos (figura 3B). De manera interesante, los tres Wnts se expresaron en fibras musculares individuales aisladas. No obstante, ARNm para Wnt7b no se detectó en ninguna muestra. Finalmente, sFRPs 1-4 también se expresaron en mioblastos, miotubos y fibras musculares (figura 3B). Por tanto, estos resultados sugieren la hipótesis de que la expresión de Wnt5a y Wnt5b en mioblastos induce el compromiso miogénico de las células pluripotenciales CD45⁺ adultas en los experimentos de co-cultivo de los autores. Además, estos datos sugieren que la señalización combinada por medio de Wnt 5a, 5b y 7a segregadas por miofibras y mioblastos en el músculo en regeneración es responsable del compromiso miogénico de las células pluripotenciales procedentes de músculo adulto.

50 *Las células CD45⁺:Sca1⁺ expresan Frizzled-1, 4 y 7*

Si las células CD45⁺:Sca1⁺ representaran la diana putativa para Wnts durante la regeneración muscular, se predice que las células CD45⁺:Sca1⁺ expresarían el receptor Wnt Frizzled (Fzd). Por tanto, se aislaron las células

CD45⁺:Sca1⁺ a partir de músculo TA en reposo y en regeneración y se examinó la expresión de Fzds. Se llevó a cabo RT-PCR para Fzds con primeros completamente degenerados seguido de clonación y secuenciación de los productos de PCR. Se observó que las células CD45⁺:Sca1⁺ procedentes del músculo en reposo expresaron Fzd1 y 4. A los 4 días después de la inyección de ctx, las células CD45⁺:Sca1⁺ sobre-regularon la expresión de Fzd, expresando sobre todo y de manera adicional Fzd7 (figura 3C). De manera importante, la sobre-regulación observada de la expresión de ARNm de Fzd fue específica para la población de CD45⁺:Sca1⁺ y no se observó cambio alguno en la expresión de ARNm de Fzd en el ARN aislado a partir de músculo TA total en reposo y en regeneración.

10 *Las células CD45⁺:Sca1⁺ sobre-regulan β -catenina durante la regeneración muscular*

Para determinar si se activó la señalización Wnt en el músculo en regeneración, se empleó análisis de inmunotransferencia Western para detectar β -catenina. La estabilización y la acumulación nuclear de β -catenina es el contraste para la activación de los mecanismos Wnt canónicos en las células de respuesta (Pandur, 2002, Bioessays, 24, 881-884). Se produjo la sobre-regulación intensa de β -catenina en los extractos procedentes del músculo TA en regeneración total con respecto al músculo no lesionado (figura 4A). De manera importante, se indujo la expresión de la proteína de β -catenina hasta niveles elevados en células CD45⁺:Sca1⁺ tras la lesión muscular (figura 4B). Por el contrario, las células CD45⁺:Sca1⁺ no expresaron niveles detectables de β -catenina. En el músculo en regeneración, la población de CD45⁺:Sca1⁻, formada casi exclusivamente por mioblastos (observación no publicada), también expresó niveles elevados de β -catenina. Estos datos apoyan la hipótesis de que las células CD45⁺:Sca1⁺ responden a la señalización Wnt por medio de los mecanismos de señalización Wnt canónicos en el músculo TA en regeneración.

25 *Wnts ecotópicos inducen el compromiso miogénico de células CD45⁺:Sca1⁺*

Para investigar si los Wnts fueron suficientes para inducir la conversión miogénica de las células CD45⁺:Sca1⁺, se estableció un panel de líneas celulares estables que expresaron proteínas Wnt marcadas con HA recombinante. Tras el co-cultivo con células AtT-20 que expresaban Wnts ecotópicos 5a, 5b, 7a y 7b (mezcla de Wnt), las células CD45⁺:Sca1⁺ que expresaban EGFP mostraron localización citoplasmática y/o nuclear de β -catenina (puntas de flecha) coherente con la activación de la señalización Wnt de estas células (figura 5A). Por el contrario, las células CD45⁺:Sca1⁺ co-cultivadas con células AtT-20 sometidas a transfección estable con vector vacío no acumularon β -catenina citoplasmática o nuclear (figura 5A).

En condiciones de proliferación, las células de CD45⁺:Sca1⁺ co-cultivadas con líneas Wnt iniciaron la expresión de la proteína de determinación miogénica, MyoD, y el marcador celular satélite Pax7 (figura 5B). Además, los miocitos MHC-positivo se observaron después de los cultivos y se sustituyeron hasta condiciones de diferenciación durante 48 horas (figura 5B). Por el contrario, las células CD45⁺:Sca1⁺ co-cultivadas con control, células AtT-20 que no expresaban Wnt, no expresaron ningún marcador miogénico (figura 5C). De este modo, la señalización por medio de una mezcla de Wnts 5a, 5b, 7a y 7b condujo al compromiso miogénico de las células CD45⁺:Sca1⁺ *in vitro*. Las líneas celulares que expresaban Wnt individuales indujeron el compromiso miogénico de las células CD45⁺:Sca1⁺ pero con una eficacia menor.

La eficacia de formación de cultivos de las células CD45⁺:Sca1⁺ mostró una reproducibilidad de 2-4 % de células de entrada, aproximadamente la misma eficacia de formación de cultivos observada con los mioblastos primarios recién aislados. Tras tres días de cultivo, 2-4 % del número de células CD45⁺:Sca1⁺ de EGFP+ de entrada estuvo presente después del co-cultivo con células AtT-20 que expresaban Wnt. De manera importante, más de 90 % de las células CD45⁺:Sca1⁺ supervivientes se convirtió en linaje miogénico. Tomados de manera conjunta, estos experimentos demuestran que la señalización Wnt activa la especificación miogénica de las células CD45⁺:Sca1⁺ aisladas a partir de músculo no lesionado.

50 *Los sFRPs inyectados reducen drásticamente la selección miogénica de células CD45⁺:Sca1⁺*

Para evaluar la relevancia de la señalización Wnt como efector de la regeneración muscular *in vivo*, se inyectaron antagonistas sFRP2 y 3 de Wnt recombinante (100 ng de cada uno), en base diaria, en músculos en regeneración de ratones *Myf5nlacZ*. Se emplearon tres grupos de animales de control para evaluar los posibles efectos extraños. No se inyectó ctx en uno de los grupos (control no lesionado), y no recibió las posteriores inyecciones de sFRP. El segundo grupo recibió una inyección inicial de PBS en lugar de ctx, seguido de las inyecciones diarias de sFRP. Se inyectó ctx al grupo final para inducir la regeneración, seguido de la inyección diaria de PBS en lugar de los sFRPs.

El análisis citométrico de flujo de las células musculares demostró que el aumento de la fracción CD45⁺:Sca1^{alto} observada 4 días después de la lesión (figura 6B) se redujo aproximadamente 4 veces por medio de inyecciones diarias de sFRPs 2 y 3 (figura 6C). Además, los números reducidos de células CD45⁺:Sca1^{alto} no fueron el resultado de la disminución concomitante en los números totales de células mononucleares. De manera importante, la inyección de sFRPs en músculo no lesionado no indujo regeneración, o produjo cambios morfológicos algunos en el músculo TA (figura 6A).

Se examinó la proporción de células CD45⁺:Sca1⁺ que expresaban *Myf5nLacZ* a los 5 días tras las inyecciones diarias de sFRP. Como se ha comentado anteriormente (figura 1), 6,71±1,44 % de las células CD45⁺:Sca1^{alto} obtenidas directamente a partir del músculo en regeneración 4 días después de la lesión expresó *Myf5nLacZ* (n=3) (figura 6B). De manera importante, *Myf5nLacZ* no se expresó en células CD45⁺:Sca1⁺ aisladas a partir de músculo no lesionado (figura 6D). De manera sorprendente, la inyección diaria de sFRP 2 y 3 en músculo en regeneración dio como resultado una reducción de aproximadamente seis veces en los números de células *Myf5nLacZ*⁺ de la fracción CD45⁺:Sca1⁺ (figura 6D). De este modo, la inhibición de la señalización Wnt redujo de manera marcada la especificación miogénica de las células CD45⁺:Sca1⁺ *in vivo*.

Para caracterizar más el efecto de los sFRPs sobre la regeneración muscular, se analizó la recuperación de las células miogénicas en el conjunto total de células mononucleares a partir de músculo 4 días después de la lesión. Se colocaron en placas 1x10⁴ células procedentes de tres grupos de experimentos en cada pocillo y se analizaron 24 horas después para evaluar la expresión de Desmina, un marcador específico para las células de músculo esquelético (figura 6E). La inyección diaria de sFRPs produjo una reducción de aproximadamente 7 veces en el número de mioblastos mononucleares que expresaban Desmina en el día 4 de la regeneración del músculo TA con respecto al músculo en regeneración al que se había inyectado PBS (4,47 x 10⁵ +/- 1x10⁵ en comparación con 6,03x10⁴ +/-3,03x10⁴ células/gramo de tejido) (figura 6E).

20 *Tratamiento in vivo de animales con LiCl*

Se separaron ratones *Myf5nLacZ* macho de 8-10 semanas en 2 grupos. El primer grupo (n=3) recibió una inyección intraperitoneal de cloruro de litio (2 mg/kg/día en un volumen de aproximadamente 100 µl) (Sigma) y el segundo (n=3) recibió una inyección salina (100 µl/día) durante 14 días. Diez días después del inicio del tratamiento, se indujo la regeneración con inyección de cardiotoxina (25 µl de cardiotoxina 10 µM (Laxotan) inyectados directamente en el músculo TA usando una jeringa de insulina 29 G 1/2).

Para el análisis de la población celular mononuclear, se recogieron TA, se disociaron mecánicamente y se sometieron a digestión con Colagenasa-Dispasa como se ha descrito previamente (Megeny, L.A., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J.E., Rudnicki, M.A. (1996), *Genes Dev* 10, 1173-1183). Se requiere MyoD para la función de las células pluripotenciales miogénicas en músculo esquelético adulto. Se colocaron 2x10⁵ células en placas sobre portaobjetos de cámaras revestidas con colágeno durante la noche, posteriormente se fijaron en paraformaldehído de 4 % durante 10 minutos y se sometieron a tinción durante la noche con una disolución que contenía X-gal. La figura 8 muestra los resultados.

35 *Efecto de la expresión de la proteína Wnt sobre células de mioblastos primarias*

En un experimento alternativo, se subclonaron fragmentos de ADNc de Wnt-5a, -5b, -7b, β-catenina y β-catenina-IRES-lef1 en un vector de retrovirus, pHAN (puro). Para preparar retrovirus ecotópico, se sometieron las células encapsuladas Phoenix-eco a transfección con vectores de retrovirus por medio del uso de lipofectoAMINE (Invitrogen). Se recogieron los sobrenadantes víricos 30 horas después de la transfección y se usaron para infectar células de mioblastos primarias en presencia de polibreno (Sigma, 8 mg/ml). Se seleccionaron las células infectadas 24 horas después de la infección con puomicina (Sigma, 1 mg/ml). Se sometieron los mioblastos primarios seleccionados a proliferación en cubetas de cultivo de 100 mm, se lavaron dos veces con PBS y se sometieron a lisis en 100 ml de tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (50 mM de Tris HCl, pH 7,5; NaCl 150 mM; Nonidet 0,5 % P-40; desoxicolato 0,1 %) que contenía una mezcla de inhibidores de proteasa (Roche). Se recogieron los extractos celulares y se centrifugaron en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 5 minutos. Se separaron las proteínas totales (5 µg) por medio de SDS-PAGE de 10 % y se transfirieron a Inmmobilon-P (Millipore). Se sondaron las membranas con anticuerpos primarios, seguido de anticuerpos secundarios conjugados con HRP a 1:5.000 (Bio-Rad) y se desarrollaron usando ECLTM Plus (Amersham Biosciences). Se expusieron las membranas a película BIOMAX (Kodak). Los anticuerpos primarios usados en este trabajo: anti-PAX7 (1:2), β-catenina (BD Bioscience, 1:2.000), anti-HA (Sigma, 1:5.000) y anti-α-tubulina (Sigma, 1:4.000). Los resultados se muestran en la figura 9.

55 **Referencias**

Aguiar, R. C., Chase, A., Coulthard, S., Macdonald, D. H., Carapeti, M., Reiter, A., Sohal, J., Lennard, A., Goldman, J. M., y Cross, N. C. (1997). Abnormalities of chromosome band 8p11 in leukemia: two clinical syndromes can be distinguished on the basis of MOZ involvement. *Blood* 90, 3130-3135.

Asakura, A., Seale, P., Girgis-Gabardo, A., y Rudnicki, M. A. (2002). Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 159,123-134.

Baranski, M., Berdugo, E., Sandler, J. S., Damell, D. K., y Burrus, L. W. (2000). The dynamic expression pattern of *frzb-1* suggests multiple roles in chick development. *Dev Biol* 217, 25-41.

- Bischoff, R. (1994). The satellite cell and muscle regeneration. In *Myogenesis*, A. G. Engel, and C. Franzini-Armstrong, eds. (New York, McGraw-Hill), pp. 97-118.
- 5 Borello, U., Coletta, M., Tajbakhsh, S., Leyns, L., De Robertis, E. M., Buckingham, M., y Cossu, G. (1999). Transplacental delivery of the Wnt antagonist Frzb1 inhibits development of caudal paraxial mesoderm and skeletal myogenesis in mouse embryos. *Development* 126, 4247-4255.
- Christ, B., y Ordahl, C. P. (1995). Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl)* 191, 381-396.
- 10 Cossu, G., y Borello, U. (1999). Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *Embo J* 18, 6867-6872.
- Davies, J. A., y Fisher, C. E. (2002). Genes and proteins in renal development. *Exp Nephrol* 10, 102-113.
- 15 Dell'Agnola, C., Rabascio, C., Mancuso, P., Capillo, M., Pruneri, G., Gobbi, A., Minucci, S., Ronzoni, S., Volorio, S., Calabrese, L., y col. (2002). In vitro and in vivo hematopoietic potential of human stem cells residing in muscle tissue. *Exp Hematol* 30,905-914.
- Dennis, S., Aikawa, M., Szeto, W., d'Amore, P. A., y Papkoff, J. (1999). A secreted frizzled related protein, FrzA, selectively associates with Wnt-1 protein and regulates wnt-1 signaling. *J Cell Sci* 112, 3815-3820.
- 20 Dierick, H., y Bejsovec, A. (1999). Cellular mechanisms of wingless/Wnt signal transduction. *Curr Top Dev Biol* 43, 153-190.
- 25 Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M., y Mulligan, R. C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390-394.
- Hadjantonakis, A. K., Gertsenstein, M., Ikawa, M., Okabe, M., y Nagy, A. (1998). Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech Dev* 76, 79-90.
- 30 Hall, A. C., Lucas, F. R., y Salinas, P. C. (2000). Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* 100, 525-535.
- Hedgepeth, C. M., Conrad, L. J., Zhang, J., Huang, H. C., Lee, V. M., y Klein, P. S. (1997). Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. *Dev Biol* 185, 82-91.
- 35 Hirsinger, E., Duprez, D., Jouve, C., Malapert, P., Cooke, J., y Pourquie, O. (1997). Noggin acts downstream of Wnt and Sonic Hedgehog to antagonize BMP4 in avian somite patterning. *Development* 124, 4605-4614.
- 40 Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C. M., von Laue, C. C., Snyder, P., Rothbacher, U., y Holstein, T. W. (2000). WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature* 407, 186-189.
- Howell, J. C., Yoder, M. C., y Srour, E. F. (2002). Hematopoietic potential of murine skeletal muscle-derived CD45(-)Sca-1(+)c-kit(-) cells. *Exp Hematol* 30, 915-924.
- 45 Jackson, K. A., Mi, T., y Goodell, M. A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14482-14486.
- 50 Kablar, B., Krastel, K., Ying, C., Asalcura, A., Tapscott, S. J., y Rudnicki, M. A. (1997). MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. *Development* 124, 4729-4738.
- Kopan, R., Nye, J. S., y Weintraub, H. (1994). The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development* 120, 2385-2396.
- 55 LaBarge, M. A., y Blau, H. M. (2002). Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 111, 589-601.
- Labus, M. B., Stirk, C. M., Thompson, W. D., y Melvin, W. T. (1998). Expression of Wnt genes in early wound healing. *Wound Repair Regen* 6, 58-64.
- 60 Lee, J. Y., Qu-Petersen, Z., Cao, B., Kimura, S., Jankowski, R., Cummins, J., Usas, A., Gates, C., Robbins, P., Wernig, A., y Huard, J. (2000). Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol* 150,1085-1100.
- 65 Lescher, B., Haenig, B., y Kispert, A. (1998). sFRP-2 is a target of the Wnt-4 signaling pathway in the developing metanephric kidney. *Dev Dyn* 213, 440-451.

- Levin, J. M., El Andaloussi, R. A., Dainat, J., Reyne, Y., y Bacou, F. (2001). SFRP2 expression in rabbit myogenic progenitor cells and in adult skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 22, 361-369.
- 5 Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S. H., Piccolo, S., y De Robertis, E. M. (1997). Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 88, 747-756.
- Mahmud, N., Weiss, P., Li, F., y Hoffman, R. (2002). Primate skeletal muscle contains cells capable of sustaining in vitro hematopoiesis. *Exp Hematol* 30, 925-936.
- 10 Malik, T. H., y Shivdasani, R. A. (2000). Structure and expression of a novel frizzled gene isolated from the developing mouse gut. *Biochem J* 349 Pt 3, 829-834.
- Marcelle, C., Stark, M. R., y Bronner-Fraser, M. (1997). Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite. *Development* 124, 3955-3963.
- 15 McKinney-Freeman, S. L., Jackson, K. A., Camargo, F. D., Ferrari, G., Mavilio, F., y Goodell, M. A. (2002). Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1341-1346.
- 20 Megeney, L. A., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J. E., y Rudnicki, M. A. (1996). MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev* 10, 1173-1183.
- Munsterberg, A. E., Kitajewski, J., Bumcrot, D. A., McMahon, A. P., y Lassar, A. B. (1995). Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev* 9, 2911-2922.
- 25 Pagel, C. N., y Partridge, T. A. (1999). Covert persistence of mdx mouse myopathy is revealed by acute and chronic effects of irradiation. *J Neurol Sci* 164, 103-116.
- 30 Pandur, P., Maurus, D., y Kuhl, M. (2002). Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network. *Bioessays* 24, 881-884.
- Patapoutian, A., y Reichardt, L. F. (2000). Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol* 10, 392-399.
- 35 Penninger, J. M., Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., y Oliveira-dos-Santos, A. J. (2001). CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat Immunol* 2, 389-396.
- Poss, K. D., Shen, J., y Keating, M. T. (2000). Induction of Irf1 during zebrafish fin regeneration. *Dev Dyn* 219, 282-286.
- 40 Qu-Petersen, Z., Deasy, B., Jankowski, R., Ikezawa, M., Cummins, J., Pruchnic, R., Mytinger, J., Cao, B., Gates, C., Wernig, A., y Huard, J. (2002). Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 157, 851-864.
- 45 Reshef, R., Maroto, M., y Lassar, A. B. (1998). Regulation of dorsal somitic cell fates: BMPs and Noggin control the timing and pattern of myogenic regulator expression. *Genes Dev* 12, 290-303.
- Romero-Ramos, M., Vourc'h, P., Young, H. E., Lucas, P. A., Wu, Y., Chivatakarn, O., Zaman, R., Dunkelman, N., el-Kalay, M. A., y Chesselet, M. F. (2002). Neuronal differentiation of stem cells isolated from adult muscle. *J Neurosci Res* 69, 894-907.
- 50 Rosenblatt, J. D., Lunt, A. I., Parry, D. J., y Partridge, T. A. (1995). Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31, 773-779.
- 55 Sasaki, T., Sasaki-Irie, J., y Penninger, J. M. (2001). New insights into the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 1041-1046.
- Schmidt, M., Tanaka, M., y Munsterberg, A. (2000). Expression of (beta)-catenin in the developing chick myotome is regulated by myogenic signals. *Development* 127, 4105-4113.
- 60 Schultz, E., Jaryszak, D. L., Gibson, M. C., y Albright, D. J. (1986). Absence of exogenous satellite cell contribution to regeneration of frozen skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 7, 361-367.
- 65 Seale, P., y Rudnicki, M. A. (2000). A new look at the origin, function, and "stem cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 218, 115-124.

- Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J. J., Lindsell, C., Bogler, O., Hayward, D., y Weinmaster, G. (1996). Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* 122, 3765-3773.
- 5 Shimizu, H., Julius, M. A., Giarre, M., Zheng, Z., Brown, A. M., y Kitajewski, J. (1997). Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ* 8, 1349-1358.
- Tajbakhsh, S., Borello, U., Vivarelli, E., Kelly, R., Papkoff, J., Duprez, D., Buckingham, M., y Cossu, G. (1998). Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later
10 activation of myogenesis in the absence of Myf5. *Development* 125, 4155-4162.
- Tajbakhsh, S., y Buckingham, M. E. (1995). Lineage restriction of the myogenic conversion factor myf-5 in the brain. *Development* 121, 4077-4083.
- 15 Tamaki, T., Akatsuka, A., Ando, K., Nakamura, Y., Matsuzawa, H., Hotta, T., Roy, R. R, y Edgerton, V. R. (2002). Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J Cell Biol* 157, 571-577.
- Tang, D. G., Tokumoto, Y. M., Apperly, J. A., Lloyd, A. C., y Raff, M. C. (2001). Lack of replicative senescence in
20 cultured rat oligodendrocyte precursor cells. *Science* 291, 868-871.
- Torrente, Y., Tremblay, J. P., Pisati, F., Belicchi, M., Rossi, B., Sironi, M., Fortunato, F., El Fahime, M., D'Angelo, M. G., Caron, N. J., y col. (2001). Intraarterial injection of musclederived CD34(+)/Sca-1(+) stem cells restores dystrophin
25 in mdx mice. *J Cell Biol* 152, 335-348.
- Vainio, S. J., y Uusitalo, M. S. (2000). A road to kidney tubules via the Wnt pathway. *Pediatr Nephrol* 15, 151-156.
- Van Den Berg, D. J., Sharma, A. K., Bruno, E., y Hoffman, R. (1998). Role of members of the Wnt gene family in
30 human hematopoiesis. *Blood* 92, 3189-3202.
- Wakeford, S., Watt, D. J., y Partridge, T. A. (1991). X-irradiation improves mdx mouse muscle as a model of myofiber loss in DMD. *Muscle Nerve* 14, 42-50.
- Wodarz, A., y Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 59-88.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición para uso en un método para tratar un sujeto, en la que dicho sujeto se caracteriza por exhibir o presentar degeneración muscular o agotamiento muscular, caracterizada por modular la proliferación, diferenciación o tanto la proliferación como la diferenciación de células pluripotenciales musculares CD45+:Sca1+, comprendiendo la composición Wnt 7a y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; en la que las células pluripotenciales musculares CD45+:Sca1+ no son células pluripotenciales embrionarias humanas.
- 10 2.- La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende una o más células pluripotenciales musculares CD45+:Sca1+.
- 15 3.- El uso de Wnt 7a, para la preparación de un medicamento para tratar un sujeto, en el que dicho sujeto se caracteriza por exhibir o presentar degeneración muscular o agotamiento muscular, caracterizado por modular la proliferación, diferenciación o tanto la proliferación como la diferenciación de células pluripotenciales musculares CD45+:Sca1+ de dicho sujeto, en el que las células pluripotenciales musculares CD45+:Sca1+ no son células pluripotenciales embrionarias humanas.
- 20 4.- El uso de la reivindicación 3, en el que el medicamento además comprende una o más células pluripotenciales musculares CD45+:Sca1+.
- 25 5.- Un método ex vivo para modular la proliferación, diferenciación o tanto la proliferación como la diferenciación de una población de células pluripotenciales musculares CD45+:Sca1+ que comprende poner en contacto dicha población con una composición que comprende Wnt 7a, y un vehículo o diluyente; en el que las células pluripotenciales musculares CD45+:Sca1+ no son células pluripotenciales embrionarias humanas.
- 6.- Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la composición además comprende una o más células pluripotenciales musculares CD45+:Sca1+.

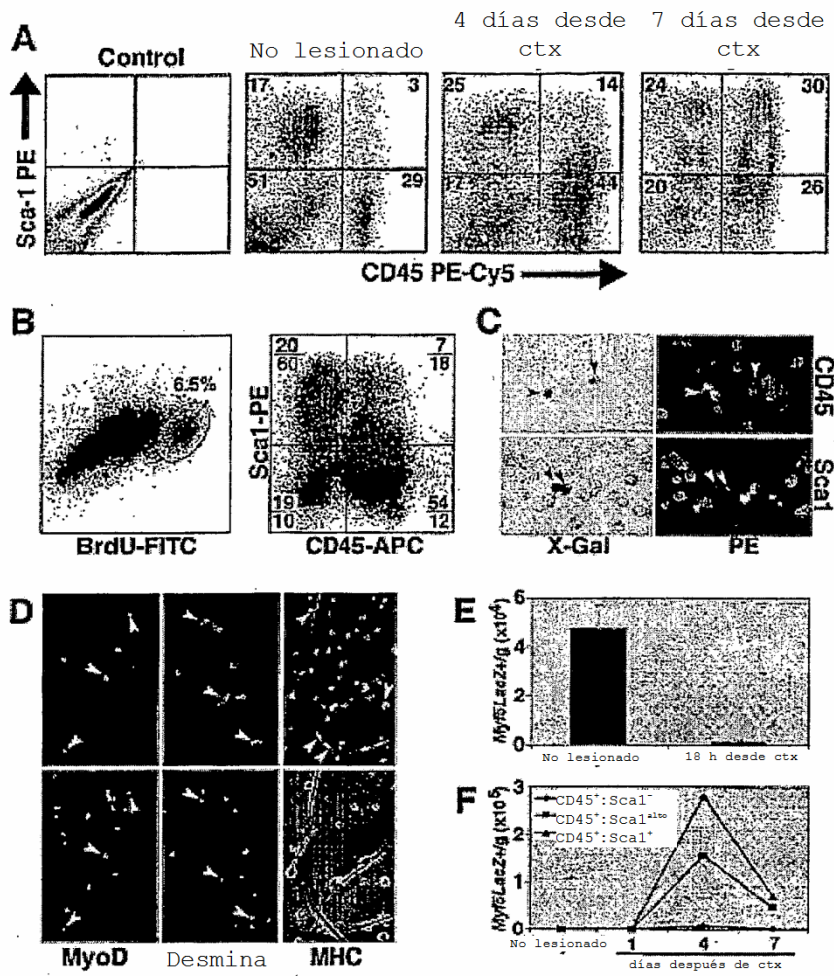


FIGURA 1

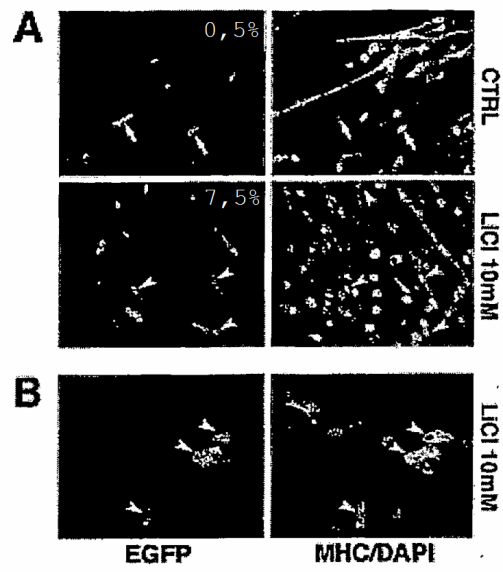


FIGURA 2,

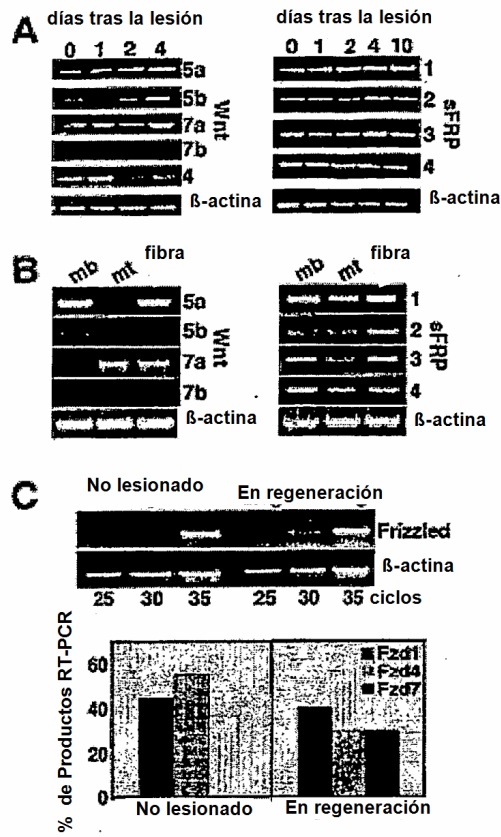


FIGURA 3

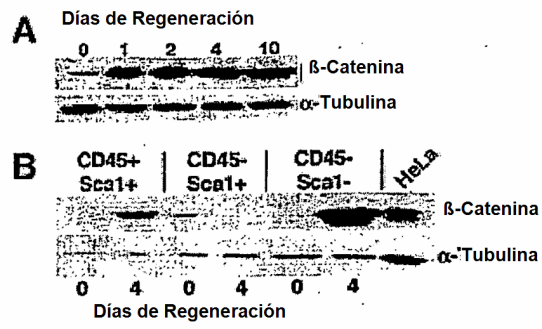


FIGURA 4

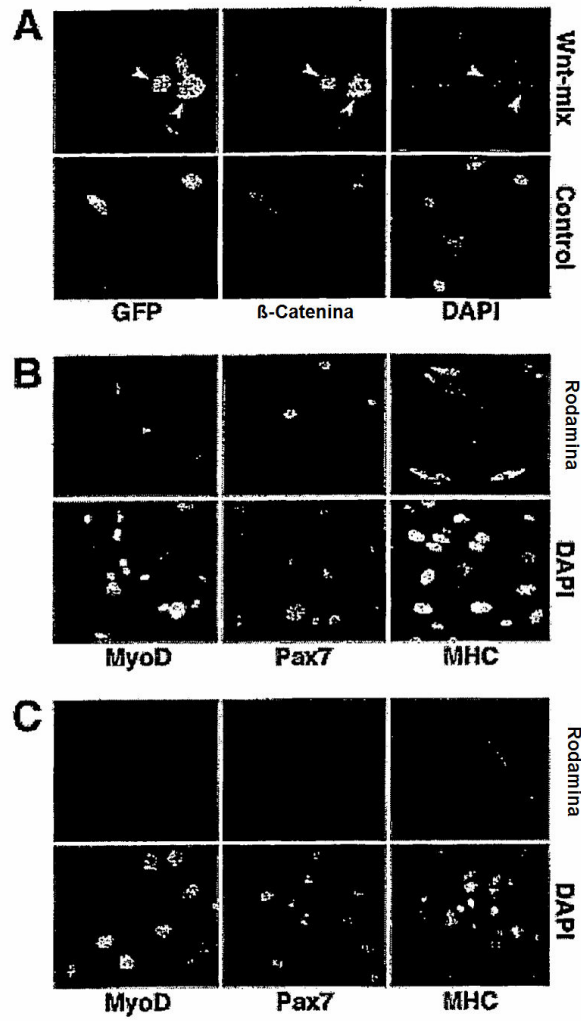


FIGURA 5

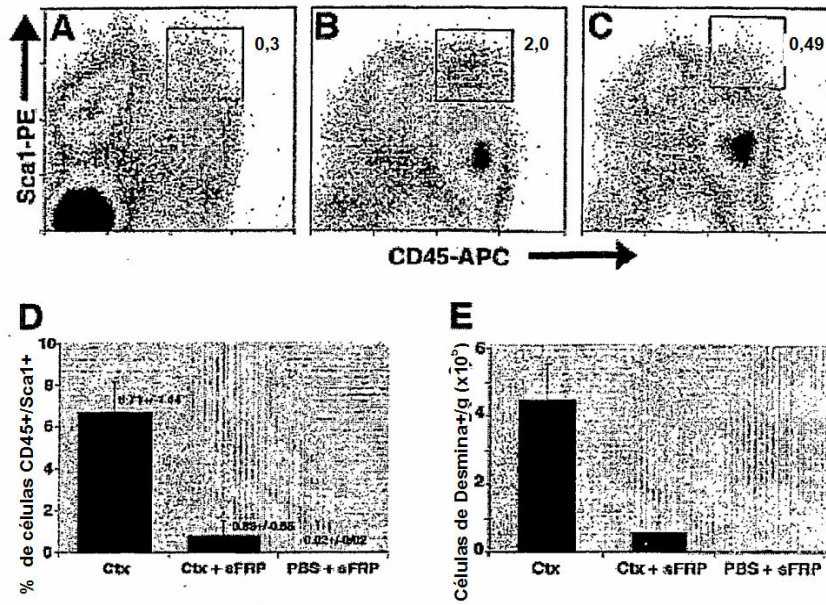


FIGURA 6

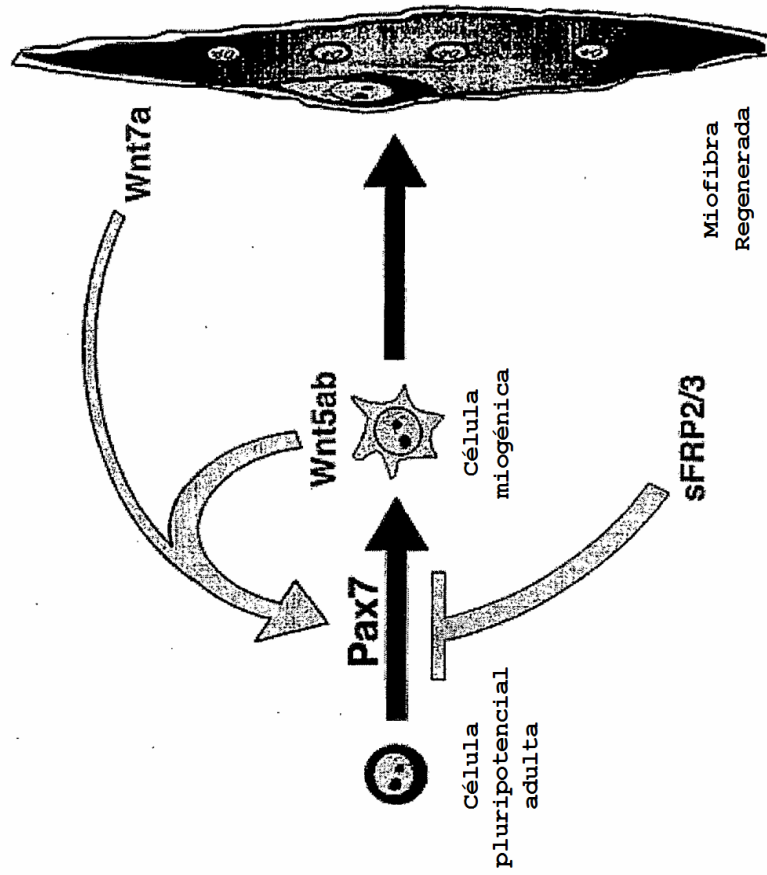
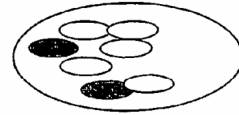
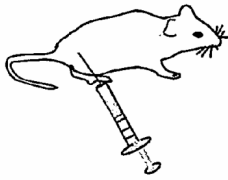


FIGURA 7

FIGURA 8A



Día 1-14

Inyección IP
diaria de LiCl
(2 mg/kg) o PBS
(control)

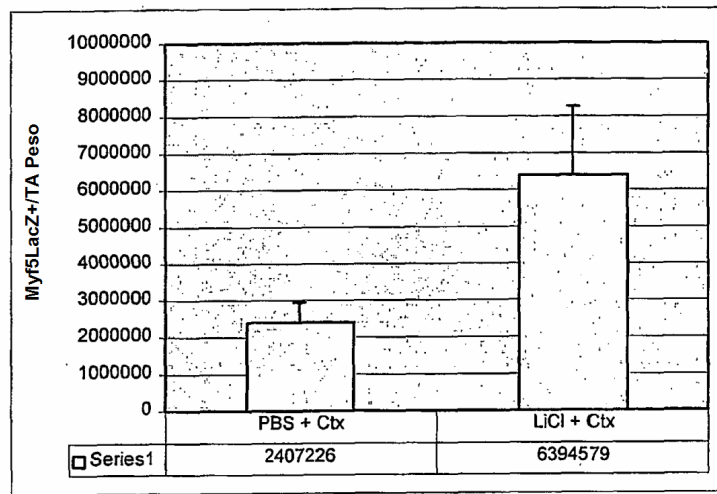
Día 10

Cardiotoxina
Lesión en el
músculo TA

Día 15

Tinción de X-Gal
y cuenta de
células azules

FIGURA 8B



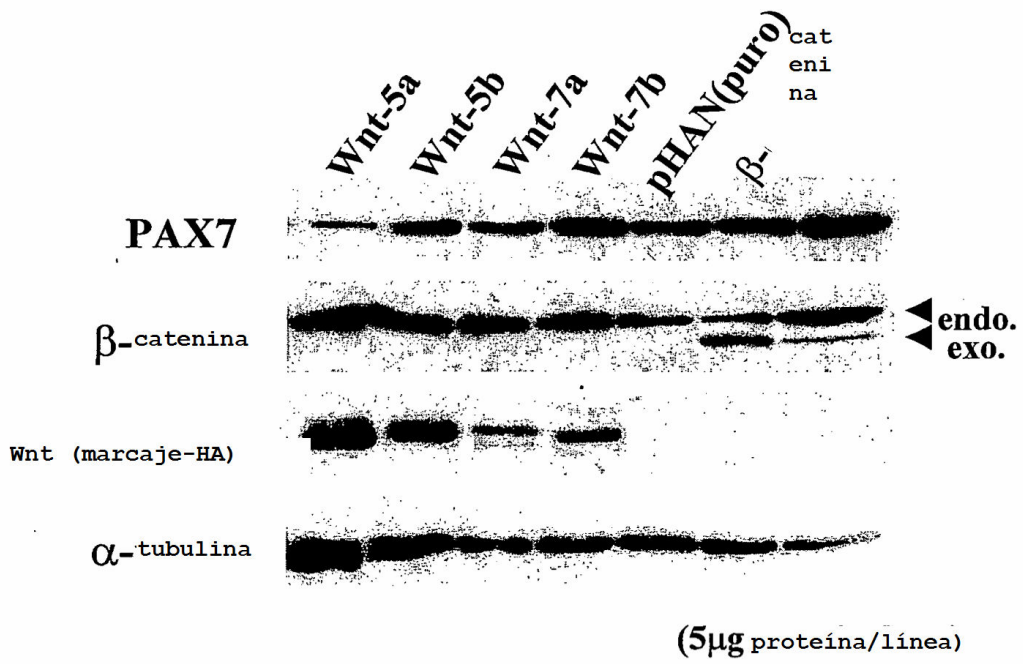


FIGURA 9