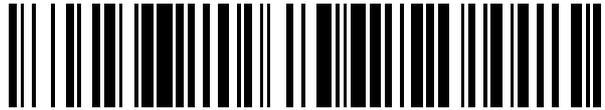


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 794**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 14/515 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2007 E 07819170 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 2081586**

54 Título: **R-espondinas como moduladores de angiogénesis y vasculogénesis**

30 Prioridad:

20.10.2006 EP 06022070

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

29.03.2016

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM,
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS
(100.0%)
IM NEUENHEIMER FELD 280
69120 HEIDELBERG, DE**

72 Inventor/es:

**NIEHRS, CHRISTOF;
KAZANSKAYA, OLGA y
OKAWARA, BISEI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 564 794 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

R-espondinas como moduladores de angiogénesis y vasculogénesis

5 1. INTRODUCCIÓN

La presente invención se refiere al uso de polipéptidos de R-espondina, en particular R-espondina-2 (Rspo2) o R-espondina-3 (Rspo3) o ácidos nucleicos de R-espondina. La presente invención está basada en la demostración de que Rspo2 y Rspo3 son promotores de la angiogénesis y en la identificación de Rspo2 y Rspo3 como reguladores positivos del factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV). Estos resultados indican un papel principal de las R-espondinas, en particular de Rspo2 y/o Rspo3 en el sistema de señalización durante la angiogénesis. La presente invención se refiere asimismo al uso de antagonistas de la R-espondina-3 en el tratamiento de enfermedades, incluyendo el cáncer, mediante la modulación de la angiogénesis y/o de la vasculogénesis.

15 2. ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCION

La familia de proteínas R-espondina se conserva en los vertebrados y consta de los cuatro miembros relacionados de R-espondina 1-4 (Rspo1-4) (Chen y otros, 2002, Mol. Biol. Rep. 29, 287-292, que denominaron hPWTSR a la Rspo3; Kamata y otros, 2004, Biochim. Biophys. Acta.1676, 51-62; Kazanskaya y otros, 2004, Dev. Cell 7, 525-534; Kim y otros, 2005, Science 309, 1256-1259; Kim y otros, 2006, Cell Cycle 5, 23-26; Nam y otros, 2006, J. Biol. Chem. 281, 13247-13257). Las Rspo1-4 humanas también se han descrito como polipéptidos análogos al factor de crecimiento de células madre, que son capaces de promover la proliferación de células madre hematopoyéticas (ver patentes WO 01/77169; WO 01/07611) o se pueden emplear en el tratamiento de varias enfermedades (ver patentes US 2006/0149049, US 2005/0059073) susceptibles de ser aliviadas por un aumento o reducción de la angiogénesis (véase patente US 2005/054829). También han sido designadas como futrina 1-4 e identificadas como moduladoras de la vía señalizadora Wnt (véase patente WO 2005/040418). El contenido de estos documentos se incorpora aquí como referencia y los aminoácidos y las secuencias nucleicas de las R-espondinas 1-4 aquí reveladas también se incluyen específicamente.

Los genes Rspo codifican proteínas secretadas que pueden activar la señalización de Wnt/b-catenina y la Rspo2 promueve la miogénesis a través de la vía señalizadora Wnt/b-catenina en *Xenopus* (Kazanskaya y otros, 2004, Dev. Cell 7, 525-534). Los genes de R-espondina se coexpresan ampliamente con genes Wnt en muchas regiones durante el desarrollo embrionario y la expresión de R-espondina es regulada positivamente por medio de señales Wnt (Kamata y otros, 2004, Biochim. Biophys. Acta.1676, 51-62; Kazanskaya y otros, 2004, Dev. Cell 7, 525-534). Además se ha referido que la Rspo1 humana secretada promueve la proliferación de epitelio intestinal al estabilizar la b-catenina (Kim y otros, 2005 Science 309, 1256-9). La mutación de Rspo3 murina produce letalidad embrionaria e induce graves defectos en el desarrollo de la placenta (Aoki y otros, Dev Biol. 2007 301(1):218-26). Sin embargo en este modelo mutante no se describió ningún efecto en el desarrollo de los vasos sanguíneos y, contrariamente a los resultados aquí revelados, los embriones no mostraron ningún signo de hemorragia; por lo tanto antes de la presente invención no se había planteado que la R-espondina, en particular la R-espondina 2 o 3, tuviera un papel importante en la angiogénesis y/o en la vasculogénesis.

La angiogénesis es regulada probablemente por factores de crecimiento polipeptídicos. Se ha identificado varios polipéptidos con actividad promotora del crecimiento de células endoteliales *in vitro*. Como ejemplo cabe mencionar el factor de crecimiento fibroblástico ácido y básico, el FCEV y el factor de crecimiento placentario.

El FCEV es un factor clave en la vasculogénesis y en la angiogénesis, y su vía señalizadora es una diana importante para la intervención farmacológica (Ferrara 2005, Oncology 3:11-6; Rosen 2005, Oncologist 10:382-91).

50 3. RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se refiere al uso de polipéptidos o ácidos nucleicos de R-espondina. La presente invención se basa en la demostración de que la Rspo3 y la Rspo2 son promotores de la vasculogénesis y de la angiogénesis. Además inducen el crecimiento de células endoteliales y se han identificado como reguladores positivos del FCEV.

Los resultados indican un papel importante de los polipéptidos de R-espondina, en particular de la Rspo2 y/o Rspo3, en el sistema de señalización durante la angiogénesis y/o la vasculogénesis.

Los polipéptidos de R-espondina (p.ej. Rspo2 o Rspo3), los ácidos nucleicos de R-espondina y los agonistas de R-espondina son adecuados para el tratamiento de enfermedades que implican la promoción de la angiogénesis y/o la vasculogénesis.

Los antagonistas de los polipéptidos de R-espondina (p.ej. Rspo2 o Rspo3) o los ácidos nucleicos de R-espondina sirven para el tratamiento de enfermedades que implican la inhibición de la angiogénesis y/o la vasculogénesis.

65

Aquí se revela el empleo de polipéptidos de R-espondina, de ácidos nucleicos de R-espondina y de reguladores, efectores o moduladores de R-espondina para aplicaciones diagnósticas, en particular para diagnosticar o controlar los procesos, enfermedades y trastornos relacionados con la angiogénesis y/o la vasculogénesis.

También se revelan células y animales no humanos transgénicos que presentan una expresión modificada, p.ej. aumentada o reducida, de la R-espondina, en particular de la Rspo2 y/o Rspo3.

Los polipéptidos de R-espondina y los ácidos nucleicos de R-espondina y las células o animales transgénicos se pueden usar en procedimientos de detección, a fin de identificar y/o caracterizar efectores de angiogénesis y/o de vasculogénesis.

4. DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

FIG. 1: la Rspo3 es necesaria para el desarrollo de las células de los vasos sanguíneos en *Xenopus tropicalis*. Se inyectaron del modo indicado embriones de *Xenopus tropicalis* en la fase de 4 células con oligonucleótidos antisentido morfolino (Mo) de control o de Rspo3. Los embriones se fijaron en la fase de brote de cola y se llevó a cabo la hibridación *in situ* para los marcadores de sangre (α -globina, SCL, Mead y otros, 1998, Development 125, 2611-2620) o para formar vasos sanguíneos (msr, Devic y otros, Mech Dev. 1996; 59,129-40). Obsérvese la expansión de los marcadores de sangre y la inhibición de msr en los embriones tratados con Mo para Rspo3.

FIG. 2: demostración de la especificidad de los oligonucleótidos antisentido morfolino para Rspo3. Se inyectaron del modo indicado embriones de *Xenopus tropicalis* en dos blastómeros ventrales en la fase de 4-8 células con oligonucleótidos antisentido morfolino (Mo) para Rspo3, con y sin ARNm de Rspo2 de *Xenopus laevis*. En la fase de gástrula (fase 10) se escindieron zonas marginales ventrales (ZMV) y se cultivaron hasta que los embriones hermanos alcanzaron la fase 28. Las ZMV se fijaron y se procesaron por hibridación *in situ* de embriones enteros para el marcador de sangre α -globina. Obsérvese la recuperación de la expansión de α -globina inducida por Rspo3 Mo mediante ARNm de Rspo2. Esta recuperación demuestra la especificidad del fenotipo morfolínico.

FIG. 3: la Rspo3 es necesaria y suficiente para promover el desarrollo celular de vasos sanguíneos en *Xenopus tropicalis*. Se inyectaron del modo indicado embriones de *Xenopus tropicalis* en la fase de 4 células con oligonucleótidos antisentido morfolino (Mo) de control o de Rspo3 o con sin ARNm de Rspo2 de *Xenopus laevis*. En la fase de gástrula se escindió la zona marginal ventral y se cultivó de forma aislada hasta la 28. Se realizó el análisis RT-PCR para los genes del marcador indicados. H4, histona 4 para la normalización. -RT, menos control con transcriptasa inversa. Obsérvese que la inhibición de la Rspo3 impide la expresión del marcador FCEV de vasos sanguíneos y la expresión de msr e induce los marcadores de sangre α -globina y SCL.

FIG. 4: expresión de la Rspo3 en el sistema vascular de embriones murinos. Se muestra la hibridación *in situ* de la Rspo3 en un embrión murino de E 10,5. Las puntas de flecha señalan la expresión en los vasos sanguíneos embrionarios.

FIG. 5: mutagénesis selectiva de Rspo3 murina. (A) Estructura genómica de la Rspo3 y vector direccional usado para la recombinación homóloga en células ES. (B) Alelo diana antes y (C) después de eliminar el gen marcador seleccionable de neomicina mediante Flp recombinasa.

FIG. 6: los ratones con Rspo3 mutada presentan sangrado interno. Fotografías de embriones murinos de tipo natural (tn) y con Rspo3 (mutantes) en E 10,5. Obsérvese las hemorragias en el ratón mutante, indicativas de la falta de formación de vasos sanguíneos.

FIG. 7: los ratones con Rspo3 mutada presentan poca formación de vasos sanguíneos. Se muestran los sacos vitelinos de embriones E 10,5 de tipo natural (tn) y con Rspo3 (mutantes). Obsérvese la palidez del saco vitelino en el mutante.

FIG. 8: los ratones con Rspo3 mutada pierden expresión de FCEV. Se muestra la hibridación *in situ* para FCEV de embriones enteros E 9,5 en placentas de tipo natural (tn) y con Rspo3 (mutantes).

FIG. 9: la Rspo2 induce angiogénesis en el ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (MCA).

FIG. 10: la Rspo2 induce la formación de tubos en las células endoteliales. Se aplicó un medio de control o un medio acondicionado con Rspo2 de *Xenopus laevis* a células endoteliales humanas (HDMEC) durante 5 días. Obsérvese la inducción de morfogénesis indicativa de la formación de tubos, que es característica durante la angiogénesis.

FIG. 11: la Rspo2 induce el crecimiento de las células endoteliales. Se aplicó un medio de control o un medio acondicionado con Rspo2 de *Xenopus laevis* o 0,5 ng/ml de FCEV a células endoteliales humanas (HUVEC) durante 2 días y se analizó la proliferación celular mediante un kit comercial (Roche).

5. DESCRIPCIÓN DE LA PRESENTE INVENCION

5.1 1 Definiciones

Tal como se usa aquí, el término "polipéptidos de R-espondina" según la presente invención se refiere a miembros de la familia de la R-espondina que pueden provenir de mamíferos u otros organismos vertebrados. La familia de proteínas R-espondina consta de los cuatro miembros citados, R-espondina 1-4 (Rspo1-4).

El polipéptido de R-espondina es preferiblemente una R-espondina humana, p.ej. R-espondina 1, 2, 3 o 4 humana. Con mayor preferencia el polipéptido de R-espondina es un polipéptido de R-espondina 2 o 3, en particular un polipéptido de R-espondina 2 o 3 humana. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de R-espondina 1, 2, 3 o 4 humana se muestran en la patente WO 2005/040418, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia. Otros

ejemplos de polipéptidos de R-espondina son las R-espondinas de *Xenopus*, p.ej. de *Xenopus tropicalis* y *Xenopus laevis* o de *Mus musculus*.

5 Otras secuencias de ácidos nucleicos de R-espondinas humanas y secuencias de aminoácidos son las siguientes:
 5 secuencia de ácidos nucleicos de R-espondina 1 humana (NM_001038633, SEQ ID NO: 16), secuencia de
 aminoácidos (ABA54597, SEQ ID NO: 17), secuencia de ácidos nucleicos de R-espondina 2 humana (NM_178565,
 SEQ ID NO: 18), secuencia de aminoácidos (NP_848660, SEQ ID NO: 19), secuencia de ácidos nucleicos de R-
 10 espondina 3 humana (NM_032784, SEQ ID NO: 20), secuencia de aminoácidos (NP_116173, SEQ ID NO: 21),
 secuencia de ácidos nucleicos de R-espondina 4 humana (NM_001029871, SEQ ID NO: 22), secuencia de
 aminoácidos (NP_001025042, SEQ ID NO: 23).

15 Los polipéptidos de R-espondina también se definen aquí como polipéptidos que presentan al menos un 40%,
 preferiblemente al menos un 60%, con mayor preferencia al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al
 menos un 98% o al menos un 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos del respectivo polipéptido de R-
 espondina humana a lo largo de toda su extensión (Kazanskaya y otros, 2004, Dev. Cell 7, 525-534). Además los
 polipéptidos de R-espondina según la presente invención se caracterizan preferiblemente por tener al menos una
 actividad biológica escogida entre

- 20 i inducción de angiogénesis en el ensayo MCA,
- ii inducción de formación de tubos en las células endoteliales,
- iii inducción del crecimiento de las células endoteliales, en particular del crecimiento de las células endoteliales
 humanas, y
- iv inducción de la expresión de FCEV.

25 El término “polipéptido” comprende proteínas de longitud completa, moléculas proteínicas, fragmentos de proteínas,
 proteínas de fusión, péptidos, oligopéptidos, variantes, derivados, análogos o equivalentes funcionales de ellos.

30 Tal como se usa aquí, el término “equivalente funcional de R-espondina” se refiere a una proteína inductora de la
 angiogénesis y/o de la expresión de FCEV. El propio producto génico puede contener delecciones, adiciones o
 sustituciones de restos de aminoácidos en la R-espondina, p.ej. en la secuencia de Rspo2 o Rpo3, que producen un
 cambio silencioso, manteniendo una capacidad importante de transducción de señales, y por tanto dan lugar a una
 R-espondina funcionalmente equivalente. Estas sustituciones de aminoácidos son factibles basándose en similitudes
 de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o en la naturaleza anfipática de los restos implicados. Por
 35 ejemplo, los aminoácidos de carga negativa incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico; los aminoácidos de
 carga positiva incluyen la lisina y la arginina; los aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados que tienen
 valores similares de hidrofilia incluyen los siguientes: leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina; asparagina,
 glutamina, serina, treonina, fenilalanina, tirosina.

40 Tal como se usa aquí, el término “ácido nucleico de R-espondina” se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que
 codifican miembros de la familia R-espondina y que pueden provenir de mamíferos u otros organismos vertebrados.
 El ácido nucleico de R-espondina codifica preferiblemente una R-espondina humana, p.ej. R-espondina 1, 2, 3 o 4
 humana. Con mayor preferencia el ácido nucleico de R-espondina codifica un polipéptido de R-espondina 2 o 3, en
 particular un polipéptido de R-espondina 2 o 3 humana. Las secuencias de ácidos nucleicos de R-espondina 1, 2, 3
 45 y 4 humana se muestran en la patente WO 2005/040418, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia. Otros
 ejemplos de ácidos nucleicos de R-espondina son los que codifican las R-espondinas de *Xenopus*, p.ej. de *Xenopus
 tropicalis* y *Xenopus laevis* o de *Mus musculus*.

Además los ácidos nucleicos de R-espondina se definen aquí como moléculas escogidas entre
 (a) moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de R-espondina, p.ej. de una R-espondina humana, en
 particular Rspo2 y/o Rspo3,
 50 (b) moléculas de ácido nucleico que se hibridan bajo condiciones rigurosas con una molécula de ácido nucleico de
 (a) y/o con una molécula de ácido nucleico que es complementaria de ellas,
 (c) moléculas de ácido nucleico que codifican el mismo polipéptido como una molécula de ácido nucleico de (a) y/o
 (b), y
 (d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido idéntico en al menos un 40%, preferiblemente en al
 55 menos un 60%, con mayor preferencia en al menos un 80% y sobre todo en al menos un 90% a un polipéptido
 codificado por una molécula de ácido nucleico de (a) a lo largo de toda su extensión.

Las moléculas de ácido nucleico pueden ser p.ej. moléculas de ADN o moléculas de ARN.

60 Tal como se usan aquí, los términos “reguladores”, “efectores” o “moduladores” de polipéptidos o ácidos nucleicos
 de R-espondina son intercambiables y cualquiera de ellos se puede emplear para referirse a anticuerpos, péptidos,
 moléculas inorgánicas u orgánicas de bajo peso molecular y a otras fuentes de materiales activos con potencial
 biológico capaces de modular polipéptidos de R-espondina, p.ej. Rspo2 y/o Rspo3 para la transducción de señales,
 o capaces de modular la actividad de los polipéptidos de R-espondina, o capaces de modular la expresión de R-
 65 espondina para promover (agonistas) o inhibir (antagonistas) la angiogénesis y/o de vasculogénesis. Los citados
 reguladores, efectores o moduladores pueden ser de origen natural o producidos sintéticamente.

- 5 Tal como se usa aquí, el término “compuesto capaz de unirse a R-espondina” se refiere a un regulador, efector o modulador de R-espondina, de origen natural o producido sintéticamente, que interactúa con un polipéptido de R-espondina. Como ejemplos de tales compuestos cabe mencionar (i) una pareja natural, p.ej. un receptor de una R-espondina; (ii) una molécula de procedencia natural que forma parte del complejo de señalización y/o una molécula señalizadora de origen natural producida por otros tipos de células; (iii) un anticuerpo de origen natural o producido sintéticamente. El término “compuesto” se usa aquí en el contexto de un “compuesto de ensayo” o de un “compuesto propuesto como fármaco”.
- 10 Tal como se usa aquí, el término “agonista de R-espondina” se refiere a reguladores, efectores o moduladores de R-espondina que activan la respuesta intracelular de la R-espondina y por lo tanto promueven la angiogénesis y/o vasculogénesis.
- 15 Tal como se usa aquí, el término “antagonista de R-espondina” se refiere a reguladores, efectores o moduladores de polipéptidos de R-espondina o de ácidos nucleicos de R-espondina que inhiben, reducen o impiden la respuesta intracelular de los polipéptidos de R-espondina o de los ácidos nucleicos de R-espondina y por lo tanto inhiben, reducen o impiden la angiogénesis y/o vasculogénesis.
- 20 Como ejemplos de antagonistas adecuados cabe citar las formas mutadas de R-espondina que tienen un efecto negativo dominante, polipéptidos que se unen a la R-espondina, p.ej. anticuerpos anti-R-espondina, incluyendo los anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpo que contienen al menos un sitio de unión a la R-espondina. Ejemplos adicionales de antagonistas de R-espondina son los ácidos nucleicos capaces de inhibir la traducción, transcripción, expresión y/o actividad de R-espondina, p.ej. aptámeros, moléculas antisentido, ribozimas o moléculas de ácido nucleico capaces de interferencia por ARN tales como las moléculas de ARNip, incluyendo análogos de
- 25 ácido nucleico como los ácidos nucleicos peptídicos o los ácidos nucleicos morfolínicos. Estos ácidos nucleicos se pueden unir a los ácidos nucleicos de R-espondina o bien interferir con ellos.
- 30 Tal como se usa aquí, el término “anticuerpo” o “anticuerpos” incluye, sin exclusividad, anticuerpos recombinantes policlonales, monoclonales, quiméricos o humanizados, o anticuerpos de cadena simple o fragmentos de ellos, incluyendo fragmentos Fab, fragmentos de cadena simple y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab. Los anticuerpos neutralizadores, es decir, aquellos que compiten por el sitio de unión para FCEV de una R-espondina se prefieren especialmente para fines diagnósticos y terapéuticos.
- 35 Tal como se usa aquí, el término “vasculogénesis” se refiere a la formación y difusión de vasos sanguíneos.
- Tal como se usa aquí, el término “angiogénesis” se refiere a un proceso que implica la vascularización de un tejido, en particular la proliferación, migración e infiltración de células endoteliales vasculares y el crecimiento y desarrollo de nuevos vasos sanguíneos capilares.
- 40 Tal como se usa aquí, el término “tratar” o “tratamiento” se refiere a una intervención realizada con la intención de impedir el desarrollo de la patología o alterarla y por tanto aliviar un trastorno, enfermedad o afección, incluyendo uno o más síntomas de tal trastorno o enfermedad. Por lo tanto “tratar” se refiere tanto al procedimiento profiláctico como a las medidas preventivas. Los necesitados de tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos en los cuales hay que prevenirlo. Tal como se usa aquí, el término afín “tratamiento” se refiere al acto de tratar un trastorno, síntoma, enfermedad o afección, del modo arriba definido para el término “tratar”.
- 45 Tal como se emplea aquí, la frase “enfermedades cuyo tratamiento implica la inhibición de la angiogénesis y/o de la vasculogénesis” incluye específicamente (sin limitación) estados tales como el crecimiento tumoral, p.ej. el crecimiento de tumores sólidos y la actividad metastásica, la aterosclerosis, la estenosis, la restenosis, la retinopatía, la degeneración macular, la psoriasis y la artritis reumatoide.
- 50 Tal como se emplea aquí, la frase “enfermedades cuyo tratamiento implica la promoción de la angiogénesis y/o de la vasculogénesis” incluye específicamente (sin limitación) estados tales como la curación de heridas, la regeneración o desarrollo de tejidos y órganos, los procesos degenerativos vasculares (p.ej. isquemia crítica de las extremidades o isquemia cerebral, enfermedad cardíaca isquémica), el desarrollo embrionario y los procesos reproductivos, p.ej. procesos de reproducción femeninos como el desarrollo del folículo en el cuerpo lúteo durante la ovulación y el crecimiento de la placenta durante el embarazo.
- 55 Tal como se usa aquí, el término “tumor” se refiere a un crecimiento nuevo maligno que surge del epitelio y se halla en la piel o, más comúnmente, en el revestimiento de órganos corporales como por ejemplo la mama, la próstata, el pulmón, el riñón, el páncreas, el estómago o el intestino. Un tumor también se puede infiltrar en el tejido adyacente y propagarse a órganos distantes (metástasis), por ejemplo a los huesos, al hígado, al pulmón o al cerebro. Tal como se emplea aquí, el término tumor comprende tipos de células tumorales primarias y metastásicas, incluyendo sin limitación melanomas, linfomas, leucemias, fibrosarcomas, rabdomiomas, rabdomiomas y mastocitomas, y tipos de carcinomas tisular tales como – sin limitarse a ellos – el cáncer colorrectal, el cáncer de próstata, el cáncer pulmonar de células pequeñas y el cáncer pulmonar de células no pequeñas, el cáncer de mama, el cáncer de páncreas, el cáncer de
- 60
- 65

vesicular biliar, el cáncer renal, el cáncer de estómago, el glioblastoma, el cáncer de hígado primario y los cánceres ováricos.

5.2 Descripción detallada de la presente invención

5 La presente invención está definida por la serie adjunta de reivindicaciones.

10 La angiogénesis es necesaria para varios procesos fisiológicos tales como la curación de heridas, la regeneración de tejidos y órganos, el desarrollo embrionario y procesos reproductivos tales como el desarrollo del folículo en el cuerpo lúteo durante la ovulación y la formación de la placenta durante el embarazo. La proliferación anormal de vasos sanguíneos es una manifestación importante de una serie de enfermedades tales como artritis reumatoide, retinopatías y psoriasis, a las cuales (y a sus estados relacionados) se hace referencia aquí como "enfermedades cuyo tratamiento implica la inhibición de la angiogénesis y/o de la vasculogénesis". La angiogénesis también es un factor importante para el crecimiento y la actividad metastásica de los tumores sólidos, los cuales dependen de la vascularización. Por consiguiente los inhibidores de la angiogénesis se pueden utilizar terapéuticamente para tratar las enfermedades resultantes o acompañadas de un crecimiento anormal de vasos sanguíneos y para tratar las formaciones malignas que conllevan el crecimiento y la propagación de tumores sólidos.

20 La presente invención se refiere al uso de polipéptidos de R-espondina o de ácidos nucleicos de R-espondina.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de un polipéptido de R-espondina o de un ácido nucleico de R-espondina para elaborar un medicamento promotor de angiogénesis y/o de vasculogénesis.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de un antagonista de R-espondina para elaborar un medicamento inhibidor de angiogénesis y/o de vasculogénesis.

30 Aquí se revelan métodos y reactivos para diagnosticar o controlar procesos, enfermedades o trastornos relacionados con la angiogénesis y/o la vasculogénesis, que consisten en determinar la cantidad, la actividad y/o la expresión de un polipéptido de R-espondina o de un ácido nucleico de R-espondina en una muestra. En el método aquí revelado la cantidad, la actividad y/o la expresión de un polipéptido de R-espondina o de un ácido nucleico de R-espondina en dicha muestra se compara además con la cantidad, la actividad y/o la expresión de un polipéptido de R-espondina o de un ácido nucleico de R-espondina en una muestra de control. También se revelan células recombinantes y animales no humanos transgénicos que presentan una expresión del polipéptido de R-espondina modificada, es decir aumentada o disminuida.

35 Se revela el empleo de polipéptidos de R-espondina y de ácidos nucleicos de R-espondina para evaluar y examinar la capacidad de los compuestos de modular, p.ej. de estimular o inhibir, los procesos, enfermedades o trastornos relacionados con la angiogénesis y/o la vasculogénesis. Estos reguladores de las R-espondinas se pueden usar con fines terapéuticos. Por ejemplo, los agonistas de las R-espondinas, p.ej. de Rspo2 y/o Rspo3, se pueden emplear en procesos tales como la curación de heridas; en cambio los antagonistas de Rspo3 se pueden usar en el tratamiento de tumores que dependen de la vascularización para crecer.

40 En parte la presente invención se basa en resultados de hibridación *in situ* que indican que la Rspo3 se expresa en la vasculatura embrionaria. La presente invención también se basa en el hallazgo de que la expresión de la Rspo3 promueve la diferenciación, proliferación y morfogénesis de las células endoteliales, mientras que la inhibición por moléculas antisentido en embriones de *Xenopus* o la mutagénesis selectiva en ratones modificados genéticamente interfiere en la angiogénesis. La presente invención se basa además en el hallazgo de que la Rspo3 es un regulador positivo, lo cual es necesario y suficiente para la expresión del factor angiogénico clave FCEV.

45 Por consiguiente la inhibición de las moléculas de R-espondina puede ser útil para tratar enfermedades resultantes de la proliferación anormal de vasos sanguíneos mediada por R-espondina, p.ej. por Rspo2 y/o Rspo3, y/o FCEV, en particular para un tratamiento de enfermedades que consiste en inhibir la angiogénesis y/o la vasculogénesis. La presente invención se refiere a polipéptidos de R-espondina o ácidos nucleicos de R-espondina.

50 Según la presente invención, un polipéptido de R-espondina o de un ácido nucleico de R-espondina se puede usar para promover la angiogénesis y/o la vasculogénesis, en particular para elaborar un medicamento promotor de la angiogénesis y/o la vasculogénesis.

55 Esta forma de ejecución comprende la prevención o el tratamiento de una enfermedad, consistente en promover la angiogénesis y/o la vasculogénesis.

60 Los polipéptidos de R-espondina o los ácidos nucleicos de R-espondina se pueden usar en medicina humana o veterinaria, bien solos o en combinación con otro medicamento, p.ej. otro fármaco promotor de angiogénesis y/o vasculogénesis tal como FCF, FCEV, FCDF, FNT o L-lisina.

65

Se revela un método para promover la angiogénesis en una célula o en un organismo, que consiste en aumentar el nivel, la actividad y/o la expresión de un polipéptido de R-espondina. Este método se puede practicar *in vitro* o *in vivo*, p.ej. para aplicaciones terapéuticas.

5 También se revela un método para promover la angiogénesis que consiste en administrar a un sujeto que lo necesite una dosis terapéuticamente efectiva de un polipéptido de R-espondina o de un ácido nucleico de R-espondina, siendo dicho sujeto preferiblemente humano.

10 Una forma de ejecución diferente de la presente invención se refiere al uso de un antagonista de R-espondina para elaborar un medicamento inhibidor de la angiogénesis y/o de la vasculogénesis. El antagonista de R-espondina es preferiblemente un antagonista de R-espondina-2 y/o de R-espondina-3.

15 Esta forma de ejecución de la presente invención incluye la prevención o el tratamiento de una enfermedad, que consiste en inhibir la angiogénesis y/o la vasculogénesis.

20 En una forma de ejecución preferida el antagonista de R-espondina puede usarse en medicina humana o veterinaria, solo o en combinación con otro medicamento. Por ejemplo, el tratamiento de los tumores puede consistir en el uso combinado de un antagonista de R-espondina y un agente antitumoral, como p.ej. un agente quimioterapéutico o un anticuerpo antitumoral, p.ej. Bevacizumab, Endostatina, Talidomida, Combrestatina A4, un anticuerpo anti-FCEV, SU 5416 o SU 6668.

25 Las moléculas de ácido nucleico son preferiblemente moléculas de ADN recombinante que dirigen la expresión recombinante de los polipéptidos de R-espondina en células huésped apropiadas. Alternativamente también pueden usarse secuencias de nucleótidos que se hibriden con porciones de una secuencia codificadora de R-espondina en ensayos de amplificación y/o hibridación de ácidos nucleicos, p.ej. PCR, análisis Southern y Northern blot, etc.

30 Debido a la degeneración inherente del código genético, en la práctica de la presente invención se pueden usar moléculas de ácido nucleico que codifican sustancialmente el mismo polipéptido o un polipéptido funcionalmente equivalente para la clonación y expresión de una proteína de R-espondina, p.ej. de Rspo2 o 3. Estas secuencias de ADN incluyen aquellas que son capaces de hibridarse con las secuencias de R-espondina de *Xenopus*, murina y/o humana en condiciones estrictas. Hibridación en condiciones estrictas significa preferiblemente que se observa una señal de hibridación positiva después de lavar durante 1 h con 1 x tampón SSC y SDS al 0,1%, preferiblemente a 55°C, con mayor preferencia a 62°C y sobre todo a 68°C, en particular durante 1 h en 0,2 x tampón SSC y SDS al 0,1%, a 50°C, preferiblemente a 55°C, con mayor preferencia a 62°C y sobre todo a 68°C.

35 Las moléculas de ácido nucleico según la presente invención se pueden diseñar con el fin de alterar la secuencia codificadora de R-espondina para varios fines, incluyendo, sin limitarse a ellas, las alteraciones que modifican el procesamiento y/o la expresión del producto génico. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones mediante el uso de técnicas bien conocidas del estado técnico, como p.ej. mutagénesis sitio-dirigida, para insertar nuevos sitios de restricción, alterar patrones de glicosilación, fosforilación, etc. Por ejemplo, en ciertos sistemas de expresión como en las levaduras las células huésped pueden sobreglicosilar el producto genético. Cuando se usan estos sistemas de expresión puede ser preferible alterar la secuencia codificadora de Rspo2 o 3 para eliminar cualquier sitio de glicosilación unido a N.

40 En otro aspecto, la secuencia de ácido nucleico de R-espondina se puede ligar a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, para cribar bibliotecas de péptidos puede ser útil codificar una proteína quimérica de R-espondina que exprese un epitopo heterólogo capaz de ser reconocido por un anticuerpo disponible comercialmente. También se puede diseñar una proteína de fusión que contenga un sitio de corte situado entre la secuencia de R-espondina y la secuencia de proteína heteróloga, a fin de que la porción de R-espondina se pueda separar de la porción heteróloga.

45 Según un aspecto alternativo, la secuencia codificadora de ácido nucleico se puede sintetizar total o parcialmente empleando métodos químicos bien conocidos del estado técnico. Véase por ejemplo Caruthers, y otros, 1980, Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 7: 215-233; Crea and Horn, 1980, Nuc. Acids Res. 9(10): 2331; Matteucci and Caruthers, 1980, Tetrahedron Letters 21: 719; y Chow and Kempe, 1981, Nuc. Acids Res. 9(12): 2807-2817. Como alternativa, la propia proteína se puede producir empleando métodos químicos para sintetizar total o parcialmente la secuencia de aminoácidos de la R-espondina. Por ejemplo, los péptidos se pueden sintetizar mediante técnicas de fase sólida, separarlos de la resina y purificarlos por cromatografía líquida preparativa de alta resolución (p.ej. véase Creighton, 1983, Proteins Structures And Molecular Principles, W. H. Freeman and Co., N.Y. pp. 50-60). La composición de los péptidos sintéticos se puede confirmar por análisis o secuenciación de aminoácidos (p.ej. según el procedimiento de degradación de Edman; véase Creighton, 1983, Proteins, Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman and Co., N.Y., pp. 34-49).

60 Para expresar un polipéptido de R-espondina biológicamente activo, la secuencia nucleótida que codifica dicho polipéptido se inserta en un vector de expresión adecuado, es decir un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificadora insertada. Los productos génicos de Rspo, así como

las células huésped o las líneas celulares transfectadas o transformadas con vectores de expresión recombinante se pueden usar para varios fines, incluyendo, sin limitarse a ellos, la generación de anticuerpos (es decir monoclonales o policlonales) que se unen a la R-espondina, como los que “neutralizan” la actividad de la R-espondina.

5 Se pueden usar métodos bien conocidos de los especialistas en la materia para construir vectores de expresión que contengan la secuencia codificadora de R-espondina y señales de control de transcripción/traducción apropiadas. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y de recombinación *in vivo* / recombinación genética. Véanse por ejemplo las técnicas descritas en Maniatis y otros, 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. y Ausubel y otros, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.

15 Para expresar la secuencia codificadora de R-espondina se pueden usar varios sistemas de vectores de expresión en huésped, incluyendo, sin limitarse a ellos, microorganismos como bacterias transformadas con ADN bacteriófago recombinante, con vectores de expresión de ADN plásmido o ADN cósmido que llevan la secuencia codificadora de R-espondina; células de levadura transformadas con vectores de expresión de levadura recombinante que llevan la secuencia codificadora de R-espondina; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p.ej. báculo virus) que contienen la secuencia de codificación de Rspo2 o 3; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p.ej. virus del mosaico de la coliflor, VMCF; virus del mosaico del tabaco, VMT) o transformadas con vectores de expresión plásmidos recombinantes (p.ej. plásmido Ti) que contienen la secuencia de codificación de R-espondina; o sistemas de células animales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p.ej. adenovirus, virus vacuna), incluyendo líneas celulares creadas por ingeniería genética para contener copias múltiples del ADN de R-espondina amplificadas de forma estable (CHO/dhfr) o inestable en cromosomas doble minuto (p.ej. líneas celulares murinas).

25 En otro aspecto, los polipéptidos de R-espondina, p.ej. Rspo2 y/o Rspo3, y los ácidos nucleicos de R-espondina que expresan una R-espondina se pueden usar para cribar reguladores, efectores o moduladores de R-espondina que actúan como agonistas o antagonistas la angiogénesis o de la vasculogénesis. Por ejemplo, los anticuerpos capaces de neutralizar la actividad de R-espondina, p.ej. de Rspo3, en un ensayo de proliferación endotelial, en un ensayo MCA de pollo y/o en un ensayo de diferenciación de ZMV de *Xenopus* se pueden utilizar para inhibir la función de la R-espondina. Asimismo, los anticuerpos anti-Rspo3 que imitan la actividad del FCEV se pueden seleccionar para aplicaciones proangiogénicas, p.ej. en la curación de heridas. Como alternativa, el cribado de bibliotecas de péptidos o compuestos orgánicos con polipéptidos solubles de R-espondina expresados de forma recombinante, o con líneas celulares o animales transgénicos no humanos que expresan un polipéptido de R-espondina, puede ser útil para identificar moléculas terapéuticas que funcionan modulando, p.ej. inhibiendo, la actividad biológica de R-espondina y que por lo tanto sirven como reguladores, efectores o moduladores de la angiogénesis y/o de la vasculogénesis o como reguladores, efectores o moduladores de R-espondina, p.ej. como antagonistas de R-espondina.

40 En otro aspecto, las líneas celulares creadas por ingeniería genética y/o los animales transgénicos no humanos que muestran una expresión modificada de R-espondina, p.ej. una expresión de R-espondina aumentada o disminuida en comparación con las líneas celulares o los animales de tipo natural, se pueden usar para cribar e identificar tanto antagonistas como agonistas. Los compuestos sintéticos, productos naturales y otras fuentes de materiales activos con potencial biológico se pueden cribar de varias maneras para identificar reguladores, efectores o moduladores de R-espondina. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir la actividad de un polipéptido de R-espondina se puede medir por medio de un ensayo de proliferación endotelial, un ensayo MCA de pollo y/o un ensayo de diferenciación de ZMV de *Xenopus* como los descritos en los ejemplos.

50 Las moléculas capaces de unirse a un polipéptido de R-espondina se pueden identificar detectando un compuesto, p.ej. una biblioteca de péptidos con un polipéptido soluble recombinante de R-espondina. Para identificar y aislar un compuesto que interactúa y forma un complejo con R-espondina es preferible marcar o “etiquetar” el polipéptido de R-espondina. El polipéptido de R-espondina se puede conjugar con grupos marcadores, p.ej. enzimas tales como la fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante o con otros reactivos tales como los marcadores fluorescentes, incluyendo el isotiocianato de fluoresceína (ITCF), la ficoeritrina (FE) o la rodamina. La conjugación de cualquier marcador determinado con R-espondina se puede realizar empleando técnicas rutinarias del estado técnico. Existe un polipéptido que contiene un epítipo para el cual hay un anticuerpo comercialmente disponible. El anticuerpo específico del epítipo se puede marcar mediante métodos bien conocidos del estado técnico, incluyendo el marcaje con enzimas, colorantes fluorescentes o perlas magnéticas.

60 El conjugado del polipéptido de R-espondina “etiquetado” se puede incubar con una biblioteca de compuestos inmovilizados en condiciones adecuadas, p.ej. durante 30 minutos hasta una hora a 22°C, para permitir la formación de un complejo entre el polipéptido de R-espondina y un compuesto individual de la biblioteca. Después se lava la biblioteca para eliminar cualquier polipéptido de R-espondina no fijado. Si la R-espondina ha sido conjugada con fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, la biblioteca completa se puede verter en una placa de petri que contenga un substrato adecuado, tanto para la fosfatasa alcalina como para la peroxidasa, por ejemplo 5-bromo-4-cloro-3-indoíl fosfato (BCIF) o 3,3',4,4"-diaminobencidina (DAB), respectivamente. Tras incubar varios minutos, el complejo compuesto/fase sólida-R-espondina cambia de color y se puede identificar con facilidad y aislar físicamente con un micromanipulador bajo un microscopio de disección. Si se ha utilizado una molécula de R-espondina con

marcaje fluorescente, los complejos se pueden aislar mediante clasificación activada por fluorescencia. Si se ha utilizado un polipéptido quimérico de R-espondina que exprese un epítipo heterólogo, el complejo compuesto/R-espondina se puede detectar con un anticuerpo marcado específico del epítipo. Una vez aislado, la identidad del compuesto unido al soporte de fase sólida se puede determinar p.ej. mediante secuenciación peptídica.

5 Las líneas celulares o los animales transgénicos no humanos que expresan R-espondina, p.ej. R-espondina-3, se pueden emplear para cribar reguladores, efectores o moduladores de R-espondina de varias maneras.

10 La capacidad de un regulador, efector o modulador de R-espondina para interferir en la actividad de la R-espondina y/o en la señal de transducción de R-espondina se puede medir mediante un ensayo de proliferación endotelial, un ensayo MCA de pollo y/o un ensayo de diferenciación de ZMV de *Xenopus*. Otras respuestas, como la activación o supresión de la actividad catalítica, la fosforilación o desfosforilación de otras proteínas, la activación o modulación de la producción de segundos mensajeros, los cambios en los niveles celulares de iones, la asociación, disociación o translocación de moléculas señalizadoras, o la transcripción o traducción de genes específicos, también se puede controlar. Estos ensayos se pueden realizar empleando técnicas convencionales desarrolladas para dichos fines, en el curso del cribado.

20 La unión del ligando a su receptor celular a través de las vías de transducción de señales puede afectar a varios procesos celulares. Los procesos celulares bajo el control de la vía señalizadora de R-espondina pueden incluir, sin limitarse a ellos, las funciones celulares normales, la proliferación y la diferenciación celular, la conservación de la forma y adhesión celular, además de procesos anormales o potencialmente deletéreos, tales como la proliferación celular incontrolada, la pérdida de la inhibición por contacto, el bloqueo de la diferenciación o la muerte celular. La observación cualitativa o cuantitativa y la medición de cualquiera de los procesos celulares descritos por técnicas conocidas de la especialidad se pueden utilizar ventajosamente como medio de valoración de la transducción de señales en el curso del cribado.

25 Se describen varias formas de ejecución para el cribado, identificación y evaluación de compuestos que interactúan con R-espondina, los cuales pueden afectar a varios procesos celulares bajo el control de la vía señalizadora de R-espondina.

30 Se revela un método para identificar un regulador, efector o modulador de R-espondina, que consiste en:

(a) poner en contacto el supuesto regulador, efector o modulador de R-espondina con un polipéptido de R-espondina, en forma pura o semipura, o en una célula totalmente viva o fijada o en un animal transgénico no humano;

35 (b) medir el efecto del supuesto regulador, efector o modulador de R-espondina en el polipéptido de R-espondina, en la actividad de la R-espondina y/o en una propiedad fenotípica de la célula o del organismo mediado por la R-espondina;

40 (c) comparar el efecto medido con el obtenido sin el supuesto regulador, efector o modulador de R-espondina, determinando si el supuesto regulador, efector o modulador de R-espondina estimula o inhibe la respuesta celular de la R-espondina.

45 Las R-espondinas, como p.ej. Rspo3, que sirven para identificar un regulador, efector o modulador de R-espondina pueden ser equivalentes funcionalmente a la R-espondina. Un equivalente funcional de R-espondina se puede preparar partiendo de una R-espondina, de procedencia natural o expresada por recombinación, mediante división proteolítica seguida de procedimientos convencionales de purificación conocidos de los especialistas en la materia. Alternativamente, el derivado funcional se puede producir por tecnología de ADN recombinante, expresando las partes de R-espondina que incluyen el dominio funcional en células adecuadas. Los derivados funcionales también se pueden sintetizar químicamente. Las células que expresan Rspo3 se pueden usar como fuentes de R-espondina, cruda o purificada, para analizarlas en estos ensayos. Como alternativa, en estos ensayos se pueden emplear directamente células totalmente vivas o fijadas.

50 La actividad transductora de señales de R-espondina se puede medir llevando a cabo un ensayo de proliferación endotelial, un ensayo MCA de pollo y/o un ensayo de diferenciación de ZMV de *Xenopus* y/o siguiendo los procesos celulares controlados por la señal.

55 También se revela un método que permite identificar una molécula capaz de unirse a un polipéptido de R-espondina, el cual consiste en:

(a) inmovilizar un polipéptido de R-espondina o un equivalente funcional de la misma en una matriz de fase sólida;

60 (b) poner en contacto la molécula con la matriz de fase sólida producida en la etapa (a), durante un tiempo suficiente para permitir la unión de la molécula;

(c) eliminar de la matriz de fase sólida por lavado cualquier material no unido a ella;

(d) detectar la presencia de la molécula unida a la fase sólida.

65 El método anterior puede incluir la etapa adicional de:

(e) eluir la molécula unida de la matriz de fase sólida, para aislarla.

El método anterior puede incluir la etapa adicional de:

5 (f) identificar la molécula eluida.

Para producir anticuerpos destinados a los epítomos de un polipéptido de R-espondina, como p.ej. Rpo2 o Rspo3, se pueden usar varios procedimientos conocidos del estado técnico.

10 Los anticuerpos monoclonales que se unen a un polipéptido de R-espondina se pueden marcar radiactivamente para poder seguir su localización y distribución en el cuerpo después de la inyección. Los anticuerpos marcados con radiactividad se pueden utilizar como herramienta de diagnóstico no invasiva para obtener imágenes de la nueva vascularización relacionada con enfermedades cuyo tratamiento implica la inhibición de la angiogénesis y/o de la vasculogénesis.

15 Asimismo se pueden diseñar inmunotoxinas que dirijan agentes citotóxicos a sitios específicos del cuerpo. Por ejemplo, se pueden complejar covalentemente anticuerpos monoclonales muy afines, específicos de R-espondina, a toxinas bacterianas o vegetales tales como la toxina diftérica, la abrina o la ricina. Un método general de preparación de moléculas híbridas de anticuerpos puede implicar el uso de reactivos reticulantes de tiol tales como el SPDP, que atacan los grupos amino primarios del anticuerpo y por intercambio de disulfuro unen la toxina al anticuerpo. Los anticuerpos híbridos se pueden emplear para eliminar específicamente las células endoteliales que expresan de R-espondina.

20 Para producir los se pueden inmunizar por inyección del polipéptido de R-espondina varios animales huésped, incluyendo, sin limitarse a ellos, conejos, ratones, ratas, etc. Para aumentar la respuesta inmunológica se pueden usar varios adyuvantes en función de la especie huésped, incluyendo, sin limitarse a ellos, el adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales como el hidróxido de aluminio, sustancias surfactantes tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

25 Los anticuerpos monoclonales para R-espondina se pueden preparar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por cultivo continuo de líneas celulares, incluyendo, sin limitarse a ellas, la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein, (*Nature*, 1975, 256: 495-497), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kosbor y otros, 1983, *Immunology Today*, 4: 72; Cote y otros, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80: 2026-2030) y la técnica del hibridoma de EBV (Cole y otros, 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Además se pueden utilizar técnicas desarrolladas para producir "anticuerpos quiméricos" (Morrison y otros, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 6851-6855; Neuberger y otros, 1984, *Nature*, 312: 604-608; Takeda y otros, 1985, *Nature*, 314: 452-454) cortando y empalmado genes de una molécula de anticuerpo de ratón, adecuadamente específico del antígeno, con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena simple (véase la patente U.S. n.º. 4,946,778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena simple específicos de R-espondina.

30 Los fragmentos de anticuerpo que contienen sitios de unión específicos para Rspo3 se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, estos fragmentos incluyen, sin limitarse a ellos: los fragmentos $F(ab')_2$ que pueden producirse por digestión de la molécula de anticuerpo con pepsina y los fragmentos Fab que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Como alternativa se pueden construir bibliotecas de expresión Fab (Huse y otros, 1989, *Science*, 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y fácil de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para la R-espondina.

35 Los anticuerpos de los polipéptidos de R-espondina pueden ser antagonistas de la actividad de la R-espondina al evitar que ésta se una a su pareja usual en la cascada de señalización de Wnt. Por tanto los anticuerpos que se unen específicamente a la R-espondina, en particular a Rspo2 o Rspo3, pueden ser antagonistas de R-espondina útiles para inhibir la angiogénesis y/o de la vasculogénesis.

40 Además, las formas mutadas de R-espondina que tienen un efecto negativo dominante se pueden expresar en poblaciones de células diana para inhibir la actividad de la Rspo3 de tipo natural expresada endógenamente.

45 En el ámbito de la presente invención se incluyen ácidos nucleicos antagonistas de R-espondina. Las moléculas de ARN y ADN antisentido actúan para bloquear directamente la traducción de ARNm uniéndose al ARNm diana y evitando la traducción proteica. En cuanto al ADN antisentido se prefieren los oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, p.ej. entre las regiones -10 y +10 de la secuencia nucleótida de R-espondina.

50 Los ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar la división específica del ARN. El mecanismo de acción de los ribozimas implica la hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima con el ARN diana complementario, seguida de una escisión endonucleolítica. En el ámbito de la presente invención se diseñan

moléculas de ribozima con motivo de cabeza de martillo, que catalizan específica y eficientemente la división de secuencias de ARN de Rspo3.

5 En cualquier ARN diana potencial los sitios específicos de división mediante ribozimas se identifican inicialmente escaneando la molécula diana para ver sitios de escisión por ribozima que incluyan las siguientes secuencias: GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, en las secuencias cortas de ARN de 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que lleva el sitio de escisión se pueden evaluar características estructurales pronosticadas, tales como la estructura secundaria, que pueden hacer inadecuada la secuencia oligonucleótida. La idoneidad de las posibles dianas también se puede evaluar experimentando su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios en ensayos de protección de ribonucleasa.

15 Las moléculas de ARNi son moléculas de ARN monocatenario o análogas de las mismas capaces de mediar en la interferencia por ARN de una molécula diana de ARNm, p.ej. moléculas de ARNip que son moléculas cortas de ARN bicatenario con una longitud preferible de 19-25 nucleótidos y opcionalmente al menos un extremo 3' protuberante, o precursores de las mismas o moléculas de ADN que las codifican. Las moléculas de ARN y ADN antisentido, los ribozimas y las moléculas de ARNi de la presente invención se pueden preparar por cualquier método conocido del estado técnico para sintetizar moléculas de ARN, incluyendo técnicas bien conocidas del sector para sintetizar oligodesoxirribonucleótidos como por ejemplo la síntesis química por el método de la fosforamidita en fase sólida. Como alternativa las moléculas de ARN se pueden generar por transcripción *in vitro* e *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN antisentido. Estas secuencias de ADN se pueden incorporar a una amplia variedad de vectores que llevan promotores adecuados de ARN polimerasa tales como los promotores de T7 o SP6 polimerasa. Como alternativa se pueden introducir de forma estable en líneas celulares constructos de ADNc antisentido que sintetizan ARN antisentido de manera constitutiva o inducible, dependiendo del promotor empleado.

25 En las moléculas de ADN se pueden introducir varias modificaciones como medio de incrementar la estabilidad intracelular y la vida media. Las posibles modificaciones incluyen, sin limitarse a ellas, la adición de secuencias flanqueantes de derivados de morfolino, así como ribo- o desoxi-nucleótidos, a los extremos 5' y/o 3' de la molécula o el uso de enlaces fósforotioato o 2' O-metilo en vez de enlaces fosfodiesterasa en el esqueleto del oligodesoxirribonucleótido.

30 La expresión y la actividad funcional de la Rspo3 están relacionadas con el desarrollo del sistema vascular y la proliferación celular, lo cual indica que la Rspo3 interviene en el proceso de vascularización. Las R-espondinas como Rspo2 o 3 inducen el FCEV y se ha demostrado que el FCEV es un factor de crecimiento mitógeno que actúa exclusivamente en las células endoteliales (Ferrara, N. and Henzel, W. J., 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 161: 851-858).

35 En un aspecto, los polipéptidos de R-espondina como Rspo2 o 3 se pueden administrar *in vivo* para modular la angiogénesis y/o la vasculogénesis. Por ejemplo, la administración de Rspo2 o 3 se puede usar en el tratamiento de enfermedades que requieren la promoción de la angiogénesis y/o la vasculogénesis, mientras que los antagonistas de Rspo2 o 3 se pueden emplear para tratar enfermedades que requieren la inhibición de la angiogénesis y/o de la vasculogénesis.

40 En concreto se pueden usar agonistas de R-espondina para tratar enfermedades que requieren la promoción de la angiogénesis y/o la vasculogénesis. Más concretamente, dichas enfermedades están seleccionadas del grupo formado por curación de heridas, regeneración o desarrollo de tejidos y órganos, procesos degenerativos vasculares (p.ej. isquemia crítica de extremidades o isquemia cerebral, enfermedad cardíaca isquémica), desarrollo embrionario y procesos reproductivos tales como el desarrollo del folículo en el cuerpo lúteo durante la ovulación y el crecimiento de la placenta durante el embarazo. De manera específica dicha enfermedad está seleccionada entre curación de heridas, regeneración o desarrollo de tejidos y órganos, procesos degenerativos vasculares (p.ej. isquemia crítica de extremidades o isquemia cerebral, enfermedad cardíaca isquémica).

En un aspecto particular el agonista de R-espondina es un agonista de Rspo2 o de Rspo3.

45 En un aspecto particular, el agonista de R-espondina se elige entre un polipéptido de R-espondina, un ácido nucleico de R-espondina o una molécula pequeña. En concreto se puede usar un polipéptido de R-espondina para tratar enfermedades que requieren la promoción de la angiogénesis y/o la vasculogénesis. En un aspecto más particular se puede emplear un ácido nucleico de R-espondina para tratar enfermedades que requieren la promoción de la angiogénesis y/o la vasculogénesis.

50 En una forma de ejecución particular de la presente invención se pueden usar antagonistas de R-espondina para tratar enfermedades que requieren la inhibición de la angiogénesis, como p.ej. el crecimiento tumoral y la actividad metastásica, la aterosclerosis, la estenosis, la restenosis, la retinopatía, la degeneración macular, la psoriasis y la artritis reumatoide. En una forma de ejecución particular dicha enfermedad es el crecimiento de un tumor sólido. En otra forma de ejecución particular dicha enfermedad es degeneración macular. En otra forma de ejecución particular dicha enfermedad es artritis reumatoide.

En una forma de ejecución particular de la presente invención el antagonista de R-espondina es un antagonista de Rspo2 o de Rspo3.

5 En una forma de ejecución particular de la presente invención el antagonista de R-espondina se selecciona entre un anticuerpo de R-espondina o un ácido nucleico capaz de inhibir la traducción, la transcripción, la expresión y/o la actividad de la R-espondina. En una forma de ejecución más particular de la presente invención se puede utilizar un anticuerpo de R-espondina para tratar las enfermedades que requieren la inhibición de la angiogénesis y/o de la vasculogénesis. En una forma de ejecución más particular de la presente invención se puede usar un ácido nucleico capaz de inhibir la traducción, la transcripción, la expresión y/o la actividad de la R-espondina para tratar aquellas enfermedades que requieren la promoción de la angiogénesis y/o la vasculogénesis. En una forma de ejecución más particular de la presente invención se puede usar un ARNip o ácido nucleico antisentido contra R-espondina para tratar las enfermedades que requieren la inhibición de la angiogénesis y/o de la vasculogénesis.

15 Los reguladores, efectores o moduladores de R-espondina farmacéuticamente activos se pueden administrar tal cual a un paciente o en composiciones farmacéuticas en las que van mezclados con vehículos o excipientes adecuados.

20 Dependiendo de las enfermedades concretas que se estén tratando, estos agentes se pueden formular y administrar sistémica o localmente. En la última edición de "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., se pueden encontrar técnicas de formulación y administración. Los modos de administración adecuados pueden incluir, por ejemplo, la vía oral, rectal, transmucosal o intestinal; la administración parenteral, incluyendo la inyección intramuscular, subcutánea, intramedular, así como la inyección intratecal, intraventricular directa, intra-peritoneal, intranasal o intraocular, o, en el caso de tumores sólidos, la inyección directa en un tumor sólido. Para inyectarlos, los agentes de la presente invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hanks, la solución de Ringer o en tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosal se usan en la formulación agentes de penetración apropiados para permeabilizar la barrera. Estos agentes penetrantes son generalmente conocidos en la especialidad.

25 Los reguladores, efectores o moduladores de R-espondina se pueden formular fácilmente empleando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos del estado técnico, en dosis adecuadas para la administración oral. Estos vehículos permiten formular los reguladores, efectores o moduladores de R-espondina conforme a la presente invención en forma de tabletas, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones y similares, para ingestión oral del paciente tratado.

30 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para usar según la presente invención incluyen aquellas que llevan los reguladores, efectores o moduladores de R-espondina en una cantidad efectiva para lograr el fin pretendido. Los expertos en la materia tienen la capacidad suficiente para determinar las cantidades efectivas, sobre todo a la luz de la exposición detallada que aquí se ofrece.

35 Además de los reguladores, efectores o moduladores de R-espondina, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables, incluyendo excipientes y sustancia auxiliares que facilitan la elaboración de los reguladores, efectores o moduladores de R-espondina en preparados de uso farmacéutico. Los preparados formulados para administración oral pueden estar en forma de tabletas, grageas, cápsulas o soluciones.

40 Las formulaciones farmacéuticas arriba reveladas se pueden producir mediante procedimientos ya conocidos, p.ej. por procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, grageado, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

45 Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los reguladores, efectores o moduladores de R-espondina en forma soluble en agua. Además se pueden preparar suspensiones en aceite de los reguladores, efectores o moduladores de R-espondina aptas para inyectar. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como el aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos tales como el oleato de etilo, o triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas inyectables pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como la carboximetilcelulosa sódica, el sorbitol o el dextrano. Opcionalmente la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumenten la solubilidad de los reguladores, efectores o moduladores de R-espondina, con el fin de permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

50 Los preparados farmacéuticos de uso oral se pueden obtener combinando los reguladores, efectores o moduladores de R-espondina con un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando dicha mezcla de gránulos después de añadir sustancias auxiliares adecuadas, si se desea, a fin de obtener tabletas o núcleos de grageas. Como excipientes son particularmente adecuados rellenos tales como los azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manita o sorbita; los almidones de maíz, trigo, arroz, patata; gelatina y goma tragacanto; preparaciones celulósicas tales como, por ejemplo, metil-celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetil-celulosa sódica; y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea pueden añadirse agentes desintegrantes como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico o una sal del mismo, tal como el alginato sódico.

65

Los núcleos de grageas se recubren adecuadamente. Para ello se puede usar soluciones concentradas de azúcar que opcionalmente pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de las tabletas o grageas para identificar o caracterizar las distintas combinaciones de dosis de reguladores, efectores o moduladores de R-espondina.

Los preparados farmacéuticos de uso oral incluyen cápsulas duras de gelatina, así como cápsulas blandas selladas de gelatina con un plastificante tal como glicerina o sorbita. Las cápsulas duras pueden contener los reguladores, efectores o moduladores de R-espondina mezclados con una sustancia de relleno como la lactosa, con aglutinantes como los almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato magnésico y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los reguladores, efectores o moduladores de R-espondina pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además se pueden agregar estabilizantes.

Las composiciones que llevan los reguladores, efectores o moduladores de R-espondina formulados en un vehículo farmacéuticamente compatible se pueden preparar, introducir en un recipiente idóneo y etiquetar para el tratamiento de una enfermedad indicada. Las enfermedades procedentes para indicar en la etiqueta pueden incluir el tratamiento de un tumor tal como un glioma o glioblastoma, y otras cuyo tratamiento implique la inhibición de la angiogénesis y/o de la vasculogénesis.

Las composiciones que llevan los reguladores, efectores o moduladores de R-espondina de la presente invención formulados en un vehículo farmacéuticamente compatible se pueden preparar, introducir en un recipiente idóneo y etiquetar para el tratamiento de una enfermedad indicada. Las enfermedades procedentes para indicar en la etiqueta pueden incluir el tratamiento de enfermedades que requieran la promoción de la angiogénesis y/o vasculogénesis, en particular la curación de heridas.

Las composiciones farmacéuticas también pueden llevar vehículos o excipientes adecuados, sólidos o en fase gel. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen, sin limitarse a ellos, carbonato cálcico, fosfato cálcico, varios azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros como los polietilenglicoles.

Muchos de los reguladores, efectores o moduladores de R-espondina se pueden preparar como sales con contraindicaciones farmacéuticamente compatibles. Las sales farmacéuticamente compatibles se pueden formar con muchos ácidos, incluyendo, sin limitarse a ellos, los ácidos clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros disolventes protónicos que las respectivas formas básicas libres.

La dosis terapéuticamente efectiva de cualquier regulador, efector o modulador de R-espondina usada en el método arriba expuesto puede estimarse inicialmente partiendo de ensayos de cultivo celular. Por ejemplo se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración circulante que incluya el valor IC50 determinado en el cultivo celular (es decir, la concentración del compuesto ensayado que produce la inhibición semi-máxima de la actividad de la PTP). Esta información se puede usar para determinar con mayor exactitud las dosis útiles en humanos.

Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad de regulador, efector o modulador de R-espondina que mejora los síntomas o prolonga la supervivencia del paciente. La toxicidad y la eficacia terapéutica de los citados reguladores, efectores o moduladores de R-espondina se puede determinar mediante procedimiento farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales de experimentación, p.ej. para determinar el valor LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y el valor ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). El cociente de dosificación entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación ED50/LD50. Se prefieren los reguladores, efectores o moduladores de R-espondina que dan los mayores índices terapéuticos. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y de los estudios con animales pueden utilizarse para fijar un intervalo de dosificación destinado al uso en humanos. La dosificación de tales reguladores, efectores o moduladores de R-espondina está comprendida preferiblemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluye el valor ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo en función de la forma de dosificación y de la vía de administración utilizadas. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación se pueden elegir por cada médico a la vista del estado del paciente (véase p.ej. Finl y otros, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p1).

La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para aportar al plasma unos niveles de reguladores, efectores o moduladores de R-espondina que sean suficientes para mantener los efectos de inhibición o promoción de la Rspo3. Las dosis usuales para la administración sistémica a un paciente están comprendidas en un intervalo de 1-2000 mg/día, normalmente de 1-250 mg/día y típicamente de 10-150 mg/día. Referidas al peso corporal del paciente las dosis usuales varían entre 0,02-25 mg/kg/día, normalmente 0,02-3 mg/kg/día, típicamente 0,2-1,5 mg/kg/día. Referidas a zonas superficiales del paciente las dosis usuales varían entre 0,5-1200 mg/m²/día, normalmente 0,5-150 mg/m²/día, típicamente 5-100 mg/m²/día.

La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para aportar al plasma unos niveles del regulador, efector o modulador de R-espondina que sean suficientes para mantener los efectos de inhibición o promoción de la R-espondina. Los niveles medios habituales en plasma deberían mantenerse entre 50-5000 µg/ml, normalmente 50-1000 µg/ml y típicamente 100-500 µg/ml.

5 Como alternativa, el regulador, efector o modulador de R-espondina se puede administrar localmente en lugar de sistémicamente, por ejemplo inyectando el regulador, efector o modulador de R-espondina directamente a un tumor, a menudo mediante una formulación para absorción gradual o liberación prolongada.

10 La composición farmacéutica también se puede administrar mediante un sistema de liberación dirigida del fármaco, por ejemplo en un liposoma recubierto con anticuerpo específico del tumor. Los liposomas son dirigidos y absorbidos selectivamente por el tumor.

15 En los casos de administración local o absorción selectiva puede ser que la concentración localmente efectiva de la composición farmacéutica no tenga relación con la concentración en el plasma.

20 Los ácidos nucleicos de R-espondina o los compuestos capaces de unirse a la R-espondina, como los anticuerpos, se pueden usar con fines diagnósticos para detectar la expresión de R-espondina en los procesos, enfermedades o trastornos relacionados con la angiogénesis y/o la vasculogénesis.

25 Los reactivos adecuados para detectar R-espondinas, como los ácidos nucleicos de R-espondina o los compuestos capaces de unirse a la R-espondina, pueden tener varios usos para el diagnóstico de procesos, enfermedades o trastornos resultantes de la expresión aberrante de R-espondina, relacionados con la misma y/o acompañados de ella. Los métodos de diagnóstico se llevan a cabo preferiblemente en muestras obtenidas de un sujeto, p.ej. de un paciente humano, p.ej. muestras de fluidos corporales como sangre entera, plasma, suero u orina, o de muestras de tejidos como las obtenidas por biopsia o autopsia. Por ejemplo, la secuencia de R-espondina se puede utilizar en amplificación, p.ej. en ensayos de hibridación, para diagnosticar anomalías en la expresión de R-espondina; p.ej. en análisis Southern o Northern blot, incluyendo los ensayos de hibridación *in situ*.

30 El ADNc de R-espondina se puede usar como sonda para detectar la expresión del correspondiente ARNm. En un ejemplo específico aquí descrito se analizó la expresión del ARNm de Rspo3 en embriones de ratón (FIG. 4). El ARNm de Rspo3 se encontró enriquecido en los vasos embrionarios, lo cual indica que la Rspo3 interviene en la proliferación de células endoteliales.

35 La presente invención se explica también con mayor detalle mediante el siguiente ejemplo.

6 EJEMPLO

6.1 MATERIALES Y MÉTODOS

40 Secuencias codificadoras de Rspo

La secuencia codificadora de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducidos de los genes de R-espondina de ratón y de *Xenopus* depositadas en el banco genético aquí utilizado son

45

X. laevis	R-espondina-2 [gi:54145367] (SEQ ID NO: 1)
X. tropicalis	R-espondina-3 [gi:114149217] (SEQ ID NO: 2)
M. musculus	R-espondina-3 [NM_028351] (SEQ ID NO: 3)

50 Embriones de ratón y de *Xenopus*

Se aparearon ratones BALB/c durante la noche y la mañana en que se detectó el tapón vaginal se definió como 1/2 día de gestación. Para los análisis histológicos rutinarios, los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 4% durante la noche y se incluyeron en cera de parafina para poder cortarlos. Se cortaron respectivamente secciones de 4 mm y se tiñeron con hemalum y eosina. Para la hibridación *in situ* de los embriones enteros, éstos se fijaron y procesaron del modo descrito (del Barco y otros, 2003, Genes Dev. 17, 2239-2244). Los embriones de *Xenopus* se obtuvieron mediante fertilización *in vitro* y se cultivaron del modo descrito (Gawantka y otros, 1995 EMBO J. 14, 6268-79). Los embriones de *Xenopus* se fijaron y procesaron del modo descrito para la hibridación *in situ* de los embriones enteros (Bradley y otros, 1996 Development 122, 2739-2750). La zona marginal ventral se escindió y se cultivó del modo descrito (Gawantka y otros, 1995 EMBO J. 14, 6268-79). Para generar ribosondas antisentido se usaron ADNc de Rspo3 de longitud completa.

65 Siguiendo procedimientos estándar se obtuvieron ratones KO de Rspo3 por mutagénesis dirigida de Rspo3 murina (gi:94388197) en células madre embrionarias de ratón, utilizando un vector direccional mostrado en la FIG. 5. Los ratones transgénicos se generaron sobre un fondo de C57BL/6 por inyección de diploides estándar. Los embriones mutantes homocigotos fueron generados por entrecruzamientos heterocigóticos. Luego los C57BL heterocigotos se

retrocruzaron con hembras CD1 durante al menos 6 generaciones. No se detectó ninguna diferencia importante entre los embriones homocigotos en el fondo genético de C57BL/6 y CD1. Para determinar el genotipo por PCR se usaron puntas de cola, sacos vitelinos o embriones de ratón. El genotipado se realizó rutinariamente por análisis de PCR con 3 cebadores: 5'-ATGCTTTGAGGCTTGTGACC-3' (SEQ ID NO: 4), 5'-TGCACCGACTCCAGTACTGG-3' (SEQ ID NO: 5) y 5'-TACATTCTGGTTTCTCATCTGG-3' (SEQ ID NO: 6).

RT-PCR

Los ensayos de RT-PCR se llevaron a cabo del modo descrito (Gawantka y otros, 1995 EMBO J. 14,6268-79); los cebadores adicionales fueron: (directo, actcacctccagacaagaa (SEQ ID NO: 7); inverso, atttaacccgctgcccac (SEQ ID NO: 8)); α -globina (directo, tcctcagaccaaaactac (SEQ ID NO: 9); inverso, cccctcaatttatgctggac (SEQ ID NO: 10)); Xmsr (directo, aactcgctctcgctcctcatc (SEQ ID NO: 11); inverso, gccagcagatagcaaacaccac (SEQ ID NO: 12)), FCEV (directo, aggcgagggagaccataaac (SEQ ID NO: 13); inverso, tctgctgcattcacactgac (SEQ ID NO: 14)).

Preparación de un medio acondicionado con Rspo2 de *Xenopus laevis*

Del modo descrito (Kazanskaya y otros, 2004, Dev. Cell 7, 525-534) se transfectaron células HEK293T con Rspo2 de *Xenopus laevis* (gi:54145367) y se extrajeron del medio acondicionado.

Ensayo de proliferación endotelial

Se cultivaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (PromoCell) en medio de cultivo de células endoteliales (Promocell) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%. Para los estudios de proliferación las células se cultivaron en placas de 96 pocillos hasta el 50% de confluencia, al día siguiente se suplementaron con las proteínas FCEV y Rspo2 de *Xenopus laevis* durante 48 h, tras lo cual se añadió BrdU (10 μ M) a cada pocillo durante 4 h. El análisis de proliferación celular con BrdU se realizó mediante el uso del kit "Cell Proliferation ELISA, BrdU" quimioluminescente de Roche Applied Science.

Ensayo de membrana corioalantoidea (MCA)

Para el ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (MCA) se incubaron huevos de pollo a 37°C en una cámara humidificada. Al tercer día de desarrollo se practicó una ventana en la cáscara externa y al sexto día de desarrollo se pusieron en la superficie de la MCA 20 μ l de Rspo2 o perlas de control o un disco filtrante (Whatman 3MM de 8 mm de diámetro) que llevaba FCEV recombinante (Sigma-Aldrich, 100 ng/filtro). Las perlas (ANTI-FLAG M2-Agarosa, Sigma) se incubaron por la noche con medio acondicionado con Rspo2 de *Xenopus laevis* o con medio de control procedente de células HEK 293T no transfectadas y se lavaron 3 veces en SBF. Después de 5 días de incubación los discos filtrantes y la MCA adherida se escindieron, se lavaron con SBF y se prepararon para análisis histológico, tiñéndolos con hematoxilina-eosina.

Oligonucleótido antisentido morfolino

Basándose en la secuencia del ADNc de Rspo3 de *Xenopus tropicalis* (gi:114149217) se designó un oligonucleótido antisentido morfolino (secuencia: 5': atgcaattgcgactgctttctctgt (SEQ ID NO: 15)).

6.2 RESULTADOS

La FIG.1 demuestra que un oligonucleótido antisentido morfolino dirigido contra la Rspo3 de *Xenopus tropicalis* inhibió el desarrollo de la formación de vasos sanguíneos en renacuajos de *Xenopus*. Un marcador de la formación de vasos sanguíneos es el gen msr, que fue regulado a la baja. La inhibición del desarrollo de los vasos sanguíneos – en otras palabras, de la angiogénesis embrionaria – va acompañada de la expansión del desarrollo de células sanguíneas, ya que los marcadores de las células sanguíneas α -globina y SCL han aumentado. Los resultados indican que la Rspo3 es un regulador que cambia el destino celular entre desarrollo de células de la sangre y vasos sanguíneos. La especificidad del fenotipo inducido por morfolino para la inhibición de Rspo3 está demostrada en el ensayo de recuperación de la FIG. 2. En este experimento la molécula relacionada Rspo2 fue capaz de revertir la expansión del marcador sanguíneo α -globina.

La capacidad de la Rspo2 para promover la angiogénesis en embriones de *Xenopus* se demuestra en un ensayo de zonas marginales ventrales (ZMV) en la FIG. 3. La sobreexpresión del ARNm de Rspo2 inhibe los marcadores de las células sanguíneas e induce el marcador endotelial msr, así como el factor angiogénico FCEV. Inversamente, la necesidad de Rspo3 endógena para la angiogénesis embrionaria se demuestra mediante la inhibición del msr y del FCEV por un oligonucleótido antisentido morfolino.

Mediante los ejemplos de las FIGs. 1-3 se demuestra que la inhibición de Rspo3 en un vertebrado inhibe el FCEV, la vasculogénesis y la angiogénesis. Por lo tanto los antagonistas de Rspo3 serán útiles para inhibir deliberadamente el FCEV, la vasculogénesis y la angiogénesis allí donde sea necesario, p.ej. en estados cuyo tratamiento implica la inhibición de la vasculogénesis y/o de la angiogénesis.

La capacidad de las R-espondinas para promover la angiogénesis no está limitada a *Xenopus*, sino que también se extiende a los mamíferos, p.ej. a los ratones. La Rspo3 está expresada en vasos sanguíneos de embriones murinos (FIG. 4). Por otra parte los ratones con Rspo3 mutada muestran angiogénesis defectuosa, lo cual queda demostrado por la mortalidad precoz de tales ratones mutantes, que sufren hemorragias internas como fenómeno característico del fallo de formación de vasos sanguíneos (FIG. 6). La angiogénesis defectuosa también es evidente por la menor formación de vasos sanguíneos en el saco vitelino de los embriones mutantes (FIG. 7). Además la inactivación de la Rspo3 va acompañada de la regulación decreciente del FCEV en las placentas mutantes (FIG. 8). Mediante estos ejemplos se demuestra de nuevo que la inhibición de la Rspo3 en los mamíferos inhibe el FCEV, la vasculogénesis y la angiogénesis.

La capacidad de la Rspo2 para inducir la angiogénesis se demuestra en dos ensayos estándar de angiogénesis *in vitro*. En el ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (MCA) se mide la capacidad de los reguladores, efectores o moduladores R-espondina para promover el crecimiento de células endoteliales y vasos sanguíneos. Después de implantar perlas impregnadas con un medio acondicionado con FCEV o Rspo2 se observó una fuerte inducción del crecimiento de células endoteliales y vasos sanguíneos (FIG. 9). Además el medio acondicionado con Rspo2 indujo la morfogénesis ramificante en las células endoteliales (FIG. 10), que es una respuesta característica a los factores angiogénicos. La Rspo2 también indujo la proliferación de células endoteliales, de modo similar al factor angiogénico FCEV (FIG. 11).

El alcance de la presente invención no debe limitarse a las formas de ejecución ejemplificadas, que están pensadas como ilustraciones de aspectos singulares de la misma y cualquiera de los clones, ADN o equivalentes funcionales de R-espondina cae dentro de su ámbito. De hecho varias modificaciones de la presente invención, además de las aquí descritas, resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción precedente y las figuras adjuntas. Dichas modificaciones están pensadas para caer dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Deutsches Krebsforschungszentrum (*Centro alemán de investigación del cáncer*)
- <120> R-espondinas como moduladores de angiogénesis y vasculogénesis
- <130> 38994P WO
- <150> EP 06022070
- <151> 2006-10-20
- <160> 23
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 1432
- <212> ADN
- <213> *Xenopus laevis*
- <220>
- <221> gen
- <222> (1)..(1432)
- <223> R-espondina-2 de *Xenopus laevis*
- <400> 1

ES 2 564 794 T3

gggggtgatt tcaaggccgt ccaaatgcag tttcaactct tttcattcgc cctgatcadc 60
 ctgaactgtg tggattacag tcaactgcaa gcctcccgcg ggagacggag caagagagcc 120
 agctatggga ccaacccgat atgcaaaggt tgctgtcct gctcaaaaga taatgggtgc 180
 ctccgctgcc agccaaaact gtttttcttt ctgcgaagag aaggtatgag gcagtatgga 240
 gagtgtctgc agtcctgccc tccgggatac tatggagtca gaggacctga tatgaacagg 300
 tgttccagat gcagaattga aaattgcgac tcttgtttta gtagagattt ttgcataaag 360
 tgcaaatcgg gcttttactc cctcaagggg caatgctttg aagaatgcc agaaggattt 420
 gcaccactgg atgataccat ggtgtgtgtg gatggctgcg aagtagggcc atggagtgaa 480
 tggggcacat gcagccgaaa taacagaacg tgcggtttca aatggggcct ggagaccaga 540
 acgcgacaaa ttgtgaagaa accagcaaaa gacaccatcc cctgcccaac tattgctgaa 600
 tccagaagat gtaagatggc aataagacac tgccctggag gaaagagaac tacaagaag 660
 aaggacaaga ggaacaagaa gaagaaaaag aagttactgg agagggccca agagcagcac 720
 agcgtcgtcc ttgctacaga ccggctctagc caatagagac agatccttac atttttcttt 780
 tttgctaagt gcacaacggc tgctacatgc tcttgcacac gaatgaactg cggaacccgct 840
 gctttaacag tattggttgc aaataacatg tgaaccgatt cacaaggttg tttgtgttat 900
 ttatacattt ttaatttttt tttcctcaat ccggaacttc caaaaaggag tgaacgctga 960
 gttgaatcag tgtttagtgg gggacaaaagg attttttttt taattattgt ttcttcggtt 1020
 tttattgtag tgctgtgag gggcactggc agaattcttt ttggaaaagg aactggtgta 1080
 gaaattgcag aagctatcta caactactcg gacttgtgta ttttctgtg aaaggaaaaa 1140
 aaaacagaat aaagaaaccc cttggtggga ccgacccaat atcatttttt tttgcttgtt 1200
 ttacatactg tacatttcac gattgtacat gaaatatttg ttaggtgat gtttgttccc 1260
 agcgcctatt ttattaaaac agttgtataa tgaactggt taagctaata tactgtacta 1320
 cagaggtaac tgcttattgt ccctttagc ctattgggta tttgtacata gtgctgagaa 1380
 gctacacata ataaacttat ttactgtgta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1432

- 5 <210> 2
- <211> 786
- <212> ADN
- <213> Xenopus sp.
- <220>
- 10 <221> gen
- <222> (1)..(786)
- <223> R-espondina-3 de Xenopus tropicalis
- <400> 2

ES 2 564 794 T3

cattacaagg ttactatgca attgcgactg ctttctctgt gttttatcat attgaacttc 60
 ttggaataca ttgacagcca gcagatcccc agagggaggc gacatcggag aatgcatcct 120
 aatgtcagcc agggttgcca aggaggatgt gctacatggt ctgattataa tggctgttta 180
 acatgcaagc ctcagctggt tttcgctttg gtaagaaatg gaatgaagca aattggagtc 240
 tgtcgtccct cctgtccaaa tggatatttt gggatcagat caccagaaat aaataaatgt 300
 acaaaatgca aagctgactg tgaacatgt ttcaacaaaa atttctgcac aaagtgtaaa 360
 agtggatttt acaaacacaa cggaaagtgc ttagacacat gtcctgaagg gtttgagaac 420
 aatcacaata tggagtgcac cagtgtggtg cactgcgtag ttggggagtg gagcgcttgg 480
 ggtccgtgca caaagagggg gaaaacctgt gacatcaagc gaggaaatga aacaagggtt 540
 cgggaaattt tacaatacc ttcacctagg ggcacaccct gtccgccaac atccgagaca 600
 aaaaaatgtg tagtaaagag aaagaaatgt caagacagtc aagacagaca aaggccaaga 660
 ggcaacagag atgaaataaa aaagaataaa caaagggcga agaatggtga cgctcccaga 720
 aaacaaagac agagaaagca agagagaaat cagcgagaag gaaagagagg ggagggcaaa 780
 gtctaa 786

5 <210> 3
 <211> 946
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(946)
 10 <223> R-espondin-3 de M. musculus
 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(946)
 <223> R-espondin-3 de M. musculus
 15 <400> 3

ES 2 564 794 T3

tctgtctcag aagccagaa gcagctcggg tctctccagc gcccttgac catggctgcg 60
 gtaccacagg cgtccgcttc cctgcgctcc cggggtcctt gccacagccg cagccgctgc 120
 agcctctgag ccccaggggc cactgctcgc ctggattccg cccgcagccg ccgctgctgt 180
 gcaaccgagg ctaacctgcg gccagccagg aggctcctgc aaccttcgct cgcggcgatg 240
 acagccaccc cagagcagcc ggctgtgttc ggacaatttg agaatgcaat tgttggtttc 300
 ccggtccacc cgtcccgttc cgcttgccat cacagcacgc ctgttgatc tcagtggaga 360
 agtcccgtg ctctggtttt tctactcttc gtatagactc gcctaacacc tacatacata 420
 tttttcttta aaaaaaaaaa ttaaataataa ctaacagtga aaagaaaaag gagagaaaaa 480
 agggaaacat tacaggggta ctatgcactt gcgactgatt tcttggtttt ttatcatttt 540
 gaactttatg gaatacattg gcagccaaaa cgcctcccga ggaaggcgcc agcgaagaat 600
 gcatcctaag gtcagtcaag gctgccaagg aggctgtgca acgtgttcag attacaatgg 660
 ctgtttgtca tgtaagccca gactgttttt tgttctggaa aggattggca tgaagcagat 720
 aggagtgtgt ctctcttcgt gtccaagtgg atattacgga actcgatatac cagatataaa 780
 taaatgtaca aaatgcaaag ttgactgtga tacctgtttc acaaaaatt tctgcacaaa 840
 gtgtaaaaagt ggattttact tacaccttgg aaagtgcctt gacagttgcc cagaagggtt 900
 agaagccaac aatcatacta tggaatgtgt cagtattgat cagtaa 946

5 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Par de cebadores F1
 <220>
 10 <221> Unión de cebadores
 <222> (1)..(20)
 <400> 4
 atgcttgag gcttgacc 20
 <210> 5
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Par de cebadores R1
 <220>
 20 <221> Unión de cebadores
 <222> (1)..(20)
 <400> 5
 tgcaccgact ccagtactgg 20
 25 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Trío de cebadores 3º
 <220>
 <221> Unión de cebadores
 <222> (1)..(22)
 <400> 6
 35 tacattctgg ttctcatct gg 22
 <210> 7
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> XSCL directo
 5 <220>
 <221> Unión de cebadores
 <222> (1)..(20)
 <400> 7
 actcacctc cagacaagaa 20
 10 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> XSCL inverso
 <220>
 <221> Unión de cebadores
 <222> (1)..(20)
 <400> 8
 20 attaatcac cgctgccac 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> A-globina directo
 <220>
 <221> Unión de cebadores
 <222> (1)..(20)
 30 <400> 9
 tccctcagac caaacctac 20
 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> A-globina inverso
 <220>
 <221> Unión de proteínas
 40 <222> (1)..(21)
 <400> 10
 cccctcaatt ttatgctgga c 21
 <210> 11
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Xmsr directo
 <220>
 50 <221> Unión de cebadores
 <222> (1)..(24)
 <400> 11
 aacttcgctc tcgctcctcc atac 24
 55 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Xmsr inverso
 60 <220>
 <221> Unión de cebadores
 <222> (1)..(22)
 <400> 12
 gccagcagat agcaaacacc ac 22
 65 <210> 13
 <211> 20

ES 2 564 794 T3

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> FCEV directo
 5 <220>
 <221> Unión de cebadores
 <222> (1)..(20)
 <400> 13
 aggcgagga gaccataaac 20
 10 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> FCEV inverso
 <220>
 <221> Unión de cebadores
 <222> (1)..(20)
 <400> 14
 20 tctgctgcat tcacactgac 20
 <210> 15
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Morfolino antisentido
 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (1)..(25)
 30 <400> 15
 atgcaattgc gactgcttc tctgt 25
 <210> 16
 <211> 2995
 <212> ADN
 35 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> Gen
 <222> (1)..(2995)
 <223> R-espondina-1 humana
 40 <400> 16

 gcgaccggcc agagtagggc atccgctcgg gtgctgcgga gaacgagggc agctccgagc 60
 cgccccggag gaccgatgcg ccgggtgggg cgctggcccc gagggcgtga gccgtccgca 120
 gattgagcaa cttgggaacg ggccggcgga gcgcaggcga gccgggcgcc caggacagtc 180
 ccgcagcggg cgggtgagcg ggccgcgcc tcgcccctcc cgggcctgcc cccgtcgca 240
 ctggcagcac gaagctgaga ttgtggttcc ctggtgattc aggtgggagt gggccagaag 300
 atcaccgctg gcaaggactg gtgtttgtca actgtaagga ctcatggaac agatctacca 360
 gggattctca gaccttagtt tgagaaatgc tgcaattaa ggcaaatcct atcactctga 420

ES 2 564 794 T3

gtgatcgctt tgggtgctgag gcaatcaacc ataaagataa atgcaaatat ggaaattgca 480
 taacagtact cagtattaag gttggttttt ggagtagtcc ctgctgacgt gacaaaaaga 540
 tctctcatat gatattccga ggtatctttg aggaagtctc tctttgagga cctccctttg 600
 agctgatgga gaactgggct ccccacaccc tctctgtccc cagctgagat tatggtggat 660
 ttgggctacg gcccaggcct gggcctcctg ctgctgaccc agccccagag gtgtagca 720
 gagccgtgtg ctatccaccc tccccgagac caccctccg accaggggccc tggagctggc 780
 gcgtgactat ggggcttggg ctgtgtgtgg tggccctggg tctgagctgg acgcacctca 840
 ccatcagcag ccgggggatc aaggggaaaa ggcagaggcg gatcagtgcc gaggggagcc 900
 aggctgtgc caaaggctgt gagctctgct ctgaagtcaa cggctgcctc aagtgtcac 960
 ccaagctgtt catcctgctg gagaggaacg acatccgcca ggtgggcgtc tgcttgccgt 1020
 cctgcccacc tggatacttc gacgcccgca accccgacat gaacaagtgc atcaaatgca 1080
 agatcgagca ctgtgaggcc tgcttcagcc ataacttctg caccaagtgt aaggagggct 1140
 tgtacctgca caagggccgc tgctatccag cttgtcccga gggctcctca gctgccaatg 1200
 gcacatgga gtgcagtagt cctgcgcaat gtgaaatgag cgagtggctc ccgtgggggc 1260
 cctgctccaa gaagcagcag ctctgtggtt tccggagggg ctccgaggag cggacacgca 1320
 ggggtgtaca tgcccctgtg ggggaccatg ctgcctgctc tgacaccaag gagaccgga 1380
 ggtgcacagt gaggagagtg ccgtgtcctg aggggcagaa gaggaggaag ggaggccagg 1440
 gccggcggga gaatgccaac aggaacctgg ccaggaagga gagcaaggag gcgggtgctg 1500
 gctctcgaag acgcaagggg cagcaacagc agcagcagca agggacagtg gggccactca 1560
 catctgcagg gcctgcctag ggacactgtc cagcctccag gccatgcag aaagagttca 1620
 gtgctactct gcgtgattca agctttcctg aactggaacg tcgggggcaa agcatacaca 1680
 cacactccaa tccatccatg catacataga cacaagacac acacgtcaa acccctgtcc 1740
 acatatacaa ccatacatac ttgcacatgt gtgttcatgt acacacgag acacagacac 1800
 cacacacaca catacacaca cacacacaca cacacctgag gccaccagaa gacacttcca 1860
 tccctcgggc ccagcagtac acacttggtt tccagagctc ccagtggaca tgtcagagac 1920
 aacacttccc agcatctgag accaaactgc agaggggagc cttctggaga agctgctggg 1980
 atcggaccag ccaactgtggc agatgggagc caagcttgag gactgctggt gacctgggaa 2040
 gaaaccttct tccatcctg ttcagcactc ccagctgtgt gactttatcg ttggagagta 2100
 ttgttaccct tccaggatac atatcagggt taacctgact ttgaaaactg cttaaagggt 2160
 tatttcaaat taaaacaaaa aatcaacga cagcagtaga cacaggcacc acattccttt 2220
 gcagggtgtg agggtttggc gaggtatgcg taggagcaag aaggacagga gaatttcaag 2280
 agaccccaaa tagcctgctc agtagagggt catgcagaca aggaagaaaa cttaggggct 2340
 gctctgacgg tggtaaacag gctgtctata tccttgttac tcagagcatg gcccggcagc 2400

ES 2 564 794 T3

```

agtgttgca cagggcagct tgtaggaat gagaatctca ggtctcattc cagacctggt 2460
gagccagagt ctaaatttta agattcctga tgattggcat gttaccctaaa tttgagaagt 2520
gctgctgtaa ttccccttaa aggacgggag aaagggcccc ggccatcttg cagcaggagg 2580
gattctggtc agctataaag gaggactttc catctgggag aggcagaatc tatatactga 2640
agggctagtg gcaactgccag ggaagggag tgcgtaggct tccagtgatg gttggggaca 2700
atcctgcca aaggcagggc agtggatgga ataactcctt gtggcattct gaagtgtgtg 2760
ccaggctctg gactaggtgc taggtttcca gggaggagcc aaacacgggc cttgctcttg 2820
tggagcttag aggttggtgg ggaagaaaat aggcattcac caaggaattg tacaacaca 2880
tatataacta caaaaggatg gtccaaggg caggtgacca ctggcatcta tgcttagcta 2940
tgaaagtga taaagcagaa taaaaataaa atactttctc tcaggaaaaa aaaaa 2995

```

```

<210> 17
<211> 263
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(263)
<223> R-espondina-1 humana
<400> 17

```

5

10

```

Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Ala Leu Val Leu Ser Trp Thr His
1          5          10          15

Leu Thr Ile Ser Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile
20          25          30

Ser Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser
35          40          45

Glu Val Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu
50          55          60

Glu Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro
65          70          75          80

Pro Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys
85          90          95

Cys Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr
100         105         110

Lys Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala
115         120         125

```

15

ES 2 564 794 T3

Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser
 130 135 140

Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser
 145 150 155 160

Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr
 165 170 175

Arg Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp
 180 185 190

Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro Glu
 195 200 205

Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn
 210 215 220

Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg
 225 230 235 240

Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Thr Val Gly Pro
 245 250 255

Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala
 260

- <210> 18
- <211> 2842
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> Gen
- <222> (1)..(2842)
- 10 <223> R-espondina-2 humana
- <400> 18

tggaattcca gagctgccag gcgctcccag cgggtctcgg caaacttttc cccagcccac 60

gtgctaacca agcggctctc ttcccagacc cgggatggag caccggcct agggaggccg 120

cgccgcccga gacgtgcgca cggttcgtgg cggagagatg ctgatcgcgc tgaactgacc 180

ggtgcggccc gggggtgagt ggcgagtctc cctctgagtc ctccccagca gcgcgccgg 240

cgccggctct ttgggcgaac cctccagttc ctagactttg agaggcgtct ctccccgcc 300

cgaccgcca gatgcagttt cgccttttct cctttgcct catcattctg aactgcatgg 360

attacagcca ctgccaaaggc aaccgatgga gacgcagtaa gcgagctagt tatgtatcaa 420

atcccatttg caagggttgt ttgtcttgtt caaaggacaa tgggtgtagc cgatgtcaac 480

agaagttgtt cttcttcctt cgaagagaag ggatgcgcca gtatggagag tgccctgcatt 540

ES 2 564 794 T3

cctgcccatac cgggtactat ggacaccgag ccccagatat gaacagatgt gcaagatgca 600
 gaatagaaaa ctgtgattct tgctttagca aagacttttg taccaagtgc aaagtaggct 660
 tttatttgca tagaggccgt tgctttgatg aatgtccaga tggttttgca ccattagaag 720
 aaaccatgga atgtgtggaa ggatgtgaag ttggtcattg gagcgaatgg ggaacttgta 780
 gcagaaataa tcgcacatgt ggatttaaat ggggtctgga aaccagaaca cggcaaattg 840
 ttaaaaagcc agtgaaagac acaataccgt gtccaacat tgctgaatcc aggagatgca 900
 agatgacaat gaggcattgt ccaggaggga agagaacacc aaaggcgaag gagaagagga 960
 acaagaaaaa gaaaaggaag ctgatagaaa gggcccagga gcaacacagc gtcttcctag 1020
 ctacagacag agctaacca taaaacaaga gatccggtag atttttaggg gtttttgttt 1080
 ttgcaaatgt gcacaaagct actctccact cctgcacact ggtgtgcagc ctttgtgctg 1140
 ctctgcccag tatctgttcc cagtaacatg gtgaaaggaa gcaccaccag catggcccct 1200
 gtgttattta tgctttgatt tgaatctgga gactgtgaag gcaggagtaa gtgcacagcc 1260
 cgtgacttgg ctcaagtgtg gctgagagaa tccgtccccg gcaccatgga catgctagag 1320
 gtgtgaggct gcagaacacc gctggaggac ggacttgtgc ctatztatgt gaaagaagat 1380
 gcttggcagg caatgcgcta ctcaactcgtg acctttatct ctcacattgt gcattttcaa 1440
 ggatatgttt gtgtggatat ctgcttagtg ttaccacatg gtattctcag catgttacct 1500
 tcacactggt gtgcgatgaa actgctttta gctgaggata tgctctggaa attcctgctc 1560
 agtttcaactg cagccctaata atgtacatat actgcaggag ctacatataa agctcttatt 1620
 tactgtatat ttatgctttc ttgtgggtaa caagtcatat ctgattaata tgatgccact 1680
 ttgtttctag tggttcctaa cccattgtct gataaatgac ttttctagtt tggggaattg 1740
 acacttgttt tgttgctct tgaactttt tttttttccc ctcattgtgg gcttatttct 1800
 cattgtaagg gtaggataaa ctagtttttg tatatagagt caaatgacca gtgtcaaaga 1860
 gtttgcatat tgggtagacc ttctccactc cacatgtccc acacatatag ataaagcagc 1920
 aggcggcatc tggcaatcag aagcccaaac tgcctttgag tctaagatgt gatgactttg 1980
 atgaaaacaca actgaaaaca tgagggacta tatccagtca cttgtagcca gtttcacagg 2040
 ccagctacag aattgtccaa acaaacatta tttctgactg caattttttt ccccaaatt 2100
 taaagcaatc cctggcttta aatgacaagg cacctaccaa tgttcttggg tcaactgaaga 2160
 agctactacc atgagcctgt gcatagaatt ttaggagata aaaggatgaa tttctgtgac 2220
 tgccagtcat atcttaacag gtttctgttg agccagaatc tgtttcagat ccaagatgga 2280
 gaggaacact atggaaactt cccagggtgac tttcagagca gttgtttcaa acacatcatt 2340
 gtctttttag gggaaaccagt ttttagaagg ttgtgaattg gctttttcac aaagcatgat 2400
 tatcttctctg gctgatccag gagaaaatta gaacagaaaa ataatggttg tggattttga 2460
 aacaaagcaa ggtaaagcct tttttttttc accttgcatt ggcaaaaacta cctcttcagt 2520

ES 2 564 794 T3

gtttttaact tttgattcaa aagcatctta ccaataagga taaatatcat atacatcggt 2580
 atgaaaatat tgctatgaga taataagcca catatgaatg ttgtatacaa ctttaggggt 2640
 tacatttaat cctgaagtgt tacctccttt catgtctatt tacactatnt tcccatttac 2700
 taagtgggga ggggggtctcc ttatatagtg cttcatcggt aataagtcaa tacctgttgt 2760
 tcctgggatg ttcttttttg tgcattaaaa acttcaaaat taaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2820
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ag 2842

5
 <210> 19
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(243)
 10 <223> R-espondina-2 humana
 <400> 19

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

15

ES 2 564 794 T3

Arg Thr Cys Gly Phe Lys Trp Gly Leu Glu Thr Arg Thr Arg Gln Ile
 165 170 175

Val Lys Lys Pro Val Lys Asp Thr Ile Pro Cys Pro Thr Ile Ala Glu
 180 185 190

Ser Arg Arg Cys Lys Met Thr Met Arg His Cys Pro Gly Gly Lys Arg
 195 200 205

Thr Pro Lys Ala Lys Glu Lys Arg Asn Lys Lys Lys Lys Arg Lys Leu
 210 215 220

Ile Glu Arg Ala Gln Glu Gln His Ser Val Phe Leu Ala Thr Asp Arg
 225 230 235 240

Ala Asn Gln

5 <210> 20
 <211> 2165
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> Gen
 <222> (1)..(2165)
 10 <223> R-espondina-3 humana
 <400> 20

gcggccgccc cggcggtcc tggaaccccg gttcgcggcg atgccagcca cccagcgaa 60
 gccgccgag ttcagtgtt ggataatttg aaagtacaat agttggtttc cctgtccacc 120
 cgccccactt cgcttgccat cacagcacgc ctatcggatg tgagaggaga agtcccgctg 180
 ctctgggact gtctatatac gcctaacacc tacatatatt ttaaaaacat taaatataat 240
 taacaatcaa aagaaagagg agaaaggaag ggaagcatta ctgggttact atgcacttgc 300
 gactgatttc ttggcttttt atcattttga actttatgga atacatcggc agccaaaacg 360
 cctcccgggg aaggcgccag cgaagaatgc atcctaactg tagtcaaggc tgccaaggag 420
 gctgtgcaac atgctcagat tacaatggat gtttgtcatg taagcccaga ctatTTTTTg 480
 ctctggaag aattggcatg aagcagattg gagtatgtct ctcttcatgt ccaagtggat 540
 attatggaac tcgatatcca gatataaata agtgtacaaa atgcaaagct gactgtgata 600
 cctgtttcaa caaaaatttc tgcacaaaat gtaaaagtgg attttactta caccttgaa 660
 agtgccttga caattgcccc gaagggtttg aagccaacaa ccatactatg gagtgtgtca 720
 gtattgtgca ctgtgaggtc agtgaatgga atccttggag tccatgcacg aagaagggaa 780
 aaacatgtgg cttcaaaaga gggactgaaa cacgggtccg agaaataata cagcatcctt 840
 cagcaaaggg taacctgtgt cccccaacaa atgagacaag aaagtgtaca gtgcaaagga 900

15

ES 2 564 794 T3

```

agaagtgtca gaagggagaa cgaggaaaaa aaggaagggga gaggaaaaga aaaaaaccta      960
ataaaggaga aagtaaagaa gcaatacctg acagcaaaaag tctggaatcc agcaaagaaa      1020
tcccagagca acgagaaaac aacagcagc agaagaagcg aaaagtccaa gataaacaga      1080
aatcggatc agtcagcact gtacactaga gggttccatg agattattgt agactcatga      1140
tgctgctatc tcaaccagat gcccaggaca ggtgctctag ccattaggac cacaaatgga      1200
catgtcagtt attgctctgt ctaaacaaca ttcccagtag ttgctatatt cttcatacaa      1260
gcatagttaa caacaagag ccaaaagatc aaagaagggga tactttcaga tggttgtctt      1320
gtgtgcttct ctgcattttt aaaagacaag acattcttgt acatattatc aataggctat      1380
aagatgtaac aacgaaatga tgacatctgg agaagaaaca tcttttcctt ataaaaatgt      1440
gttttcaagc tgttgtttta agaagcaaaa gatagttctg caaattcaaa gatacagtat      1500
cccttcaaaa caaataggag ttcaggggaag agaaacatcc ttcaaaggac agtggttgttt      1560
tgaccgggag atctagagag tgctcagaat tagggcctgg catttggaat cacaggattt      1620
atcatcacag aaacaactgt ttaagatta gttocatcac tctcatcctg tatttttata      1680
agaaacacaa gagtgcatac cagaattgaa tataccatat gggattggag aaagacaaat      1740
gtggaagaaa tcatagagct ggagactact tttgtgcttt acaaaactgt gaaggattgt      1800
ggtcacctgg aacaggtctc caatctatgt tagcactatg tggctcagcc tctgttacct      1860
cttggattat atatcaacct gtaaactatg gcctgtaact tacttccaaa aacaaaatca      1920
tacttattag aagaaaattc tgattttata gaaaaaaaaat agagcaagga gaatataaca      1980
tgtttgcaaa gtcatgtggt ttctttctca atgagggaaa aacaatttta ttacctgctt      2040
aatgggtccac ctggaactaa aagggatact attttctaac aaggatatc tagtagggga      2100
gaaagccacc acaataaata tatttgtaa tagtttttca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      2160
aaaaa                                          2165

```

```

<210> 21
<211> 272
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> PÉPTIDO
10 <222> (1)..(272)
<223> R-espondina-3 humana
<400> 21

```

```

Met His Leu Arg Leu Ile Ser Trp Leu Phe Ile Ile Leu Asn Phe Met
1           5           10           15

```

```

Glu Tyr Ile Gly Ser Gln Asn Ala Ser Arg Gly Arg Arg Gln Arg Arg
20           25           30

```

15

ES 2 564 794 T3

cacagcagcc cccgcgcccc cegtgccgcc gccgggacgt ggggcccttg ggcggtcggg 60
ccgcttgggg agcgcagcc cggatccggc tgcccagatg cggcgccac tctgcctgct 120
cctgctcgtc gccacgccc tggacatgct cgcctgaac cgaaggaaga agcaagtggg 180
cactggcctg gggggcaact gcacaggctg tatcatctgc tcagaggaga acggctgttc 240
cacctgccag cagaggctct tcctgttcat ccgccgggaa ggcatccgcc agtacggcaa 300
gtgctgcac gactgtcccc ctgggtactt cggcatccgc ggccaggagg tcaacaggtg 360
caaaaaatgt ggggccactt gtgagagctg cttcagccag gacttctgca tccggtgcaa 420
gaggcagttt tacttgtaca aggggaagtg tctgcccacc tgcccggcg gcactttggc 480
ccaccagaac acacgggagt gccaggggga gtgtgaactg ggtccctggg gcggctggag 540
cccctgcaca cacaatggaa agacctcggc ctcggcttgg ggctggaga gccgggtacg 600
agaggctggc cgggctgggc atgaggaggc agccacctgc cagggtcctt ctgagtcaag 660
gaaatgtccc atccagaggc cctgcccagg agagaggagc cccggccaga agaagggcag 720
gaaggaccgg cgcacagca aggacaggaa gctggaccgc aggctggacg tgaggcccg 780
ccagcccggc ctgcagccct gaccgcccgc tctcccact ctctggtcct agtccctggc 840
ccctgcacac ctctctctgc tccttctct cctctctct tactctttct cctctgtctt 900
ctccatttgt cctctcttct tttccacct tctatcattt ttctgtcagt ctaccttccc 960
ttctttttc ttttttattt cttttattt tccacctcc attctctct cctttctccc 1020
tccctccttc ccttcttcc tcttcttct cacttatctt ttatcttcc ttttcttct 1080
tctgtgttt ctctctgtcc ttcaccgat ccttctctct ctccctctc ttgtctcct 1140
ctcacacaca ctttaagagg gaccatgagc ctgtgccctc ccctgcagct ttctctatct 1200
acaacttaa gaaagcaaac atcttttccc aggccttcc ctgacccat ctttgcagag 1260
aaagggttc cagagggcaa agctgggaca cagcacagg gaatcctgaa ggccctgctt 1320
ctgctctggg ggaggctcca ggacctgag ctgtgagcac ctggttctct ggacagtccc 1380
cagaggccat ttccacagcc ttcagccacc agccacccc aggagctggc tggacaaggc 1440
tccagggtt ccagaggcct ggcttgaca cctccccag ctggccgtgg agggtcacaa 1500
cctggcctct ggggtggcag ccagccctgg agggcatcct ctgcaagctg cctgccacc 1560
tcatcggcac tccccacag gcctccctct catgggttcc atgcccctt tttccaagcc 1620
ggatcagggt agctgtcact gctgggggat ccacctgcc agcccagaag agggcactga 1680
aacggaaagg aaagctgaga ttatccagca gctctgttcc ccacctcagc gcttctgcc 1740
catgtgggga aacaggctct agaaggaagg ggcttgccca ggtcacaca ggaagccttc 1800

ES 2 564 794 T3

```

aggctctgct tctgcctgat ggctctgctc agcacattca cggtaggagag gagaatttgg 1860
gggtcacttg aggggggaaa tgtaggaat tgtgggtggg gagcaagga agatccgtgc 1920
actcgtccac acccaccacc aactcgtctg acaccacccc ccacacgctg acaccacccc 1980
ccacacttgc ccacacccat caccgactc gccacacccc accaccacac tgccccacac 2040
ccaccaccac actccccac acccaccacc aactcgtccc acaccacca ccagtgactt 2100
gagcatctgt gcttcgctgt gacgccctc gccctaggca ggaacgacgc tgggaggagt 2160
ctccaggtca gaccagctt ggaagcaagt ctgtcctcac tgcctatcct tctgccatca 2220
taacaccccc ttctgctct gctccccgga atcctcagaa acgggatttg tatttgccgt 2280
gactggttgg cctgaacacg tagggctccg tgactgggac agaatgggc aggagaagca 2340
agagtcggag ctccaagggg cccaggggtg gcctggggaa ggaagatggt cagcaggctg 2400
ggggagaggc tctaggtgat gaaatattac attcccgacc ccaagagagc acccaccctc 2460
agacctgcc tccacctggc agctggggag ccctggcctg aacccccccc tcccagcagg 2520
cccaccctct ctctgacttc cctgctctca cctccccgag aacagctaga gccccctct 2580
ccgcctggcc aggccaccag cttctcttct gcaaactttt gtgcctctga aatgctccgt 2640
tgttattgtt tcaagacctt aacttttttt taaaactttc ttaataaagg gaaaagaaac 2700
ttgtaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2722

```

```

<210> 23
<211> 234
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(234)
<223> R-espondina-4 humana
<400> 23

```

5
10

```

Met Arg Ala Pro Leu Cys Leu Leu Leu Leu Val Ala His Ala Val Asp
1           5           10           15

Met Leu Ala Leu Asn Arg Arg Lys Lys Gln Val Gly Thr Gly Leu Gly
          20           25           30

Gly Asn Cys Thr Gly Cys Ile Ile Cys Ser Glu Glu Asn Gly Cys Ser
          35           40           45

Thr Cys Gln Gln Arg Leu Phe Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gly Ile Arg
          50           55           60

Gln Tyr Gly Lys Cys Leu His Asp Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Gly Ile
65           70           75           80

```

15

ES 2 564 794 T3

Arg Gly Gln Glu Val Asn Arg Cys Lys Lys Cys Gly Ala Thr Cys Glu
85 90 95

Ser Cys Phe Ser Gln Asp Phe Cys Ile Arg Cys Lys Arg Gln Phe Tyr
100 105 110

Leu Tyr Lys Gly Lys Cys Leu Pro Thr Cys Pro Pro Gly Thr Leu Ala
115 120 125

His Gln Asn Thr Arg Glu Cys Gln Gly Glu Cys Glu Leu Gly Pro Trp
130 135 140

Gly Gly Trp Ser Pro Cys Thr His Asn Gly Lys Thr Cys Gly Ser Ala
145 150 155 160

Trp Gly Leu Glu Ser Arg Val Arg Glu Ala Gly Arg Ala Gly His Glu
165 170 175

Glu Ala Ala Thr Cys Gln Val Leu Ser Glu Ser Arg Lys Cys Pro Ile
180 185 190

Gln Arg Pro Cys Pro Gly Glu Arg Ser Pro Gly Gln Lys Lys Gly Arg
195 200 205

Lys Asp Arg Arg Pro Arg Lys Asp Arg Lys Leu Asp Arg Arg Leu Asp
210 215 220

Val Arg Pro Arg Gln Pro Gly Leu Gln Pro
225 230

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un polipéptido de R-espondina-2 o 3 o de un ácido nucleico de de R-espondina-2 o 3 para elaborar un medicamento destinado al tratamiento de un estado patológico que se beneficia de la promoción de la angiogénesis y/o de la vasculogénesis.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1 para promover la curación de heridas, la regeneración o el desarrollo de tejidos y órganos, el desarrollo embrionario y/o los procesos reproductivos, o para inhibir los procesos degenerativos, en particular los procesos degenerativos vasculares de tipo isquémico como la isquemia crítica de las extremidades, la isquemia cerebral o la enfermedad cardíaca isquémica.
- 15 3. Uso de un antagonista de R-espondina-2 o 3 para elaborar un medicamento destinado al tratamiento de un estado patológico que se beneficia de la inhibición de la angiogénesis y/o de la vasculogénesis, de manera que el antagonista de la R-espondina-2 o 3 es un anticuerpo anti-R-espondina-2 o anti-R-espondina-3, o una molécula antisentido o una molécula de ARNip.
- 20 4. Uso según la reivindicación 3, en que el antagonista de la R-espondina-2 o 3 es un anticuerpo anti-R-espondina-2.
5. Uso según la reivindicación 3, en que el antagonista de la R-espondina-2 o 3 es un anticuerpo anti-R-espondina-3.
- 25 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante policlonal, monoclonal, quimérico o humanizado, o un anticuerpo de cadena simple o un fragmento del mismo.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 30 9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 3-8 para la prevención o el tratamiento de enfermedades cuyo tratamiento implica la inhibición de la angiogénesis y/o de la vasculogénesis, en particular para el tratamiento del crecimiento tumoral, sobre todo de tumores sólidos, de la artritis reumatoide, aterosclerosis, estenosis, restenosis, retinopatía, degeneración macular o psoriasis.

35

Fig. 1

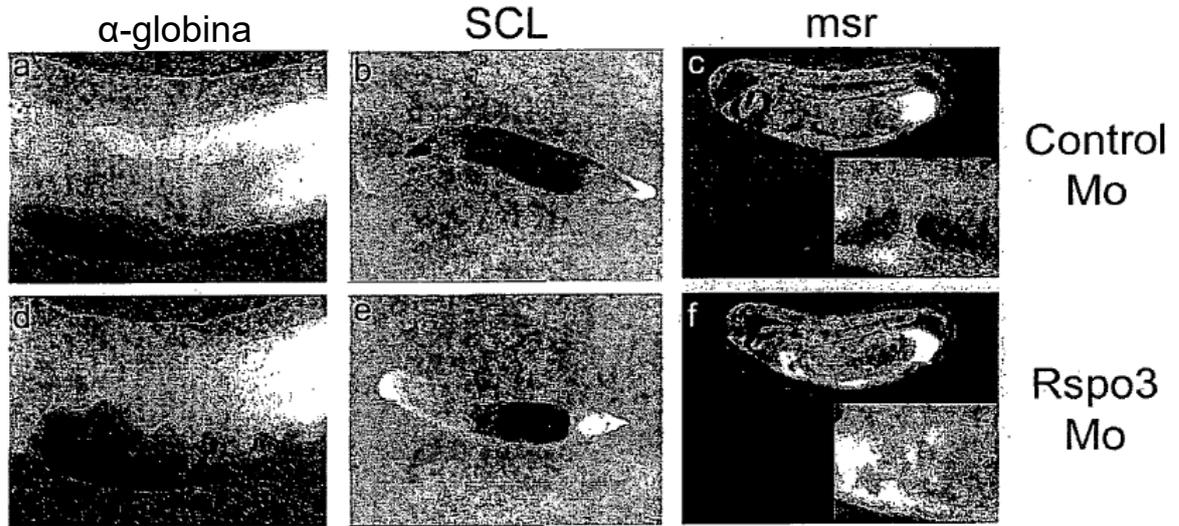
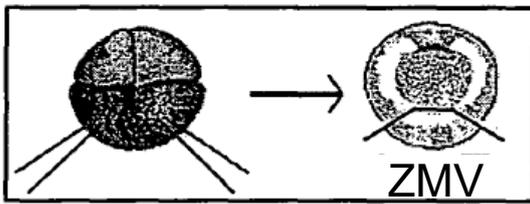
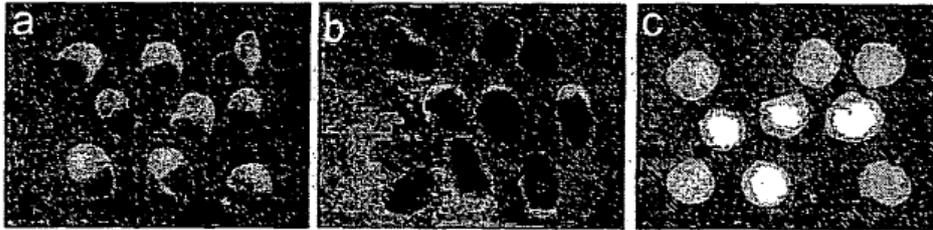


Fig. 2



Control Mo Rspo3 Mo +
Rspo3 Mo ARNm de Rspo2



α -globina

Fig. 3

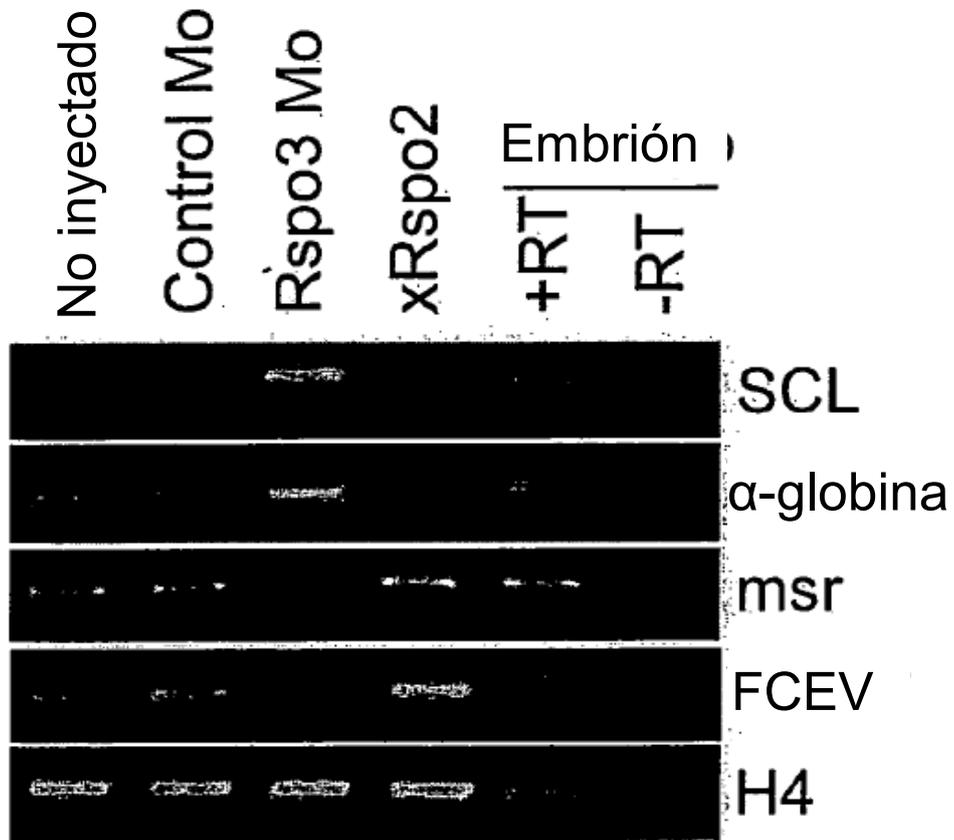


Figura 4

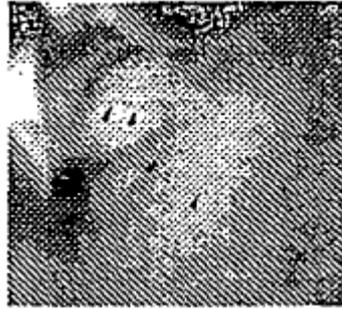


Fig. 5

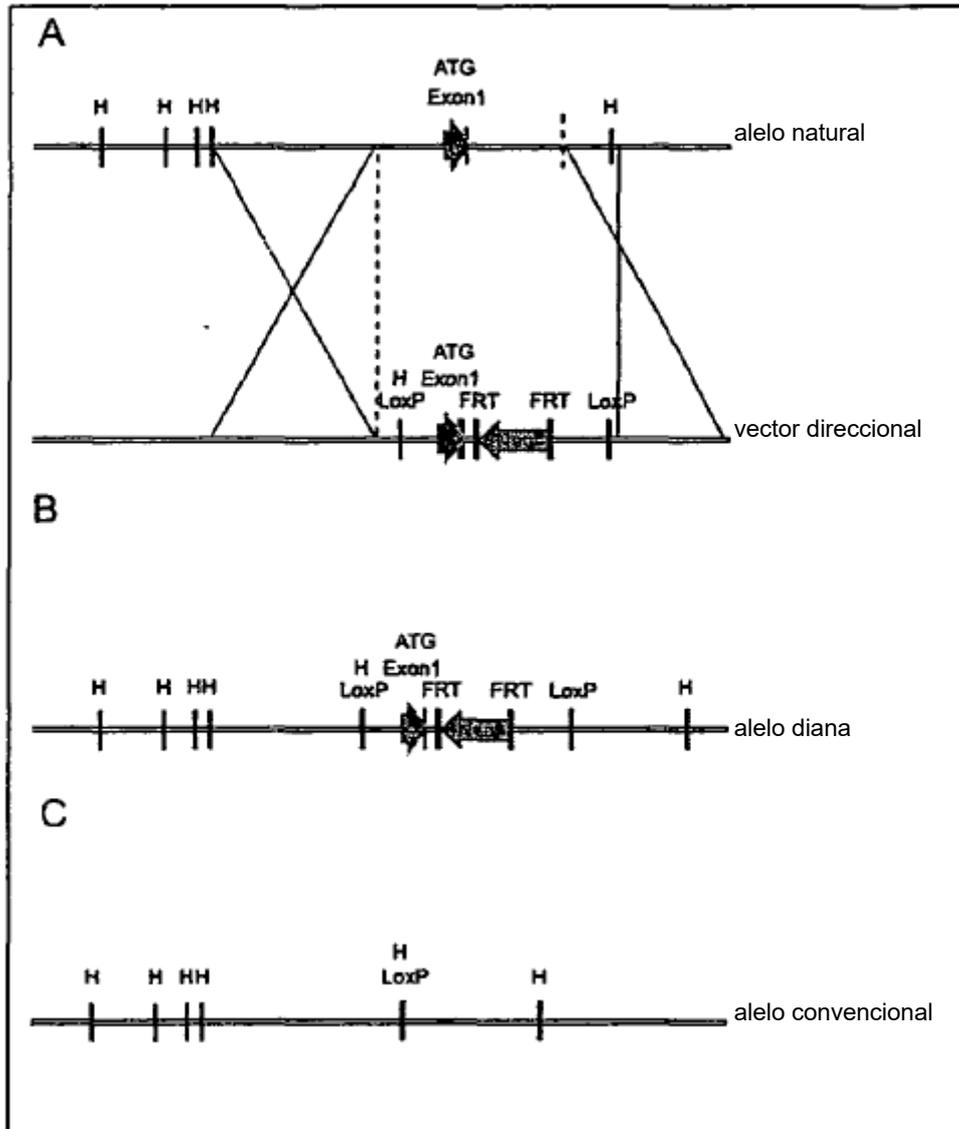


Fig. 6

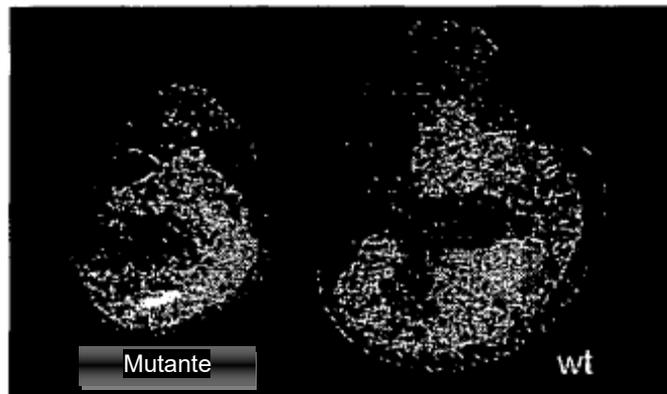


Figura 7

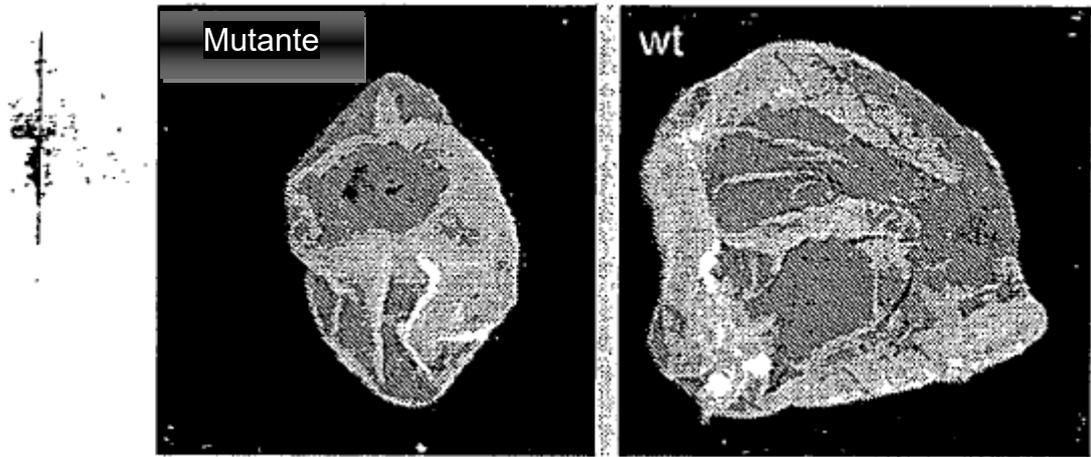


Figura 8

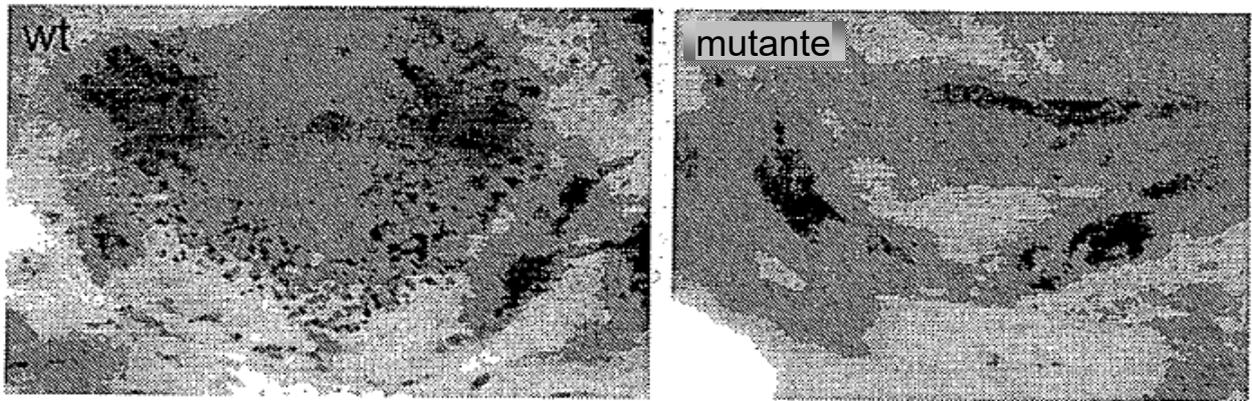


Fig. 9

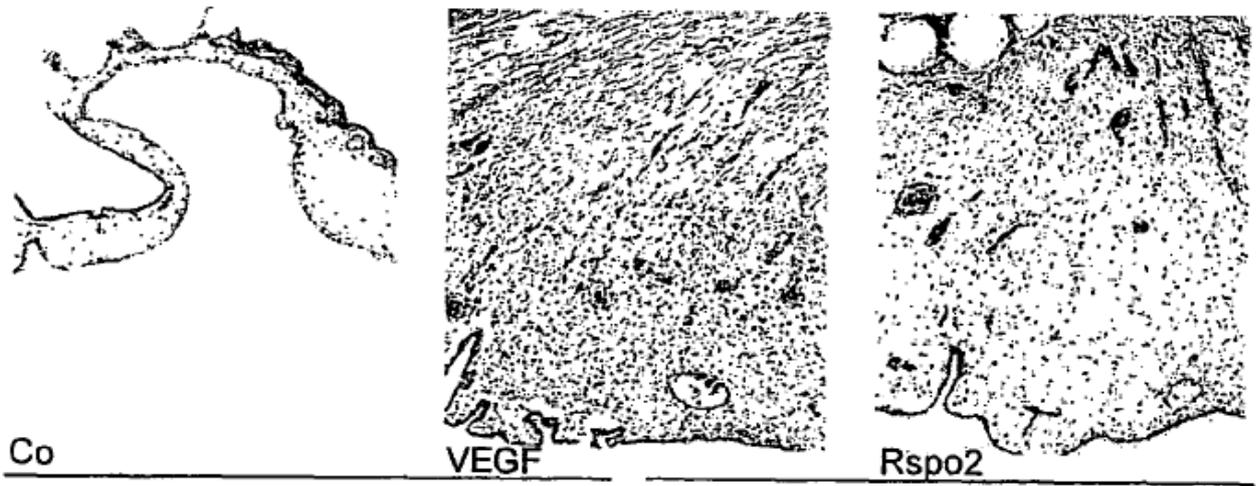


Figura 10

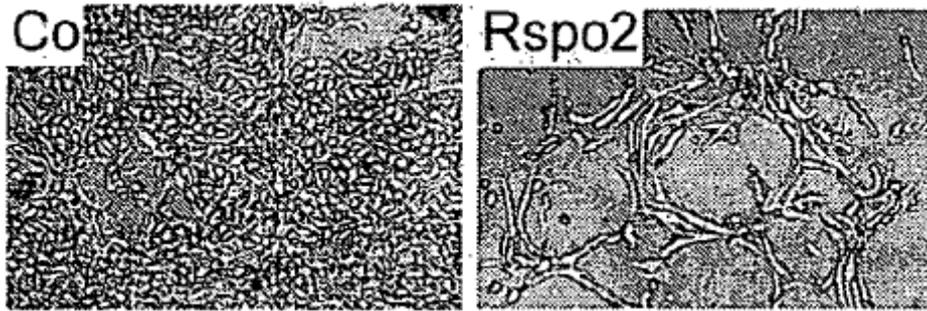


Fig. 11

