

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 643**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2010 E 10807590 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2515933**

54 Título: **Receptores de Rspo2 y Rspo3**

30 Prioridad:

23.12.2009 US 289734 P

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

09.06.2016

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(100.0%)**

**Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**NIEHRS, CHRISTOF;
GLINKA, ANDREY y
OKAWARA, BISEI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 573 643 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

Receptores de Rspo2 y Rspo3

5 La presente invención se refiere al hallazgo de que los sindecanos (Sdc) son receptores de R-espondina-2 (Rspo2) y R-espondina-3 (Rspo3). Por lo tanto la presente invención se refiere a la identificación de los moduladores de la actividad de Rspo2, Rspo3 y/o Sdc, determinando si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de modular la unión de un polipéptido de Rspo2 y/o de Rspo3 a un polipéptido de Sdc o la unión de un polipéptido de Rspo3 a un polipéptido de Glp.

10 Los factores de crecimiento Wnt juegan un papel esencial en el desarrollo y en las enfermedades y la comprensión de sus complejos mecanismos de señalización y de su participación biológica es de interés general (Nusse 2005; Grigoryan y otros, 2008). Los Wnt transmiten sus señales mediante diferentes receptores y vías distales (Angers y Moon 2009; MacDonald y otros, 2009; Tada y Kai 2009). Además de los Wnt las R-espondinas (Rspo1-4; espondina específica de la placa del techo) codifican una familia de proteínas secretadas en los vertebrados, las cuales pueden activar fuertemente la señalización mediante β -catenina (Kazanskaya y otros, 2004; Kim y otros, 2005; Kazanskaya y otros, 2007). Las R-espondinas presentan patrones específicos de expresión embrionaria y son frecuentemente coexpresadas con los Wnt e inducidas por ellos (Kamata y otros, 2004; Kazanskaya y otros, 2004; Nam y otros, 2006b), lo cual sugiere que sirven como moduladores de la respuesta positiva de las señales de Wnt locales. Están involucradas en la patronización y diferenciación embrionaria de ranas y ratones (Kazanskaya y otros, 2004; Kim y otros, 2005; Aoki y otros, 2006; Blaydon y otros, 2006; Kishigami y otros, 2006; Parma y otros, 2006). Las R-espondinas también intervienen en enfermedades humanas y constituyen una promesa terapéutica como potentes factores de crecimiento de células madre (Kim y otros, 2005; Blaydon y otros, 2006; Parma y otros, 2006; Zhao y otros, 2009). Para este estudio tiene importancia la Rspo3, que interviene en la vasculogénesis y angiogénesis del *Xenopus* y del ratón durante su desarrollo (Aoki y otros, 2006; Kazanskaya y otros, 2007).

Las R-espondinas actúan sinérgicamente con los Wnt y los Fzd y requieren la presencia de Wnt para activar la señalización por β -catenina (Nam y otros, 2006a; Kazanskaya y otros, 2007; Kim y otros, 2008b). Su implicación en otras vías Wnt, sobre todo en la vía Wnt/PCP, no ha sido referida. Los miembros de la familia de las R-espondinas codifican proteínas de aproximadamente 30 kDa que tienen una gran similitud estructural y una secuencia con una homología global del 60% aproximadamente. Todas ellas comprenden un dominio C-terminal de tromboespondina I y dos dominios N-terminales ricos en cisteína parecidos a la furina, que están presentes en ciertas proteasas y en factores de crecimiento tales como los IGF.

35 Otro grupo de correceptores de Wnt son los sindecanos, una familia de cuatro proteoglicanos transmembrana que controlan la proliferación, diferenciación, adhesión y migración celular (Bellin y otros, 2002; Bass y otros, 2009). Los sindecanos no actúan solamente como correceptores de varios factores de crecimiento, sino que también pueden transducir señales a través de su dominio intracelular por interacción con numerosos efectores. Los sindecanos se agrupan como respuesta a la unión al ligando, son endocitados y pueden controlar el transporte vesicular (Oh y otros, 1997; Tkachenko y Simons, 2002). Al contrario que en el ratón, los sindecanos son fundamentales para el desarrollo embrionario del *Xenopus* (Kramer y Yost, 2002; Munoz y otros, 2006; Matthews y otros, 2008; Kuriyama y Mayor, 2009; Olivares y otros, 2009). Para este estudio es de especial importancia el sindecano-4 (Sdc4), que modula la señalización por FGF y quimiocinas (Tkachenko y Simons, 2002; Charnaux y otros, 2005; Iwabusch y Goetinck, 2006). El Sdc4 promueve la migración celular en diversas células y en el *Xenopus* es esencial para los movimientos de gastrulación, la migración de la cresta neural y la inducción neural al promover la señalización por Wnt/PCP y FGF (Munoz y otros, 2006; Matthews y otros, 2008; Kuriyama y Mayor, 2009).

Aquí se demuestra que los sindecanos (Sdc), es decir el sindecano-1 (Sdc1), el sindecano-2 (Sdc2), el sindecano-3 (Sdc3) y el sindecano-4 (Sdc4), actúan como receptores de R-espondina-2 (Rspo2) y R-espondina-3 (Rspo3) para promover la señalización por Wnt. En cambio no se detectó ninguna unión de sindecanos a R-espondina-1 (Rspo1) y a R-espondina-4 (Rspo4). Anteriormente no se había señalado ninguna interacción entre la Rspo2 o Rspo3 y los sindecanos. Por lo tanto la presente invención revela una vía adicional para la señalización de Rspo2 y Rspo3 que ofrece nuevos usos para la investigación diagnóstica y terapéutica. Además demostramos mediante ensayos de ganancia y pérdida funcional que el Sdc4 y la Rspo3 interactúan funcionalmente para inducir la señalización por Wnt/PCP durante la gastrulación y la morfogénesis del cartílago de cabeza en el *Xenopus*. El estudio revela un nuevo mecanismo de acción de la R-espondina-2 y de la R-espondina-3, el cual demuestra que su señalización es mediada por sindecanos, p.ej. por el sindecano-4, y es necesaria para la activación de Wnt/PCP.

Asimismo se demuestra que las R-espondinas, en particular la R-espondina-3, se unen a glipicanos, en particular al glipicano-1, al glipicano-2, al glipicano-3, al glipicano-4, al glipicano-5 y al glipicano-6.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método de identificación de un modulador de la actividad de R-espondina-2 (Rspo2) y/o R-espondina-3 (Rspo3) y/o de sindecano (Sdc), es decir la actividad de Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o Sdc4, que consiste en evaluar y/o detectar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de modular la unión de un polipéptido de Rspo2 o de Rspo3 a un polipéptido de Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o Sdc4, en comparación con un control.

Tal como se usan aquí, los términos “polipéptido de R-espondina-2” o “polipéptido de Rspo2” se refieren según la presente invención a polipéptidos que codifican R-espondina-2, la cual puede proceder de mamíferos o de otros organismos vertebrados.

5 Preferiblemente el polipéptido de R-espondina-2 es R-espondina-2 humana. La secuencia de aminoácidos del polipéptido de R-espondina-2 humana figura en el banco de genes Gene Bank con el nº de acceso NM_178565. Una secuencia particular de la R-espondina-2 humana aparece en la SEQ ID NO:3.

10 Tal como se usan aquí, los términos “polipéptido de R-espondina-3” o “polipéptido de Rspo3” se refieren según la presente invención a polipéptidos que codifican R-espondina-3, la cual puede proceder de mamíferos o de otros organismos vertebrados.

15 Preferiblemente el polipéptido de R-espondina-3 es R-espondina-3 humana. La secuencia de aminoácidos del polipéptido de R-espondina-3 humana figura en el banco de genes Gene Bank con el nº de acceso BC022367. Una secuencia particular de la R-espondina-3 humana aparece en la SEQ ID NO:1.

Otros ejemplos de secuencias de Rspo2 o Rspo3 son las secuencias polipéptidas de Rspo2 o Rspo3 de *Xenopus*, p.ej. de *Xenopus tropicalis* y *Xenopus laevis*, o de *Mus musculus*.

20 Aquí, además, los polipéptidos de Rspo2 o Rspo3 se definen 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 Rspo2 o Rspo3 humano, a lo largo de toda ella (Kazanskaya y otros, 2004, Dev. Cell 7, 525-534).

25 Tal como se usa aquí, el término “polipéptido de sindecano” o “polipéptido de Sdc” se refiere según la presente invención a polipéptidos que codifican sindecano-1, sindecano-2, sindecano-3 o sindecano-4, los cuales pueden proceder de mamíferos o de otros organismos vertebrados.

30 Preferiblemente el polipéptido de sindecano es sindecano-1, sindecano-2, sindecano-3 o sindecano-4 humano. Con mayor preferencia el polipéptido de sindecano es sindecano-4. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de Sdc1, Sdc2, Sdc3 y Sdc4 humanos figuran en el banco de genes Gene Bank con los nºs de acceso NM_002997 (Sdc1), NM_002998 (Sdc2), NM_014654 (Sdc3), y NM_002999 (Sdc4). Las secuencias particulares de los Sdc1, Sdc2, Sdc3 y Sdc4 humanos son las siguientes: secuencia de aminoácidos del sindecano-1 humano (SEQ ID NO:5); secuencia de aminoácidos del sindecano-2 humano (SEQ ID NO:7); secuencia de aminoácidos del sindecano-3 humano (SEQ ID NO:9); secuencia de aminoácidos del sindecano-4 humano (SEQ ID NO:11).

35 Otros ejemplos de secuencias de sindecano son las secuencias polipéptidas de sindecano procedente de *Xenopus*, p.ej. de *Xenopus tropicalis* y *Xenopus laevis*, o de *Mus musculus*.

40 Aquí, además, los polipéptidos de Sdc se definen como polipéptidos que revelan 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 Sdc humano, a lo largo de toda ella.

45 Tal como se usa aquí, el término “polipéptido de glipicano” o “polipéptido de Glp” se refiere según la presente invención a polipéptidos que codifican glipicano-1, glipicano-2, glipicano-3, glipicano-4, glipicano-5 o glipicano-6, los cuales pueden proceder de mamíferos o de otros organismos vertebrados.

50 El polipéptido de glipicano puede ser Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 o Glp6 humano. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 o Glp6 humanos figuran en el banco de genes Gene Bank con los nºs de acceso NP_002072.2 (Glp1), NP_689955.1 (Glp2), NP_001158089.1 o NP_001158090.1 (Glp3), NP_001439.2 (Glp4), NP_004457.1 (Glp5) y NP_005699.1 (Glp6).

55 Otros ejemplos de secuencias de glipicano son las secuencias polipéptidas de glipicano procedente de *Xenopus*, p.ej. de *Xenopus tropicalis* y *Xenopus laevis*, o de *Mus musculus*.

El término “polipéptido” incluye proteínas de longitud completa, moléculas proteicas, fragmentos de proteínas, proteínas de fusión, péptidos, oligopéptidos y variantes, derivados, análogos o equivalentes funcionales de los mismos.

60 El propio producto genético de Rspo2, Rspo3 o Sdc (es decir Sdc1, Sdc2, Sdc3 o Sdc4) o Glp (es decir Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 o Glp6) puede contener deleciones, adiciones o sustituciones de restos de aminoácidos dentro de la secuencia de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp que constituyen un cambio silencioso y por consiguiente se mantiene la capacidad de transducción de señales importantes para producir un equivalente funcional de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp. Estas sustituciones de aminoácidos se pueden hacer basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o en la naturaleza anfipática de los restos implicados. Por 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 polares de cabeza no cargados, que tienen valores similares de hidrofilia incluyen los siguientes: leucina, isoleucina, valina; glicina, alanina; asparagina, glutamina; serina, treonina; fenilalanina, tirosina.

5 Tal como se usan aquí, los términos “ácido nucleico de R-espondina-2 o ácido nucleico de Rspo2” se refieren a secuencias de ácido nucleico que codifican R-espondina-2, la cual puede proceder de mamíferos o de otros organismos vertebrados. Preferiblemente el ácido nucleico de Rspo2 codifica Rspo2 humana. La secuencia de ácido nucleico de la R-espondina-2 humana figura en el banco de genes Gene Bank con el nº de acceso NM 178565. Un
10 ácido nucleico particular de la R-espondina-2 humana figura en la SEQ ID NO:4.

15 Tal como se usan aquí, los términos “ácido nucleico de R-espondina-3 o ácido nucleico de Rspo3” se refieren a secuencias de ácido nucleico que codifican R-espondina-3, la cual puede proceder de mamíferos o de otros organismos vertebrados. Preferiblemente el ácido nucleico de Rspo3 codifica Rspo3 humana. La secuencia de ácido nucleico de la R-espondina-3 humana figura en el banco de genes Gene Bank con el nº de acceso BC 022367. Un ácido nucleico particular de la R-espondina-3 humana figura en la SEQ ID NO:2.

20 Otros ejemplos de ácidos nucleicos de Rspo2 y Rspo3 son aquellos que codifican Rspo2 o Rspo3 de *Xenopus*, p.ej. de *Xenopus tropicalis* y *Xenopus laevis*, o de *Mus musculus*.

25 Tal como se emplean aquí, los términos “ácido nucleico de sindecano” o “ácido nucleico de Sdc” se refieren a secuencias de ácido nucleico que codifican sindecano-1, sindecano-2, sindecano-3 o sindecano-4, los cuales pueden proceder de mamíferos o de otros organismos vertebrados. Preferiblemente el ácido nucleico de sindecano codifica un sindecano humano. Las secuencias de ácido nucleico de los sindecanos humanos figuran en el banco de genes Gene Bank con los nºs de acceso NM_002997 (Sdc1), NM_002998 (Sdc2), NM_014654 (Sdc3) y NM_002999 (Sdc4). Las secuencias particulares para el ácido nucleico de sindecano humano son las siguientes: secuencia de ácido nucleico de sindecano-1 humano (SEG ID NO:6), secuencia de ácido nucleico de sindecano-2 humano (SEQ ID NO:8), secuencia de ácido nucleico de sindecano-3 humano (SEQ ID NO:10), secuencia de ácido nucleico de sindecano-4 humano (SEQ ID NO:12).

30 Otros ejemplos de ácidos nucleicos de sindecano son aquellos que codifican los sindecanos 1, 2, 3 o 4 de *Xenopus*, p.ej. de *Xenopus tropicalis* y *Xenopus laevis*, o de *Mus musculus*.

35 Tal como se emplean aquí, los términos “ácido nucleico de glipicano” o “ácido nucleico de Glp” se refieren a secuencias de ácido nucleico que codifican Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 o Glp6, los cuales pueden proceder de mamíferos o de otros organismos vertebrados. Preferiblemente el ácido nucleico de Glp codifica un Glp humano. Las secuencias de ácido nucleico de los glipicanos humanos figuran en el banco de genes Gene Bank con los nºs de acceso NM_002081.2 (Glp1), NM_152742.1 (Glp2), NM_01164617.1 o NM_001164618.1 (Glp3), NM_001448.2 (Glp4), NM_004466.4 (Glp5) y NM_005708.3 (Glp6).

40 Otros ejemplos de ácidos nucleicos de Glp son aquellos que codifican los glipicanos -1, 2, 3, 4, 5 i 6 de *Xenopus*, p.ej. de *Xenopus tropicalis*, o de *Mus musculus*.

45 Aquí, además, los ácidos nucleicos de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp se definen como moléculas seleccionadas entre

- (a) moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp, p.ej. que codifican polipéptidos de Rspo2, Rspo3, Sdc1, Sdc2, Sdc3, Sdc4, Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 o Glp6 humano,
 (b) moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones estrictas con una molécula de ácido nucleico de (a) y/o con una molécula de ácido nucleico complementaria de ella,
 50 (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 que es al menos un 40%, preferiblemente al menos un 60%, con mayor preferencia al menos un 80%, y sobre todo al menos un 90% idéntico en toda su longitud a un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico de (a).

55 Las moléculas de ácido nucleico pueden ser p.ej. moléculas de ADN o moléculas de ARN. Las moléculas de ácido nucleico utilizables conforme a la presente invención pueden incluir delecciones, adiciones o sustituciones de restos de distintos nucleótidos, dando lugar a una secuencia codificadora del mismo producto genético o de un equivalente funcional suyo.

60 Tal como se utilizan aquí, los términos “reguladores” o “efectores” o “moduladores” de los polipéptidos de Rspo2, Rspo3, Sdc y/o Glp o de los ácidos nucleicos de Rspo2, Rspo3, Sdc y/o Glp son intercambiables y cualquiera de ellos se puede emplear para referirse a anticuerpos, péptidos, moléculas orgánicas o inorgánicas de bajo peso molecular y otras fuentes de sustancias con potencial actividad biológica capaces de modular polipéptidos de Rspo2, Rspo3, Sdc y/o Glp, es decir, de unir Rspo2 o Rspo3 a un polipéptido de Sdc, es decir de Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o
 65

Sdc4 y/o a un polipéptido de Glp, es decir de Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 o Glp6. Dichos reguladores, efectores o moduladores pueden ser de origen natural o producidos sintéticamente.

Tal como se usa aquí, el término “agonista” se refiere a reguladores, efectores o moduladores de polipéptidos de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp que estimulan la unión de Rspo2 o Rspo3 a un Sdc, p.ej. Sdc1, Sdc2, Sdc3 o Sdc4, o a un Glp, p.ej. Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 o Glp6.

Tal como se usa aquí, el término “antagonista” se refiere a reguladores, efectores o moduladores de polipéptidos de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp o de ácidos nucleicos de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp que inhiben la unión de Rspo2 o Rspo3 a un Sdc, p.ej. Sdc1, Sdc2, Sdc3 o Sdc4, o a un Glp, p.ej. Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 o Glp6, y por tanto inhiben, reducen o evitan los procesos relacionados con la hiperactividad de Rspo2, Rspo3, Sdc y/o Glp.

Como ejemplos de antagonistas adecuados cabe mencionar las formas mutadas o truncadas de Rspo2, Rspo3 o de un Sdc, p.ej. Sdc1, Sdc2, Sdc3 o Sdc4, o de un Glp, p.ej. Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 o Glp6, que tienen un efecto negativo dominante; polipéptidos de unión de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp, p.ej. anticuerpos anti-Rspo2, anti-Rspo3 o anti-Sdc, es decir anti-Sdc1, anti-Sdc2, anti-Sdc3 o anti-Sdc4 o anti-Glp, es decir anti-Glp1, anti-Glp2, anti-Glp3, anti-Glp4, anti-Glp5 o anti-Glp6, incluyendo anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpo que contienen al menos un sitio de unión de antígeno. Otros ejemplos de antagonistas son los ácidos nucleicos capaces de inhibir la traducción, transcripción, expresión y/o actividad de Rspo2, Rspo3 o Sdc, es decir Sdc1, Sdc2, Sdc3 o Sdc4, o Glp, es decir Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 o Glp6, 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 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.

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 de un polipéptido de Rspo2 o Rspo3 al receptor, se prefieren especialmente para fines diagnósticos y terapéuticos.

Tal como se usa aquí - empleado respecto a la expresión de un polipéptido de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp o de un ácido nucleico de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp - el término “modificado” se refiere a un polipéptido de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp o a un ácido nucleico de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp que se expresa a un nivel diferente (p.ej. a un nivel de expresión superior) en un sitio distinto (p.ej. en un tipo de célula diferente de aquella donde suele expresarse) o en un tiempo distinto (p.ej. en una situación en que expresa constitutivamente más que como respuesta a una señal concreta). En particular una célula o un organismo transgénico no humano que muestra una expresión modificada de un ácido nucleico de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp o de un polipéptido de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp puede exhibir una expresión permanentemente modificada (debida p.ej. a cambios en el genoma de la célula o del organismo) o temporalmente modificada (debida p.ej. a la transfección transitoria de una secuencia de ARNm).

Tal como se usa aquí, el término “tratar” o “tratamiento” se refiere a una intervención realizada con la intención de impedir o alterar el desarrollo de la patología y por tanto aliviar un trastorno, enfermedad o afección, incluyendo uno o más síntomas de tal trastorno o enfermedad. Por tanto “tratar” se refiere tanto al procedimiento terapéutico como a las medidas profilácticas o 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”.

Tal como se usa aquí - empleado para describir la interacción entre un polipéptido de R-espondina (en concreto Rspo2 o Rspo3) y un sindecano (en concreto Sdc1, Sdc2, Sdc3 o Sdc4) o la interacción entre un polipéptido de R-espondina y un glipicano (en concreto Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 o Glp6) - el término “unión” se refiere a una interacción reversible entre dicha R-espondina y dicho sindecano. El término incluye interacciones entre la parte interna de una proteína y las modificaciones post-translacionales que puede haber en una segunda proteína. En particular, haciendo referencia a las interacciones aquí reveladas, incluye la interacción entre una R-espondina y un sindecano que va unido a cadenas de glicosaminoglicano (GAG). Esta interacción puede conllevar la unión a los GAG del sindecano. En una forma de ejecución preferida se refiere a la interacción entre Rspo3 y Sdc4, incluyendo los GAG unidos a éste. Esta interacción puede comportar la unión a los GAG del Sdc4. Independientemente del mecanismo de interacción entre las R-espondinas 2 o 3 y los sindecanos 1, 2, 3 o 4, un especialista en la materia reconocerá la necesidad de usar en cualquier análisis una proteína que esté correctamente plegada y contenga todas las modificaciones post-translacionales que son básicas para la actividad. Esto es así, independientemente de que la proteína esté purificada a partir de su entorno natural o expresada de una forma heteróloga. Los medios para asegurar que la(s) proteína(s) contenga(n) todas las modificaciones post-translacionales necesarias corresponden a las capacidades del especialista en la materia y además están indicados en los ejemplos incluidos. Asimismo, al realizar un ensayo funcional, un especialista en la materia reconocerá la necesidad de utilizar en dicho ensayo una proteína activa, incluyendo todas las modificaciones post-translacionales requeridas.

Preferiblemente la unión entre un polipéptido de R-espondina (Rspo2 o Rspo3) y un sindecano (Sdc1, Sdc2, Sdc3 o Sdc4) implica una constante de unión ≤ 10 nM, ≤ 5 nM, ≤ 2 nM o ≤ 1 nM. La constante de unión puede determinarse, sin exclusividad, por los métodos descritos en los ejemplos incluidos.

5 El término "glicosaminoglicano" (abreviado "GAG") se usa aquí para referirse a una clase de polisacáridos lineales no ramificados que comprenden una unidad disacárida repetida constituida normalmente por hexosamina y una hexosa o un ácido hexurónico. En algunas formas de ejecución la unidad disacárida repetida lleva una glucosamina o galactosamina seguida de un ácido idurónico o glucurónico. Los glicosaminoglicanos tienen generalmente una elevada carga negativa y unas características especiales que contribuyen a sus diversas funciones. Por ejemplo, en
10 una configuración extendida los glicosaminoglicanos contribuyen a la viscosidad del fluido del cual forman parte. Su rigidez aporta una integridad estructural que es fundamental para su papel en la migración celular. Los glicosaminoglicanos son los heteropolisacáridos más abundantes en el cuerpo y forman un componente principal de la matriz extracelular, así como una parte importante de las glicoproteínas existentes normalmente en la superficie celular. Los glicosaminoglicanos suelen unirse a las proteínas mediante enlace covalente, formando junto con la proteína un
15 proteoglicano.

Como ejemplos de glicosaminoglicanos cabe citar, sin limitarse a ellos: sulfato de condroitina, dermatán sulfato, keratán sulfato, heparina, heparán sulfato y hialuronano. Los expertos en la materia reconocerán que las estructuras químicas son variables en un tipo de glicosaminoglicano (tal como la heparina). Aunque los glicosaminoglicanos son reconocibles por un tema general de estructura química, un glicosaminoglicano de un determinado tipo existe en
20 múltiples formas y varía por la composición de sus unidades disacáridas. También varían por la extensión y el patrón de sulfatación a lo largo de la molécula. No obstante el término "glicosaminoglicano" es entendido por los expertos en la materia como referido a una clase concreta de polisacáridos, del tipo arriba descrito.

25 Tal como se usa aquí, el término "morfolino" o "Mo" se refiere a una molécula citada a veces como oligonucleótido de morfolino fósforodiamidato, que se utiliza para modificar la expresión genética. Dichos morfolinos son moléculas sintéticas producto de un rediseño de la estructura del ácido nucleico natural. De normalmente 15-50, p.ej. 25 bases de longitud, se unen a secuencias complementarias de ARN por apareamiento estándar de bases de ácido nucleico. Estructuralmente la diferencia entre morfolinos y ADN es que, aunque los morfolinos tienen bases estándar de ácido
30 nucleico, estas bases están unidas a anillos de morfolino en lugar de ir unidas a anillos de desoxirribosa y están conectadas mediante grupos fósforodiamidato en vez de fosfatos. Los morfolinos se usan mayoritariamente como oligómeros de cadena sencilla, aunque también se pueden usar heterodúplex formados por una hebra de morfolino y una hebra de ADN complementaria en combinación con reactivos catiónicos de liberación citosólica. Los oligómeros (oligos) de morfolino son una tecnología antisentido usada para bloquear el acceso de otras moléculas a secuencias específicas del ácido nucleico. Los morfolinos bloquean regiones pequeñas (menos de 25 bases) de las superficies de apareamiento de bases del ácido ribonucleico (ARN). Los morfolinos suelen utilizarse para la función silenciadora de genes, lo cual se logra impidiendo que las células formen una proteína diana o modificando el corte y empalme del pre-ARNm.

40 Los presentes inventores han encontrado que el sindecano-1 (Sdc1), el sindecano-2 (Sdc2), el sindecano-3 (Sdc3) y el sindecano-4 (Sdc4) son receptores de R-espondina-2 (Rspo2) y R-espondina-3 (Rspo3) y que juntos activan la señalización por Wnt/PCP. En los embriones de *Xenopus* el Sdc4 y la Rspo3 son fundamentales para los procesos impulsados por Wnt/PCP, como p.ej. los movimientos de gastrulación. En las gástrulas se requiere la cooperación de Rspo3 y Wnt-5a para la señalización de PCP mediada por Sdc4. Por tanto los presentes inventores concluyen que la
45 señalización de Rspo2 o Rspo3 está mediada por Sdc1, Sdc2, Sdc3 o Sdc4 y es necesaria para la activación de Wnt/PCP.

Aquí también se describe que los glicoproteínas Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 y Glp6 son receptores de R-espondina-3.

50 Por tanto la señalización de Rspo3 puede ser, al menos en parte, mediada por Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 o Glp6.

Una forma de ejecución de la presente invención hace referencia a nuevos métodos y sistemas de evaluación y/o detección basados en la determinación de la unión de un polipéptido de Rspo2 o Rspo3 a un polipéptido de Sdc, es decir de Sdc1, Sdc2, Sdc3 o Sdc4. Así la presente invención ofrece un método para identificar un modulador de la
55 actividad de R-espondina-2 (Rspo2) o R-espondina-3 (Rspo3) y/o de sindecano-1 (Sdc1), sindecano-2 (Sdc2), sindecano-3 (Sdc3) o sindecano-4 (Sdc4), que consiste en evaluar y/o detectar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de modular la unión de un polipéptido de Rspo2 o Rspo3 a un polipéptido de Sdc1, Sdc2, Sdc3 o Sdc4 en comparación con un control. En una forma de ejecución concreta la presente invención proporciona dicho método, consistente en evaluar y/o detectar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de modular la unión de un
60 polipéptido de Rspo3 a Sdc4. En otra forma de ejecución concreta la presente invención proporciona un método que consiste en evaluar y/o detectar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de modular la unión de Rspo2 o Rspo3 a las cadenas de GAG del Sdc1, Sdc2, Sdc3 o Sdc4 que lleva cadenas de GAG unidas a él. En particular se prefiere la unión Rspo3 a Sdc4 con cadenas de GAG unidas a él.

65 También se describen métodos y sistemas de evaluación y/o detección basados en la determinación de la unión de un polipéptido de Rspo2 o Rspo3 a un polipéptido de Glp, es decir de Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 o Glp6. Por lo

tanto la presente invención proporciona un método para identificar un modulador de la actividad de R-espondina-3 (Rspo3) y/o de glipicano-1 (Glp1), glipicano-2 (Glp2), glipicano-3 (Glp3), glipicano-4 (Glp4), glipicano-5 (Glp5) o glipicano-6 (Glp6), que consiste en evaluar y/o detectar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de modular la unión de un polipéptido de Rspo3 a un polipéptido de Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 o Glp6 en comparación con un control.

En una forma de ejecución de este aspecto, el método consiste en evaluar y/o detectar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de estimular la unión. En esta forma de ejecución el compuesto de ensayo es un agonista que tiene la capacidad de incrementar la unión de un polipéptido de Rspo2 o Rspo3 a un Sdc en comparación con un control, como p.ej. una medición de referencia en ausencia del compuesto de ensayo.

Por consiguiente, en una forma de ejecución la presente invención proporciona un método para detectar un agonista de Rspo2, Rspo3 y/o de Sdc, que consiste en:

- (a) poner en contacto Rspo2 o Rspo3 con un Sdc seleccionado entre Sdc1, Sdc2, Sdc3, Sdc4 y combinaciones de ellos, en presencia del compuesto de ensayo;
- (b) poner en contacto Rspo2 o Rspo3 con el Sdc en ausencia del compuesto de ensayo; y
- (c) comparar la unión entre Rspo2 o Rspo3 y el Sdc según (a) y (b), de modo que un incremento de la unión en presencia del compuesto indica que éste es un agonista de Rspo2, Rspo3 y/o de Sdc.

En otra forma de ejecución el método consiste en evaluar y/o detectar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de inhibir la unión. En esta forma de ejecución el compuesto de ensayo es un antagonista que tiene la capacidad de inhibir la unión de un polipéptido de Rspo2 o Rspo3 a un polipéptido de Sdc en comparación con un control, como p.ej. una medición de referencia en ausencia del compuesto de ensayo.

Por lo tanto, en una forma de ejecución la presente invención proporciona un método para detectar un antagonista de Rspo2, Rspo3 y/o de Sdc, que consiste en:

- (a) poner en contacto Rspo2 o Rspo3 con un Sdc seleccionado entre Sdc1, Sdc2, Sdc3, Sdc4 y combinaciones de ellos, en presencia del compuesto de ensayo;
- (b) poner en contacto Rspo2 o Rspo3 con el Sdc en ausencia del compuesto de ensayo; y
- (c) comparar la unión entre Rspo2 o Rspo3 y el Sdc según (a) y (b), de modo que una disminución de la unión en presencia del compuesto indica que éste es un antagonista de Rspo2, Rspo3 y/o de Sdc.

En otra forma de ejecución el método consiste en evaluar y/o detectar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de intensificar o inhibir la unión de un copartícipe de interacción conocida con un Sdc seleccionado entre Sdc1, Sdc2, Sdc3, Sdc4 y combinaciones de ellos, en unas condiciones en que ya esté unido con Rspo2 o Rspo3. En esta forma de ejecución el compuesto de ensayo puede intensificar o inhibir la unión de este copartícipe de interacción conocida a un polipéptido de Sdc en comparación con un control, como p.ej. una medición de referencia en ausencia del compuesto de ensayo. Un ejemplo de tal copartícipe de interacción conocida con Sdc4 es el FGF (Tkachenko y Simons 2002).

El método puede implicar la determinación de la unión en un sistema libre de células, p.ej. la determinación de la unión entre polipéptidos de Rspo2 o Rspo3 y Sdc total o parcialmente purificados. En esta forma de ejecución la unión se puede determinar inmovilizando uno de los componentes en una fase sólida, p.ej. en un pocillo de una placa de microvaloración o en un microchip, y poniendo en contacto la fase sólida con el otro componente en forma no inmovilizada, con la inclusión opcional de un grupo indicador idóneo, en presencia de un compuesto de ensayo.

Cuando el ensayo de unión se efectúa en un sistema libre de células debe asegurarse que todas las proteínas estén correctamente plegadas y que tengan las modificaciones post-transcripcionales adecuadas, incluyendo, sin limitarse a ella, la presencia de glicosaminoglicanos (GAG). El especialista en la materia conoce sistemas celulares como p.ej. los eucariotas, en particular sistemas celulares de mamíferos y métodos de purificación que lo aseguran, incluyendo, sin limitarse a ellos, los sistemas celulares y los métodos de purificación descritos en los ejemplos incluidos.

En otra forma de ejecución la unión se determina en un sistema celular, p.ej. en una célula recombinante o en un organismo transgénico no humano, p.ej. en una célula u organismo que sobreexpresa Rspo2 o Rspo3 y/o al menos un Sdc elegido entre Sdc1, Sdc2, Sdc3 y Sdc4. En esta forma de ejecución la unión se puede determinar midiendo directamente los complejos Rspo2/Sdc o Rspo3/Sdc o por medición indirecta, p.ej. de la activación o inhibición de la señalización por Rspo2/Sdc o Rspo3/Sdc, p.ej. la cascada Wnt/PCP.

Al determinar la unión en un sistema celular, el especialista en la materia deberá asegurarse de que la maquinaria celular del huésped sea capaz de proporcionar las modificaciones post-transcripcionales correctas, incluyendo, sin limitarse a ella, la presencia de glicosaminoglicanos (GAG). El especialista en la materia conoce sistemas celulares que lo garantizan, como p.ej. los eucariotas, en particular sistemas celulares de mamíferos, incluyendo, sin limitarse a ellos, los sistemas celulares descritos en los ejemplos incluidos.

Por consiguiente, en una forma de ejecución la presente invención proporciona un método para detectar un agonista de Rspo2 o Rspo3 y/o de Sdc, que consiste en:

- (a) poner en contacto Rspo2 o Rspo3 con un Sdc seleccionado entre Sdc1, Sdc2, Sdc3, Sdc4 y combinaciones de ellos, en presencia del compuesto de ensayo;
- (b) poner en contacto Rspo2 o Rspo3 con el Sdc en ausencia del compuesto de ensayo; y
- (c) comparar la actividad de Rspo2 o Rspo3 y del Sdc entre (a) y (b), de modo que un incremento de actividad en presencia del compuesto indica que éste es un agonista de Rspo2 o Rspo3 y/o de Sdc.

Por lo tanto, en una forma de ejecución la presente invención proporciona un método para detectar un antagonista de Rspo2 o Rspo3 y/o de Sdc, que consiste en:

- (a) poner en contacto Rspo2 o Rspo3 con un Sdc seleccionado entre Sdc1, Sdc2, Sdc3, Sdc4 y combinaciones de ellos, en presencia del compuesto de ensayo;
- (b) poner en contacto Rspo2 o Rspo3 con el Sdc en ausencia del compuesto de ensayo; y
- (c) comparar la actividad de Rspo2 o Rspo3 y del Sdc entre (a) y (b), de modo que una disminución de actividad en presencia del compuesto indica que éste es un antagonista de Rspo2 o Rspo3 y/o de Sdc.

En una forma de ejecución específica el método de detección puede comprender las siguientes etapas:

- (a) determinar la unión de un polipéptido de fusión Rspo2- o Rspo3-fosfatasa alcalina (AP), en presencia del compuesto de ensayo, a una célula que expresa recombinantemente un polipéptido de Sdc seleccionado entre Sdc1, Sdc2, Sdc3, Sdc4 y combinaciones de ellos;
- (b) determinar la unión del polipéptido de fusión a la célula en ausencia del compuesto de ensayo; y
- (c) comparar la actividad de la AP unida a la célula entre (a) y (b), de modo que una disminución de la unión en presencia del compuesto de ensayo indica que éste es un antagonista de Rspo2, Rspo3 y/o de Sdc.

En una forma de ejecución específica relacionada con cualquiera de los métodos de detección arriba descritos la R-espondina es R-espondina-3.

En una forma de ejecución específica relacionada con cualquiera de los métodos de detección arriba descritos se mide la interacción entre Rspo3 y Sdc4.

Los métodos arriba indicados también sirven para detectar agonistas o antagonistas de Glp, determinando el efecto de un compuesto de ensayo en la interacción entre Rspo3 y Glp. Un incremento de la unión en presencia del compuesto de ensayo indica que éste es un agonista de Rspo3 y/o Glp. Una disminución de la unión en presencia del compuesto de ensayo indica que éste es un antagonista de Rspo3 y/o Glp.

Aquí se describen células recombinantes u organismos transgénicos no humanos que sobreexpresan Rspo2 o Rspo3 y/o un Sdc, es decir Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o Sdc4, y/o un Glp, es decir Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 y/o Glp6. Estas células y organismos son especialmente idóneos para identificar moduladores, p.ej. agonistas o antagonistas, de Rspo2, Rspo3, de un Sdc y/o de un Glp.

Por ejemplo, el cribado se puede realizar para identificar anticuerpos capaces de inhibir la unión de Rspo2 o Rspo3 a un Sdc, es decir Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o Sdc4, o la unión de Rspo3 a un Glp, Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 y/o Glp6. Los anticuerpos pueden ser de tipo quimérico, anticuerpos totalmente humanos o dominios variables de anticuerpo, que pueden usarse para inhibir la unión. Como alternativa, el cribado de bibliotecas de péptidos o de compuestos orgánicos con un polipéptido soluble de Rspo2 o Rspo3 expresado recombinantemente, un polipéptido de Sdc y un polipéptido de Glp, con líneas celulares que expresen un polipéptido de Rspo2 o Rspo3, un polipéptido de Sdc y un polipéptido de Glp, o con animales no humanos transgénicos que expresen un polipéptido de Rspo2 o Rspo3 puede servir para identificar moléculas terapéuticas que actúan modulando, p.ej. inhibiendo, la unión de Rspo2 o Rspo3 a un Sdc o la unión de Rspo3 a un Glp y que por tanto son adecuadas como reguladoras, efectoras o moduladoras de Rspo2 o Rspo3 y de un Sdc o de un Glp. Alternativamente, el cribado de bibliotecas de oligonucleótidos, p.ej. de bibliotecas de ARNhc o de ARNip, con líneas celulares que expresen un ácido nucleico de Rspo2 o Rspo3 y un ácido nucleico de Sdc o de Glp o un polipéptido de Rspo2 o Rspo3 y un polipéptido de Sdc o de Glp puede servir para identificar moléculas terapéuticas que actúan modulando, p.ej. inhibiendo, la unión de Rspo2 o Rspo3 a un Sdc o a un Glp y por tanto son adecuadas como reguladoras de la formación de hueso o como efectoras o moduladoras de Rspo2 o Rspo3 y de un Sdc o de un Glp, p.ej. antagonistas de Rspo3 y Sdc4.

El método de la presente inventaron es particularmente apropiado para identificar y/o evaluar posibles agentes de tratamiento de un trastorno relacionado con Rspo2, Rspo3 y/o Sdc, es decir Sdc1, Sdc2, Sdc3 o Sdc4, como p.ej. un trastorno causado, relacionado y/o acompañado por una hiperactividad de Sdc y/o Rspo2 o Rspo3, en particular por una mayor unión de Rspo2 o Rspo3 a un Sdc. Como ejemplos trastornos relacionados con Rspo2, Rspo3 y/o Sdc cabe citar p.ej. los de tipo proliferativo como el cáncer, el carcinoma hepatocelular, las enfermedades inflamatorias, afecciones óseas como la osteoartritis, y la cicatrización de heridas.

También se describe aquí un antagonista de un polipéptido de Rspo2 o Rspo3 o de un ácido nucleico de Rspo2 o Rspo3 para usar en el tratamiento de trastornos causados, relacionados y/o acompañados por la hiperactividad de

- un Sdc, es decir Sdc1, Sdc2, Sdc3 o Sdc4. El antagonista puede ser p.ej. un anticuerpo anti-Rspo2, un anticuerpo anti-Rspo3 o un fragmento de Sdc, p.ej. un fragmento de Sdc4, en concreto de los aminoácidos 1 to145 o de una parte de él que preferiblemente tenga como mínimo una longitud de 10, 20 o 30 aminoácidos, con o sin mutaciones puntuales en las posiciones de unión de los glicosaminoglicanos (GAG). Con mayor preferencia el fragmento de Sdc, p.ej. el fragmento de Sdc4, lleva GAG unidos a él. Asimismo puede ser un fragmento de Rspo2 o Rspo3, sobre todo un fragmento de Rspo3, desde el aminoácido 25 hasta el aminoácido 209, o una parte del mismo que tenga preferiblemente una longitud de 10, 20 o 30 aminoácidos, como mínimo, con o sin mutaciones puntuales, o una molécula de ácido nucleico capaz de inhibir la expresión de Rspo2 o Rspo3.
- El tratamiento puede comprender la determinación de la cantidad y/o actividad de Sdc, es decir de Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o Sdc4 en el sujeto que debe tratarse, p.ej. al nivel del ARNm o a nivel proteico. Este aspecto se puede referir al tratamiento de un trastorno proliferativo - elegido p.ej. entre un cáncer como el carcinoma hepatocelular, un trastorno inflamatorio, una afección ósea como la osteoartritis, y la cicatrización de heridas - caracterizado por una mayor cantidad y/o actividad de un Sdc, p.ej. en comparación con un control sano.
- También se describe aquí un antagonista de un polipéptido de Sdc, es decir de Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o Sdc4, o de un ácido nucleico de Sdc, es decir de Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o Sdc4, para usar en el tratamiento de trastornos causados, relacionados y/o acompañados por la hiperactividad de Rspo2 y/o Rspo3. El antagonista puede ser p.ej. un anticuerpo anti-Rspo2, un anticuerpo anti-Rspo3 o un fragmento de Sdc, p.ej. un fragmento de Sdc4, en concreto de los aminoácidos 1 to145 o de una parte de él que preferiblemente tenga como mínimo una longitud de 10, 20 o 30 aminoácidos, con o sin mutaciones puntuales en las posiciones de unión de los glicosaminoglicanos (GAG). El fragmento de Sdc, p.ej. el fragmento de Sdc4, puede llevar GAG unidos a él. También puede ser un fragmento de Rspo2 o Rspo3, p.ej. un fragmento de Rspo3, en particular desde el aminoácido 25 hasta el aminoácido 209, o una parte del mismo que tenga preferiblemente una longitud de 10, 20 o 30 aminoácidos, como mínimo, con o sin mutaciones puntuales, o una molécula de ácido nucleico capaz de inhibir la expresión de Rspo2 o Rspo3.
- También se describe aquí un antagonista de un polipéptido de R-espondina-2 (Rspo2) o de R-espondina-3 (Rspo3) para usar como medicamento, de modo que dicho antagonista bloquee o inhiba la interacción de un polipéptido de R-espondina-2 (Rspo2) o de R-espondina-3 (Rspo3) con un polipéptido de sindecano (Sdc). El Sdc puede ser Sdc4. El antagonista puede ser un anticuerpo, p.ej. de tipo monoclonal. El anticuerpo puede ser contra R-espondina-2 (Rspo2) o contra R-espondina-3 (Rspo3).
- También se describe aquí un antagonista de un polipéptido de R-espondina-2 (Rspo2) o de R-espondina-3 (Rspo3) para usar en el tratamiento de un cáncer, de una enfermedad inflamatoria, de una afección ósea o en la cicatrización de heridas.
- También se describe un antagonista de un polipéptido de sindecano (Sdc) para usar como medicamento, de modo que dicho antagonista bloquee o inhiba la interacción de un polipéptido de sindecano (Sdc) con un polipéptido de R-espondina-2 (Rspo2) o de R-espondina-3 (Rspo3). En un aspecto particular dicho antagonista bloquea la interacción de un polipéptido de sindecano (Sdc) con un polipéptido de R-espondina-3 (Rspo3). En un aspecto concreto dicho antagonista es un anticuerpo, preferiblemente p.ej. de tipo monoclonal. En otro aspecto concreto dicho antagonista se usa en el tratamiento de un cáncer, de una enfermedad inflamatoria, de una afección ósea o en la cicatrización de heridas.
- El tratamiento puede comprender la determinación de la cantidad y/o actividad de Rspo2 y/o Rspo3 en el sujeto que debe tratarse, p.ej. al nivel del ARNm o a nivel proteico. El trastorno es preferiblemente de tipo proliferativo - elegido p.ej. entre un cáncer como el carcinoma hepatocelular, una enfermedad inflamatoria, una afección ósea como la osteoartritis, y la cicatrización de heridas - caracterizado por una mayor cantidad y/o actividad de Rspo2 y/o Rspo3.
- También se describe un antagonista de un polipéptido de Rspo2 o de un ácido nucleico de Rspo3 para usar en el tratamiento de trastornos causados, relacionados y/o acompañados por la hiperactividad de un Glp. El antagonista puede ser p.ej. un anticuerpo anti-Rspo3 o un fragmento de Glp biológicamente inactivo que tenga preferiblemente una longitud de al menos 10, 20 o 30 aminoácidos. Asimismo puede ser un fragmento de Rspo3, tal como se ha descrito arriba.
- El tratamiento puede comprender la determinación de la cantidad y/o actividad de Glp en el sujeto que debe tratarse, p.ej. al nivel del ARNm o a nivel proteico. Este aspecto se puede referir al tratamiento de un trastorno proliferativo, de una enfermedad inflamatoria, de una afección ósea y de la cicatrización de heridas, en el cual el trastorno se caracteriza por una mayor cantidad y/o actividad de un Glp, p.ej. en comparación con un control sano.
- Asimismo se describe un antagonista de un polipéptido de Glp o de un ácido nucleico de Glp para emplear en el tratamiento de trastornos causados, relacionados y/o acompañados por la hiperactividad de Rspo, en particular por la hiperactividad de Rspo3. El antagonista puede ser p.ej. un anticuerpo anti-Rspo3 o un fragmento de Glp, tal como se ha descrito arriba.

El antagonista puede inhibir o bloquear la interacción de un polipéptido de R-espondina-3 (Rspo3) con un polipéptido de glipicano (Glp)

En todos los aspectos aquí descritos el antagonista se puede administrar en medicina humana o veterinaria.

La determinación de la cantidad y/o actividad de Rspo2, Rspo3 y/o Sdc, es decir de Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o Sdc4, y/o de Glp puede implicar la medición de la expresión de Rspo2, Rspo3, Sdc y/o Glp al nivel de ARNm o a nivel proteico, la medición directa de la unión Rspo2/Sdc y/o Rspo3/Sdc y/o Rspo/Glp y/o la medición de la vía Wnt canónica y/o no canónica.

En una forma de ejecución la actividad de la vía Wnt no canónica se mide por fosforilación de Jnk y/o ensayando el movimiento de extensión convergente en los embriones de *Xenopus* (Yamanaka y otros, 2002). La activación de la vía Wnt/PCP también se puede medir por análisis del FTA con indicador luciferasa en embriones de *Xenopus*.

En una forma de ejecución la actividad de la vía Wnt canónica se mide por análisis TOPFLASH con indicador de luciferasa o mediante matrices de estabilización de b-catenina (Kazanskaya y otros, 2004; Kim y otros, 2008b).

En una forma de ejecución preferida el antagonista es un anticuerpo. Se pueden emplear varios procedimientos conocidos del estado técnico para producir anticuerpos de epítopos de un polipéptido de Rspo2, Rspo3 o Sdc, es decir de Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o Sdc4, o de Glp, es decir de Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 y/o Glp6.

Los anticuerpos monoclonales que se unen a un polipéptido de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp se pueden marcar para permitir su localización y distribución en el cuerpo tras la inyección. Los anticuerpos marcados se pueden usar como herramienta de diagnóstico no invasivo para obtener imágenes de la formación y/o resorción ósea relacionada con aquellos estados cuyo tratamiento implica la inhibición de la pérdida de masa ósea y/o el desarrollo de la formación de hueso.

También se pueden diseñar inmunotoxinas que dirijan agentes citotóxicos a sitios específicos del cuerpo. Así, por ejemplo, se pueden complejar covalentemente anticuerpos monoclonales de gran afinidad, específicos de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp, con toxinas bacterianas o vegetales tales como la toxina diftérica, la abrina o la ricina. Un método general de preparación de moléculas híbridas de anticuerpo puede comportar el uso de reactivos reticulantes de tiol como el SPDP, que ataca los grupos amino primario del anticuerpo y une la toxina al anticuerpo por intercambio de disulfuro.

Para producir los anticuerpos se pueden inmunizar diferentes animales mediante la inyección del polipéptido de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp, incluyendo, sin limitarse a ellos, conejos, ratones, ratas, etc. Para aumentar la respuesta inmunológica se pueden usar varios adyuvantes según la especie huésped, incluyendo, sin limitarse a ellos, el adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales como hidróxido aluminico, sustancias surfactantes como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles como BCG (bacilo Calmette-Guérin) y *Corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos monoclonales de polipéptidos de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp se pueden preparar usando cualquier técnica que permita la producción de moléculas de anticuerpo en cultivos continuos de líneas celulares, incluyendo, sin limitarse a ellas, la técnica del hibridoma originalmente descrita por Köhler 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 EBV (Cole y otros, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Asimismo se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de "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), empalmado los genes de una molécula de anticuerpo murino de especificidad antigénica adecuada con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (pat. U.S. n° 4,946,778) se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios específicos de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp.

Los fragmentos de anticuerpo que contienen sitios de unión específicos para Rspo2, Rspo3, un Sdc o un Glp se pueden generar por técnicas conocidas. Por ejemplo, estos fragmentos incluyen, sin limitarse a ellos: los fragmentos F(ab')₂, que se pueden producir mediante la digestión de la molécula de anticuerpo por pepsina, y los fragmentos Fab, que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Como alternativa se pueden formar bibliotecas de expresión de Fab (Huse y otros, 1989, Science, 246: 1275-1281), a fin de permitir la rápida y fácil identificación de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para R-espondina.

Los anticuerpos de los polipéptidos de Rspo2 pueden antagonizar la actividad de la R-espondina-2, evitando su unión a un Sdc, es decir a Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o Sdc4. Por lo tanto los anticuerpos que se unen específicamente a Rspo2 pueden ser antagonistas de Rspo2.

Los anticuerpos de los polipéptidos de Rspo3 pueden antagonizar la actividad de la R-espondina-3, evitando su unión a un Sdc, es decir a Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o Sdc4 o a un Glp. Por consiguiente los anticuerpos que se unen específicamente a Rspo3 pueden ser antagonistas de Rspo3.

5 Los anticuerpos de los polipéptidos de Sdc, es decir de Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o Sdc4, pueden antagonizar la actividad del respectivo Sdc, evitando su unión a Rspo2 y/o a Rspo3. Por tanto los anticuerpos que se unen específicamente a un Sdc pueden ser antagonistas del respectivo Sdc.

10 Los anticuerpos de los polipéptidos de Glp, es decir de Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 o Glp6, pueden antagonizar la actividad del respectivo Glp, evitando su unión a Rspo3. Por lo tanto los anticuerpos que se unen específicamente a un Glp pueden ser antagonistas del respectivo Glp.

Además las formas mutadas o truncadas de Rspo2, Rspo3, de un Sdc o de un Glp que tienen un efecto negativo dominante también se pueden usar como antagonistas.

15 Aquí se describen ácidos nucleicos antagonistas de de Rspo2, Rspo3 o de un Sdc. Las moléculas antisentido, p.ej. las moléculas de ARN y ADN antisentido o los morfolinolinos actúan bloqueando directamente la traducción de ARNm mediante la unión al ARNm diana e impidiendo la traducción de proteínas. En cuanto a las moléculas antisentido, se prefieren los oligodesoxirribonucleótidos o morfolinolinos derivados del sitio de inicio de la traducción, p.ej. entre las regiones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos de Rspo3 o Sdc4.

20 Los ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de ARN. El mecanismo de acción del ribozima implica la hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima con el ARN diana complementario, seguida de una escisión endonucleolítica. Las moléculas de ribozima con motivo de cabeza de martillo producidas por ingeniería genética catalizan de manera específica y eficiente la escisión endonucleolítica de secuencias del ARN diana.

25 Primero se identifican los sitios específicos de escisión del ribozima en cualquier diana potencial de ARN, explorando aquellos sitios de escisión de la molécula diana de ribozima que incluye las secuencias GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, se puede valorar si las secuencias cortas de ARN de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que lleva el sitio de escisión tienen características estructurales tales como una estructura secundaria que pueda hacer inservible la secuencia de oligonucleótidos. La idoneidad de las posibles dianas también se puede valorar probando su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios mediante ensayos de protección de ribonucleasa.

30 Las moléculas de ARNi son moléculas de ARN bicatenario o análogas de las mismas, incluyendo los análogos con elementos de morfolino, capaces de mediar en la interferencia por ARN de una molécula de ARNm diana, p.ej. moléculas de ARNi, que son moléculas cortas de ARN bicatenario con una longitud preferente de 19-25 nucleótidos y de manera opcional con al menos un extremo protuberante 3' o precursores del mismo o moléculas de ADN que lo codifican.

35 Las moléculas antisentido, p.ej. las moléculas de ARN y ADN antisentido o análogas de las mismas, incluyendo los morfolinolinos, los ribozimas y las moléculas de ARNi, se pueden preparar por cualquier método conocido del estado técnico para sintetizar moléculas de ARN. Estos métodos incluyen técnicas de síntesis química de oligodesoxirribonucleótidos o morfolinolinos bien conocidas del estado técnico, como por ejemplo la síntesis química en fase sólida por el método de la fosforamidita. Alternativamente las moléculas de ARN se pueden generar por transcripción *in vitro* e *in vivo* de secuencias de ADN codificadoras de la molécula de ARN antisentido. Dichas secuencias de ADN se pueden incorporar a una gran variedad de vectores que incluyen promotores adecuados de polimerasa de ARN tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Como alternativa se pueden introducir de manera estable en líneas celulares constructos de ADNc antisentido que sintetizan el ARN antisentido constitutivamente o por inducción, dependiendo del promotor empleado.

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

45 Los antagonistas de los polipéptidos de Rspo2 o Rspo3, de los polipéptidos de Sdc o de los polipéptidos de Glp, o de los ácidos nucleicos de Rspo2 o Rspo3, de los ácidos nucleicos de Sdc o de los ácidos nucleicos de Glp, se pueden usar en el tratamiento de aquellos estados que requieren la reducción de la actividad de Rspo2 o Rspo3 y/o de Sdc mediante la inhibición de la unión de Rspo2 y/o Rspo3 a un Sdc, es decir a Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o Sdc4, o la reducción de la actividad de Rspo3 y/o de Glp mediante la inhibición de la unión de Rspo3 a un Glp.

60 El antagonista puede ser un anticuerpo. Se puede emplear un anticuerpo de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp para tratar aquellos estados que requieren la reducción de la actividad de Rspo2, Rspo3 y/o de Sdc mediante la inhibición de la

65

unión de Rspo2 o Rspo3 a un Sdc, es decir a Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o Sdc4, o la reducción de la actividad de Rspo3 y/o de GIp mediante la inhibición de la unión de Rspo3 a un GIp.

5 El ácido nucleico antagonista puede ser uno que sea capaz de inhibir la traducción, transcripción, expresión y/o actividad de Rspo2, Rspo3, Sdc o GIp. Un ácido nucleico que inhiba la traducción, transcripción, expresión y/o actividad de Rspo2, Rspo3, Sdc o GIp se puede usar para tratar aquellos estados que requieren la reducción de la actividad de Rspo2, Rspo3, de un Sdc y/o de un GIp mediante la inhibición de la unión de Rspo2 o Rspo3 a un Sdc o de Rspo3 a un GIp. Un ARNip, un ARNhc u otro ácido nucleico antisentido contra Rspo2, Rspo3, contra un Sdc o contra un GIp se puede emplear para tratar aquellos estados que requieren la reducción de la actividad de Rspo2, Rspo3 y/o de Sdc mediante la inhibición de la unión de Rspo2 o Rspo3 a un Sdc, es decir a Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o Sdc4, o la reducción de la actividad de Rspo3 y/o de GIp mediante la inhibición de la unión de Rspo3 a un GIp.

15 Los antagonistas de polipéptidos de Rspo2, Rspo3, Sdc o GIp o los ácidos nucleicos antagonistas de Rspo2, Rspo3, Sdc o GIp farmacéuticamente activos se pueden administrar tal cual a un paciente o mezclados con vehículos o excipientes adecuados en composiciones farmacéuticas.

20 En función de los estados concretos bajo tratamiento estos agentes se pueden formular y administrar sistémica o localmente. Las técnicas de formulación y administración se pueden encontrar en la última edición del manual "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa. Como vías de administración adecuadas cabe mencionar, por ejemplo, la oral, rectal, transmucosal o intestinal; la administración parenteral, incluyendo las inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como las inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares, o en el caso de tumores sólidos directamente en un tumor sólido. Para inyectarlos, los agentes 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.

30 Los antagonistas 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 agentes activos en forma de tabletas, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones y similares, para ingestión oral del paciente tratado.

35 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso aquí descrito incluyen aquellas que llevan los antagonistas 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.

40 Además de los antagonistas, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables, incluyendo los excipientes y las sustancias auxiliares que faciliten la elaboración de los antagonistas en preparados de uso farmacéutico. Los preparados formulados para administración oral pueden hallarse en forma de tabletas, grageas, cápsulas o soluciones.

45 Las formulaciones farmacéuticas se pueden elaborar según procedimientos ya conocidos, p.ej. mediante procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, grageado, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

50 Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los antagonistas en forma soluble en agua. Los agentes también se pueden preparar como suspensiones en aceite de aptas para inyectar. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como el aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos 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 carboximetil-celulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente la suspensión también puede llevar estabilizantes o ingredientes adecuados que aumenten la solubilidad de los agentes, con el fin de permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

55 Los preparados farmacéuticos de uso oral se pueden obtener combinando los antagonistas con un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos después de añadirle sustancias auxiliares idóneas, si se desea, para obtener tabletas o núcleos de grageas. Como excipientes son especialmente adecuados rellenos tales como los azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manita o sorbita; los almidones de maíz, trigo, arroz, patata; la gelatina y la goma tragacanto; preparaciones celulósicas 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, como alginato sódico.

65 Los núcleos de grageas se recubren adecuadamente. Para ello se pueden usar soluciones concentradas de azúcar que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden

agregar colorantes o pigmentos a los recubrimientos de las tabletas o grageas, a fin de identificar o caracterizar las diferentes combinaciones de dosis.

5 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 agentes activos mezclados con una sustancia de relleno como la lactosa, con aglutinantes como los almidones y/o con lubricantes como talco o estearato magnésico y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los agentes activos pueden ir disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además se pueden añadir estabilizantes.

10 Las composiciones que llevan un antagonista formulado en un vehículo farmacéuticamente compatible se pueden preparar, introducir en un recipiente idóneo y etiquetar para el tratamiento de la osteoporosis y de otras afecciones cuyo tratamiento implique la formación de hueso y/o la inhibición de la resorción ósea.

15 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.

20 Muchos de los agentes activos se pueden preparar como sales con contraiones 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.

25 La dosis terapéuticamente efectiva de cualquier antagonista empleado en el método aquí descrito se puede estimar 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.

30 Una dosis terapéutica efectiva se refiere a la cantidad de ácidos nucleicos antagonistas que mejora los síntomas o prolonga la supervivencia del paciente. La toxicidad y la eficacia terapéutica se pueden precisar por procedimientos 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 para el 50% de la población). El cociente de dosificación entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación ED50/LD50. Se prefieren los antagonistas que dan los mayores índices terapéuticos. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y de los estudios con animales se pueden utilizar para fijar un intervalo de dosificación destinado al uso en humanos. La dosificación de tales antagonistas 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 empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación las puede elegir cada médico viendo el estado del paciente (véase p.ej. Fingl y otros, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p1).

45 La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para aportar al plasma unos niveles de agentes activos que sean suficientes para mantener los efectos de inhibición deseados. Las dosis habituales para la administración sistémica a un paciente oscilan 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 habituales varían entre 0,02-25 mg/kg/día, normalmente 0,02-3 mg/kg/día, típicamente 0,2-1,5 mg/kg/día.

50 La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para aportar al plasma unos niveles de agentes activos 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.

55 Como alternativa, los agentes activos se pueden administrar localmente en lugar de sistémicamente, por ejemplo inyectándolos en un sitio diana, a menudo mediante una formulación para absorción gradual o liberación prolongada.

60 La composición farmacéutica también se puede administrar mediante un sistema de liberación dirigida del fármaco, por ejemplo en un liposoma recubierto con un anticuerpo específico de la diana. Los liposomas se dirigirán al sitio diana y serán absorbidos selectivamente en él.

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.

65 Los ácidos nucleicos de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp o los compuestos capaces de unirse a polipéptidos de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp o ácidos nucleicos de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp, como los anticuerpos o las sondas nucleótidas,

se pueden usar con fines diagnósticos para detectar la expresión de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp, p.ej. en los trastornos proliferativos como los indicados arriba.

Los reactivos adecuados para detectar polipéptidos de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp o ácidos nucleicos de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp o compuestos capaces de unirse a polipéptidos de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp o ácidos nucleicos de Rspo2, Rspo3, Sdc o Glp pueden tener varios usos en el diagnóstico de procesos, enfermedades o trastornos resultantes de la expresión aberrante de Rspo2, Rspo3 o Sdc1, Sdc2, Sdc3, Sdc4, Glp1, Glp2, Glp3, Glp4, Glp5 y/o Glp6, relacionados con la misma y/o acompañados de ella. Los métodos de diagnóstico se realizan 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 Rspo2, Rspo3, Sdc1, Sdc2, Sdc3, Sdc4 o Glp 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*.

La presente invención se explica asimismo con mayor detalle mediante las siguientes figuras y ejemplos.

Descripción breve de las figuras

Figura 1. La R-espondina-3 interactúa con sindecano 4.

(A-C) Ensayos de unión a la superficie celular. (A, D) La Rspo3 se une al sindecano 4 y al glipicano 3. Se transfectoron células HEK293T con los plásmidos señalados y del modo indicado se aplicó la proteína Wnt5a marcada con V5 o las proteínas Rspo3, Dkk1 o TSP marcadas con fosfatasa alcalina para la unión a la superficie celular. (B, C, E, F) Las células se transfectoron con los plásmidos indicados y medios acondicionados.

Figura 2. La R-espondina-3 se une al sindecano 4 y a glipicanos.

(A) Rspo2 y Rspo3 se unen a sindecano-1, sindecano-2, sindecano-3 y sindecano-4. Rspo1 y Rspo4 no se unen. Se transfectoron células HEK293T con los plásmidos señalados y del modo indicado se aplicaron las proteínas Rspo1, Rspo2, Rspo3 y Rspo4 marcadas con fosfatasa alcalina para la unión a la superficie celular. Las células se transfectoron con los plásmidos señalados y se aplicaron medios acondicionados que contenían proteínas de fusión de R-espondinas-fosfatasa alcalina (AP) para la unión a la superficie celular y la tinción AP, del modo indicado. (B) Las células se transfectoron con los plásmidos especificados y se incubaron con o sin NaClO₃. A las 24 h se aplicó Rspo3-AP para la unión y se procedió a la tinción. (C) Ensayo de unión *in vitro* con N-streptag Sdc4ΔTMC purificado a partir de los medios acondicionados de control o de las células tratadas con NaClO₃ a Rspo3-AP purificada (UR, unidades relativas). (D) Análisis gráfico de Scatchard de los ensayos de unión *in vitro* con N-streptag Sdc4ΔTMC purificado y Rspo3-AP. (E) La Rspo3 se une a glipicano-1, glipicano-2, glipicano-3, glipicano-4, glipicano-5 y glipicano-6.

Figura 3. La integridad de las proteínas de fusión Rspo-AP usadas en la fig. 1A se controló por análisis Western blot con detección de anticuerpos anti-AP.

Figura 4. Marcación metabólica *in vivo* de N-streptag Sdc4ΔTMC con [S³⁵] sulfato en presencia o ausencia de clorato sódico. Las muestras se analizaron tras la precipitación de estreptavidina por Western blot (izquierda) y autorradiografía (derecha). Obsérvese que la mayor parte del Sdc4 a 45 kD no está sulfatado.

Figura 5. La R-espondina-3 es necesaria para la gastrulación del *Xenopus* y la señalización Wnt no canónica.

(A) La pérdida de funcionalidad de *Rspo3* produce defectos de gastrulación en los embriones de *Xenopus*. Arriba: embriones en fase de 4 células se microinyectaron ecuatorialmente en dos blastómeros dorsales con 40 ng de Rspo3 Mo por embrión. Obsérvese el fenotipo de espina bífida con dos extremos caudales (puntas de flecha) en los embriones inyectados con Rspo3 Mo (61%, n = 66), pero no en los embriones de control (0%, n = 45). Centro: hibridación *in situ* de *Xbra* en la fase de gástrula (fase 11). Los embriones de control y Rspo3 Mo mostraron respectivamente 100% (n = 20) y 95% (n = 20) de tinción *Xbra* normal. Obsérvese sin embargo el blastoporo ensanchado en el Rspo3 morfante. Abajo: Rspo3 Mo inhibe el alargamiento de los hemisferios animales inyectados con activina.

(B-D) La señalización de Rspo3 requiere Sdc4 y Wnt5a para inducir defectos de gastrulación. Los embriones se inyectaron en fase de 4 células con morfolinolinos y/o ARNm en dos blastómeros dorsales del modo indicado (40 ng de Rspo3 Mo; 100 pg de ARNm para hSdc4 natural o dominante negativo; 10 o 20 ng de Sdc4 Mo; 2,5 o 10 ng de Wnt5a Mo ("+" y "++"); se emplearon 250 pg de ARNm para xRspo3 por embrión). (E) Ensayo de protrusión celular con microscopía confocal. Se disoció la zona marginal dorsal o ventral (ZMV) de embriones en fase 10,5 inyectados con membrana-RFP ARNm y 40 ng Rspo3 Mo o 10 ng de Wnt5a Mo y/o 50 pg de ARNm para hRspo3 por embrión. Las puntas de flecha blancas indican protrusiones. Derecha: cuantificación de protrusiones de tres ensayos independientes (entre 300-600 células contadas por cada barra). Se indica la desviación estándar de la media. (F) Arriba: inmunotinción nuclear con fosfo-JNK en el mesodermo dorsal de embriones en fase 10,5 inyectados dorsalmente con los morfolinolinos o los ARNm indicados. Abajo: tinción nuclear de Hoechst.

Figura 6. Expresión de Rspo3 y Sdc4 en embriones de *Xenopus* (A-F). (A) Expresión de Rspo3 en la zona marginal dorsal involuta de la gástrula en fase 10 biseccionada sagitalmente y (B, E) en el cartílago de cabeza del renacuajo

en fase 46. (C, F) Expresión de *Sdc4* en el cartílago de cabeza del renacuajo en fase 46. (D) La sonda sentido para el transcrito de *Rspo3* no da ninguna señal con el renacuajo en fase 46. (G) Perfiles de expresión de los genes marcadores mesodérmicos indicados en hemisferios animales inyectados con activina y *Rspo3* Mo.

Figura 7. La R-espondina-3 es necesaria para la morfogénesis del cartílago de cabeza.

- 5 (A-B) Embriones de *Xenopus* en la fase de renacuajo inyectados en la fase de 8 células con 10 ng por embrión de *Rspo3* Mo en los cuatro blastómeros animales; obsérvese la cabeza reducida en los *Rspo3* morfantes (68 %, n = 98) en comparación con Co Mo (0,1%, n = 85). (C-D y G-H) El cartílago ceratobranquial se tiñó con azul alcian y se diseccionó de embriones en fase 46 inyectados animalmente con 10 ng de *Rspo3* Mo o con 2,5 ng de *Wnt5a* Mo por embrión en la fase de 8 células. Obsérvense los elementos cartilaginosos compactos. (E-F e I-J) El cartílago ceratobranquial se diseccionó de embriones inyectados con morfolino y se aplanó. Se determinó la relación longitud-anchura (R) de los condrocitos; se indican los valores. (E' y F') Dibujo esquemático de los contornos celulares de E y F. Abreviaciones: br, cartílago ceratobranquial; ba, cartílago basihial.
- 10

Figura 8. Los marcadores de la cresta neural no están afectados en los *Rspo3* morfantes.

- 15 (A) Se inyectaron unilateralmente embriones de 8 células con 2,5 ng por blastómero de Co Mo o *Rspo3* Mo y trazador de linaje lacZ en dos blastómeros animales. (B) Los embriones se inyectaron como en (A) pero en todos los blastómeros animales y sin trazador de linaje. Se analizó la expresión de los genes marcadores indicados en la fase de neurula o en la fase de brote de cola, del modo indicado, por hibridación in situ de embriones enteros (A) o por qPCR (B). Los embriones inyectados con *Rspo3* Mo revelan unos patrones de expresión no afectados en el *caracol* (95%, n = 20 para la neurula y 95,5%, n = 22 para el brote de cola), al igual que los embriones inyectados con Co Mo (100%, n = 21 para la neurula y 100%, n = 20 para el brote de cola).
- 20

Figura 9. La *Rspo3* y los HSPG cooperan en la morfogénesis del cartílago de cabeza.

- 25 (A) Vista dorsal de embriones inyectados con dosis subumbrales de *Rspo3* Mo (5 ng por embrión) y/o ARNm para *Sdc4* dominante negativo (dn*Sdc4*, 25 pg por embrión). La flecha indica la distancia entre los ojos; en el embrión inyectado con Co Mo la distancia se definió como 100% y se indican las distancia relativas (n = 21-25). Nótese que el volumen de la cabeza disminuye aproximadamente con la tercera potencia de su diámetro. (B-C) La inhibición subumbral combinada de *Rspo3* y *Sdc4* afecta a la morfogénesis del cartílago de cabeza. Análisis estadísticos de embriones inyectados con bajas dosis de *Rspo3* Mo y/o dn*Sdc4* ARNm para dn*Sdc4* o 1 ng de *Sdc4* Mo por embrión. Nótese que el tamaño de la cabeza se redujo específicamente, mientras que la longitud del eje corporal no resultó afectada. (D) La inhibición subumbral combinada de *Rspo3* y HSPG afecta a la morfogénesis del cartílago de cabeza. Análisis estadísticos de embriones inyectados con *Rspo3* Mo y/o tratados con NaClO₃ 60 mM entre las fases 20-46. Se indica el diámetro de la cabeza y la longitud del cuerpo entre la cabeza y la cola. El tamaño de la cabeza es reducido significativamente por la inhibición tanto de *Rspo3* como de *Sdc4* (valores p, * < 0,005, ** < 0,01).
- 30
- 35 (E) El cartílago ceratobranquial se diseccionó de embriones inyectados en A con *Rspo3* Mo y/o ARNm para dn*Sdc4* y se aplanó. Se indica la relación longitud-anchura (R) de los condrocitos.

Figura 10. La señalización de *Rspo3*/PCP requiere *Wnt5a*, *Sdc4* y *Dvl*.

- 40 (A-D) Ensayo de FTA2 con indicador luciferasa en embriones de *Xenopus*. Se inyectaron ecuatorialmente embriones en fase de 4 células con plásmido indicador FTA2-Luc y los morfolininos y ARNm antisentido indicados. Los ensayos con indicador de luciferasa se llevaron a cabo a partir de embriones enteros lisados en la fase de gástrula (fase 12). La actividad de luciferasa en los embriones inyectados solamente con Co Mo o con Co Mo más ARNm de los activadores indicados en cada condición se estableció como 100%. ARL, actividad relativa de luciferasa.

45 Figura 11. Especificidad de *Rspo3* Mo

- Ensayo de FTA2 con indicador luciferasa en embriones de *Xenopus*. Se inyectaron ecuatorialmente embriones en fase de 4 células con plásmidos indicadores FTA2-Luc y renilla y dos distintos morfolininos antisentido (R3 Mo; R3 Mo2) contra *xRspo3* (40 ng por embrión) y/o h*Rspo3* ARNm (50 y 100 pg por embrión). Los ensayos con indicador de luciferasa se llevaron a cabo con embriones enteros recogidos en la fase de gástrula (fase 12). La actividad de luciferasa en los embriones inyectados Co Mo más ARNm *PPL* se estableció como 100%. R3 Mo2 es un morfolino que tiene la secuencia GCAGTCGCAATTGCATAGTAACCTT y se inyectó a 40 ng por embrión. ARL, actividad relativa de luciferasa.
- 50

Figura 12. La *Rspo3* requiere endocitosis mediada por clatrina para inducir fosfo-JNK.

- 55 (A) Microscopía confocal de células de hemisferios animales disociadas y tratadas durante 1 h con la proteína h*Rspo3*ΔC-SNAP549 (puntas de flecha naranja en CoMo). Se inyectaron animalmente embriones en la fase de 4 células con Venus ARNm unido a membrana (verde) y los morfolininos (Mo) indicados (20 ng de *Sdc4*; 20 ng de *Fz7*; 5 ng de *Wnt5a*). El número medio de vesículas por célula se indica en el gráfico. (B) Microscopía confocal de *Dvl*-GFP (verde) en hemisferios animales de *Xenopus* en la fase 8. Se inyectaron animalmente embriones en la fase de 4 células con los Mo y/o ARNm indicados junto con *Dvl*-GFP ARNm. (C, D) Microscopía confocal de células de hemisferios animales (AC) procedentes de embriones inyectados en la fase de 4 células con el Mo o ARNm indicado (C) o tratados con inhibidores de endocitosis (D) del modo descrito en Materiales y métodos. Se inyectaron animalmente embriones de "células AC disociadas" con Venus ARNm unido a membrana (verde); las AC se explantaron y se disociaron en la fase 8, y se incubaron durante 1 h con h*Rspo3*ΔC-SNAP549 (rojo), se fijaron y se analizaron. Se trataron células enteras de "tejido AC" en fase 8 con proteína A (los dos paneles de arriba) o con h*Rspo3*ΔC-streptag-PrA2 recombinante ("tratamiento de *Rspo3*") y se tiñeron inmunológicamente con anticuerpo
- 60
- 65

anti-pJNK tal como se describe en Materiales y métodos. Las células y los tejidos se tiñeron por contraste con Hoechst (azul). Obsérvese que las células tratadas con inhibidor de clatrina (AP2Δ2 Mo, MDC) fijan y agrupan Rspo3 en la superficie celular, pero no logran incorporar la proteína e inducir fosfo-JNK.

Figura 13. Control de la incorporación de dextrano fluorescente. (A-D) Incorporación de fluoresceína-dextrano (verde) en células de hemisferios animales disociadas e inyectadas con RFP unido a membrana y los morfolidos o ARNm indicados (A, B) o tratadas con el inhibidor indicado (C, D). Las células de los hemisferios animales se trataron previamente con DMSO, monodansilcadaverina (MDC), filipina III o nistatina durante 45 minutos y se incubaron con fluoresceína-dextrano y los inhibidores indicados. Las barras muestran el número promedio de vesículas fluorescentes por célula (excluyendo las señales de superficie) para la proteína hRspo3ΔC-SNAP549 o para fluoresceína-dextrano. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de 3 experimentos independientes. El número de células registrado es $n > 40$ (B) y $n > 48$ (D). Tinción nuclear de Hoechst, azul.

Figura 14. Modelo de asociación de Rspo3 con un complejo receptor de Wnt que interviene en la señalización de PCP. La endocitosis de complejos receptores de Wnt es esencial para la transducción de la señal Wnt/PCP. La unión de Rspo3 a Sdc4 promueve la endocitosis del complejo receptor de Wnt mediada por clatrina, señalando a través de la vía PCP.

Ejemplos

MATERIALES Y MÉTODOS

Constructos

Todos los constructos de R-espondina-1 humana, R-espondina-2 humana, R-espondina-3 humana, R-espondina-4 murina, sindecano-1 murino, sindecano-2 murino, sindecano-3 murino, sindecano-4 humano y glipicano-3 fueron creados por PCR y se clonaron en pCS2+. Los constructos se formaron añadiendo marcadores (fosfatasa alcalina, PRP o Flag). Por ejemplo, la hRspo2 se fusionó por el extremo C-terminal con AP para generar hRspo1-AP. Los constructos de glipicano-1 humano, glipicano-2 humano, glipicano-3 humano, glipicano-4 humano, glipicano-5 humano y glipicano-6 humano se formaron de la manera correspondiente. Se fusionaron deleciones C-terminales de hRspo2 (aa 1-206), hRspo3 (aa1-209) y mRspo4 (aa 1-198) con AP para generar respectivamente hRspo2ΔC-AP, hRspo3ΔC-AP y mRspo4ΔC-AP. En hRspo3TSP-AP (TSP) el péptido señal se fusionó con el dominio TSP (aa146-209) seguido del marcador AP. La hRspo3ΔC-SNAP se generó fusionando hRspo3 (aa1-209) con el fragmento marcador SNAP del vector pSNAPtag(m) (New England Biolabs). La phSdc4-EYFP se formó poniendo EYFP detrás del sindecano-4 completo. La Nstreptag *hSdc4* se subclonó reemplazando su péptido señal por el de mKremen2 enfrente del fragmento Streptag-HA-CBP del vector de expresión pGLUE (Angers y otros, 2006). La pN-streptag-hSdc4ΔC se formó por delección de los últimos 28 aminoácidos. En la pN-streptag-hSdc4ΔGAG las serinas 63, 97, 95, 138 se cambiaron por alanina. La pN-streptag-hSdc4ΔTMC se clonó por delección de los últimos 52 aminoácidos. La pHgly3 se subclonó en pCS2+. Los clones de ADNc completo de mSdc1 and mSdc2 en el vector pCMV-Sport6 se adquirieron de imaGenes (clones IRAVp968B1218D e IRAVp968B0992D).

El mSdc3 se subclonó por clonación de un clon de imaGenes (IRAVp968F09131D) en pCS2+. La pN-Flag-hGly3 se clonó en el vector pCS2+ con el péptido señal de mKremen2. En la pN-Flag-hGly3ΔGAG la serina 445 y 509 se reemplazó por alanina. Para el constructo pPGKmWnt5aV5, el promotor CMV en el pcDNA3 se reemplazó por el promotor PGK y luego se subclonó *mWnt3a* en el vector resultante, seguido por el marcador V5. La pFzd5-GFP se describe en Kikuchi (Yamamoto y otros, 2006), la pCaveolin-GFP se describe en Helenius (Pelkmans y otros, 2004). La fusión Wnt8-Fzd5 está descrita en Williams (Holmen y otros, 2002). Los clones de ADNc completo hGlp1, hGlp2, hGlp3, hGlp4, hGlp5 y hGlp6 se adquirieron de imaGenes (clones IRAUp969F11104D, IRATp970D1144D, IRAUp969D0389D, IRATp970D0937D, IRATp970B0558D e IRAMP995J1814Q). Los clones de los hGlp2-5 se usaron tal cual. El clon de hGlp1 se clonó en el vector pCS2+ bajo en control del promotor CMV.

Cultivo celular, medios acondicionados, transfecciones e inhibidores de endocitosis

Las células HEK293T se mantuvieron en DMEM, con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 10% de CO₂. Donde sea que se mencionen proteínas recombinantes se usaron medios acondicionados. Los medios acondicionados con Wnt3a y Rspo3 se prepararon respectivamente tal como está descrito (Mao y otros, 2001) y Kazanskaya y otros, 2004). Todas las transfecciones con plásmidos se realizaron usando FuGene6 (Roche) y las células se recogieron 24 h tras la transfección. Para evitar cualquier contaminación de las preparaciones con policaciones en la producción de las proteínas recombinantes, las células 293T se electroporaron transitoriamente con el ADN correspondiente, empleando el sistema de transfección Neon® (Invitrogen). En caso indicado, a las 24 h de la transfección o de la electroporación, el medio de cultivo de las células se suplementó con NaClO₃ 25 mM y se incubó 24 h más.

Ensayos con indicador de luciferasa y transfecciones de ARNip

Para los ensayos con indicador de luciferasa en los embriones de *Xenopus*, éstos se inyectaron con FTA2-luciferasa (van Dam y otros, 1995) y pRenilla-TK más Mo y/o ARNm sintético (normalmente 50 pg por embrión). Se lisaron

grupos de 7 embriones cada uno con tampón de lisis pasivo (Promega) y se comprobó su actividad de luciferasa, usando el sistema dual de luciferasa (Promega).

Unión a la superficie celular

5 Los medios acondicionados de proteínas se prepararon por transfección transitoria de las células HEK293T con plásmidos codificadores de las proteínas de fusión: hRspo1-AP, hRspo2ΔC-AP, hRspo3ΔC-AP, hRspo3TSP-AP y dkk1-AP en DMEM completo. La fusión XWnt8-hFzd5 se produjo en medio libre de suero (OPTIMEM I, Gibco) y el medio acondicionado se concentró unas 100 veces, empleando filtros Centricon Plus-20 (Millipore). Los medios
10 acondicionados de proteína Wnt5aV5 se produjeron usando células L transfectadas de modo estable con pWnt5aV5. Para los ensayos de unión a la superficie celular, las células 293T se dispusieron en placas recubiertas de polilisina, se transfectaron durante 48 h con los genes objeto de ensayo, usando FuGENE 6 (Roche), se incubaron durante 2 h en hielo con los medios acondicionados que contenían las proteínas de fusión, se lavaron con tampón de Hank, se fijaron durante 30 minutos con DSP 0,5 mM (Pierce) en tampón de Hank con HEPES 100 mM de pH 7,2, se lavaron
15 con Tris 0,1 M de pH 8,0 y se tiñeron con Fast Red (Roche). La tinción roja que muestran algunas células indica la unión de la proteína de fusión ensayada al gen transfectado. Debería compararse con una tinción de referencia obtenida de células transfectadas con plásmido de control u otros genes que no son capaces de fijar la proteína de fusión aplicada.

20 Ensayo de unión *in vitro*

Para los ensayos de unión *in vitro* se purificó parcialmente hRspo3ΔC-AP a partir del medio acondicionado, en dos etapas. La hRspo3ΔC-AP procedente del medio acondicionado se absorbió en perlas de heparina-agarosa (Sigma, tipo I), se lavó con TBS y se eluyó con NaCl 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7,5. El material eluido se cargó en una columna
25 de Concanavalin A-agarosa (Sigma), se lavó con NaCl 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7,5 y se eluyó con NaCl 0,5 M, MgCl₂ 1 mM, metil-α-D-mano-piranosido 100 mM, Tris 20 mM, pH 7,5. La concentración de proteína de fusión eluida se determinó en geles de SDS PAGE teñidos con Coomassie, usando ASB como patrón.

La proteína N-streptag Sdc4ΔTMC se purificó parcialmente a partir del medio acondicionado, mediante absorción en estreptavidina-agarosa (Thermo Scientific), lavado con NaCl 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7,5 y elución con biotina 2 mM en el mismo tampón. La proteína eluida se diluyó hasta NaCl 150 mM y se unió a DEAE-Sephadex A-50. Las perlas se lavaron con TBS para eliminar la biotina y se eluyeron con NaCl 1 M, Tris 20 mM, pH 7,5. La proteína eluida se dializó contra TBS y se conservó a -20°C hasta su uso.

35 Para el ensayo de unión *in vitro* se emplearon placas blancas de 96 pocillos tipo ELISA de gran afinidad (Greiner) recubiertas por la noche a 4°C con 100 μl de estreptavidina disuelta a 2 μg/ml en tampón de bicarbonato (NaHCO₃, 50 mM, pH 9,6). Los pocillos se lavaron 6 veces con 230 μl de TBST y se incubaron durante 1 h a TA con 230 μl de tampón de bloqueo (5% de ASB, MgCl₂ 1 mM en TBST) sobre un agitador. Los pocillos se cargaron con 100 μl de proteína N-streptag Sdc4ΔTMC en tampón de bloqueo y se dejaron por la noche a 4°C sobre un agitador para que
40 tuviera lugar la fijación. Los pocillos se lavaron 6 veces con 230 μl de TBST y se incubaron durante 1 h con 230 μl de tampón de bloqueo. Para los ensayos de unión se introdujeron 100 μl de hRspo3ΔC-AP serialmente diluida en pocillos recubiertos con tampón de bloqueo o N-streptag Sdc4ΔTMC. Tras 2 h de incubación a TA los pocillos se lavaron 6 veces con 230 μl de TBST. La actividad de la AP unida se midió mediante el ensayo quimioluminiscente del gen indicador de SEAP (Roche). Para cada dilución, el valor de unión de referencia se sustrajo del valor de hRspo3ΔC-AP. Los datos de unión se analizaron mediante un gráfico de Scatchard, usando Excel.

Marcación metabólica *in vivo* con [S³⁵] sulfato

50 Las células HEK293T transfectadas transitoriamente con N-streptag Sdc4ΔTMC o con GFP de control se marcaron metabólicamente con 0,2 mCi/ml de [S³⁵] sulfato (según Tooze, 2001).

Pasadas 24 h después de la marcación se recogió el medio acondicionado, se suplementó con NP40 al 1%, Na₂SO₄ 10 mM frío y se incubó durante la noche con perlas de estreptavidina. Las perlas se lavaron con NaCl 0,5 M, Na₂SO₄ 1 mM, NP40 al 1%, Tris 20 mM a pH 7,5. La N-streptag Sdc4ΔTMC marcada y unida se eluyó con biotina 2 mM en el mismo tampón y se analizó por Western blot autorradiografía.

Marcación con sonda SNAP

60 El medio acondicionado que contenía hRspo3ΔC-SNAP se purificó parcialmente a 4°C en heparina-agarosa, tal como se ha descrito para la hRspo3ΔC-AP, con la modificación de que todos los tampones se suplementaron con mercaptoetanol 1 mM. La proteína eluida se concentró en un filtro Amicon (Millipore) y se marcó durante 3 h a TA con substrato SNAP-surface 549 según las instrucciones del fabricante (New England Biolabs). La proteína marcada hRspo3ΔC-SNAP549 se liberó del substrato en una columna Sephadex G50 (concentración final A₅₅₆ = 0,93) y se conservó en alícuotas a -20°C.

65

Métodos de *Xenopus*

La fertilización *in vitro*, el cultivo de los embriones, la preparación de ARNm, la microinyección y el cultivo de los embriones explantados se realizó del modo descrito (Gawantka y otros, 1995). Se efectuó la hibridación *in situ* de embriones enteros (según Bradley y otros, 1996). Las dosis de ARNm para las inyecciones fueron las indicadas en las leyendas y si no (pg por embrión): 250 de Fz5, 100 de XWnt11, 250 de XFz7, 200 de XDsh-GFP, 250 de RFP o Venus unido a membrana (obsequio de N. Kinoshita, Kinoshita y otros, 2003), 500 de Δ DIX y Δ DEP de *Xenopus Dishevelled*, 500 de mutante Rab5 dominante negativo (obsequio de M Zerial, Bucci y otros, 1992) y caveolina-1 dominante negativa (mutante YF, obsequio de C. Mastik, Sanguinetti y otros, 2003). Las dosis de oligonucleótidos morfolínicos antisentido para las inyecciones fueron (pg por embrión): 20 de Sdc4Mo (Munoz y otros, 2006), 2,5 de LRP6Mo (Hassler y otros, 2007), 10 de Wnt5a (Schambony y Wedlich 2007) 10 o 40 de Rspo3 (Kazanskaya y otros, 2007), 25 de Dsh (Sheldahl y otros 2003). Se inyectó una cantidad igual de Mo total por ajuste con el Mo estándar de control (Gene Tools) donde era preciso. Para los ensayos de protrusión se diseccionaron células mesodérmicas dorsales o ventrales de embriones en fase 10,5 inyectadas del modo descrito en la leyenda, se disociaron en MBS libre de Ca^{2+} y se cultivaron en 0,5x Barth con 1% de ASB (ASB-Barth) durante 1 hora en una placa recubierta de fibronectina (50 μ g/ml). El cartílago de cabeza se tiñó con azul alción del modo descrito (Berry y otros, 1998). Para preparar el cartílago de cabeza los renacuajos se trataron con proteinasa K (100 μ g/ml en PBS) durante 2 horas y luego con tripsina (GIBCO) al 0,05% durante 3 horas; el cartílago de cabeza se diseccionó manualmente bajo un microscopio estereoscópico.

Inmunotinción, ensayos de incorporación y tratamiento de células embrionarias de *Xenopus* con Rspo3

Para controlar la fosforilación de JNK, las zonas marginales dorsales en fase 10,5 se diseccionaron y se fijaron por la noche a $-20^{\circ}C$ en fijador de Dent. Una vez rehidratados, los explantes se bloquearon en suero equino al 20%, reactivo bloqueante al 1% (Roche Molecular Biochemicals) en PBST (0,1% de Tween en PBS). A la incubación por la noche a $4^{\circ}C$ con el anticuerpo primario anti-pJNK (V7931, Promega, 1:1000) le siguió Alexa 488 anti-conejo (1:1000) durante 4 h a TA y tinción de Hoechst. Con el fin de controlar la incorporación de Rspo3 se diseccionaron hemisferios animales de embriones en fase 8 inyectados animalmente, se disociaron en MBS libre de Ca^{2+} y se cultivaron en ASB-Barth junto con proteína hRspo3 Δ C-SNAP549 (1:40) o fluoresceína-dextrano (1 μ g/ml) (Molecular Probes) durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con ASB-Barth, se fijaron con MEMFA durante 15 minutos y se tiñeron con Hoechst. Para los tratamientos inhibidores de la endocitosis, las células de hemisferios animales disociadas se trataron previamente con MDC (monodansilcadaverina, 1 mM, Sigma), filipina III (300 ng/ml, Sigma), nistatina (25 μ g/ml, Sigma) o DMSO al 2% durante 45 minutos y luego durante 1 h más en presencia de hRspo3 Δ C-SNAP549 (1:40) en ASB-Barth. Para inducir y detectar fosfo-JNK en hemisferios animales, unos cubreobjetos de microscopio se trataron previamente con IgG (4,5 μ g/ml de IgG (Sigma) en $NaHCO_3$ 50 mM, pH 9,6) por la noche a $4^{\circ}C$, se lavaron con TBST, se bloquearon con ASB al 5% en TBST durante 1 hora y luego se cargaron con medio acondicionado con proteína hRspo3 Δ C-streptag-PrA2 o con proteína A (1 μ g/ml, Amersham) durante la noche a $4^{\circ}C$. El cubreobjetos se usó después de lavarlo con ASB-Barth. Los hemisferios animales de fase 8 se diseccionaron de embriones inyectados y, con la cara abierta hacia arriba por debajo de un cubreobjetos tratado con ASB, se trataron previamente durante 45 minutos con las dosis mencionadas de inhibidores de endocitosis. Luego el cubreobjetos se reemplazó por otro cargado con hRspo3 Δ C-streptag-PrA2 o con proteína A y se continuó la incubación en presencia de inhibidores durante 1 hora. Los hemisferios animales se retiraron, se fijaron en fijador de Dent durante la noche a $-20^{\circ}C$, se rehidrataron y se tiñeron inmunológicamente con anticuerpo anti-JNK del modo descrito. Se efectuó un barrido láser confocal en un microscopio Nikon e-C1plus.

Ensayo de interacción de sindecano-4 con R-espondina-3:

Para ver la interacción entre la R-espondina-3 y el sindecano-4 se puede usar un ensayo basado en ELISA. Para ello se aplican membranas que contienen sindecano-4 a placas de 96 o 384 pocillos, durante la noche a $4^{\circ}C$. La secuencia completa codificadora del sindecano-4 se fusionó para la detección con un 6His Tag y se clonó en el vector pTT5 para la transfección temporal en células 293-6E, tal como se describe en Durocher y otros (véase la referencia). El nivel de expresión fue de 30 mg/l aproximadamente. Para preparar las membranas con sindecano-4 se homogenizaron precipitados celulares con un utensilio Dounce y luego se centrifugaron a 40.000 g durante 30 minutos. El precipitado celular se lava, se resuspende y se utiliza para recubrir. Las membranas de sindecano-4 se aplican a diversas concentraciones, desde 1 μ g/ml hasta 20 μ g/ml. Las placas recubiertas se lavan y se bloquean durante 2 horas con PBS que contiene 2% de ASB. Después de lavar las placas bloqueadas se cargan distintas cantidades de proteínas de fusión R-espondina-3-fosfatasa alcalina sobre los pocillos recubiertos (y también sobre pocillos no recubiertos como control) y se incuban a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Después de lavar las placas, la proteína de fusión R-espondina-3-fosfatasa alcalina que ha quedado unida se detecta añadiendo MUP, un sustrato para fosfatasa alcalina (lectura fluorescente, excitación a 340 nm y emisión a 450 nm).

Preparación de la proteína de fusión R-Spo3-ALPL

Se fusionaron distintas longitudes de secuencias codificadoras de RSpO3 humana y de rata (correspondientes a AA1-132, AA1-207 y AA1-273) con la secuencia codificadora de una proteína ALPL con deleciones en el extremo terminal carboxilo (AAS 1-502). Estos constructos se clonaron luego en vectores pTT5 y se transfectaron en células

293-6E, tal como se describe en Durocher y otros. Los medios acondicionados que contenían estas proteínas se recuperaron 120 horas después de la transfección (nivel de expresión > 25 mg/l) y se centrifugaron a 1000 x g durante 10 minutos para descartar los restos de células, antes de la conservación a -20°C previa al uso. Todos los trabajos de purificación se realizaron a 4°C utilizando aparatos de cromatografía Akta (GE Healthcare). Primero se añadió tampón 10X al medio acondicionado, a una concentración de Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM. Estos materiales se clarificaron después por centrifugación durante 1 h a 15.000 x g a 4°C y se cargaron en una columna HisTrap de 5 ml (GE Healthcare). Las proteínas de fusión se eluyeron con aproximadamente imidazol 320 mM en Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 350 mM, CHAPS al 0,1%. El análisis de proteínas con SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie demostró que tenían aproximadamente un 95% de pureza. Se observó una banda única para la proteína de fusión RSpO3(1-102)-ALP(1-502). Para las proteínas de fusión RSpO3(1-207)-ALP(1-502) y RSpO3(1-272)-ALP(1-502) se observó un doblete.

Resultados y discusión

El sindecano-4 es un receptor de R-espondina-3

Buscando un receptor de R-espondina observamos, como es sabido, que los dominios de tromboespondina (TSP1) presentes en las R-espondinas se unen a los HSPG (Chen y otros, 1996). De hecho, en los ensayos de unión a la superficie celular (figura 1A y 1D) tanto la Rspo3 completa como su dominio TSP se unieron específicamente a células transfectadas con *glipicano-3* o *sindecano-4* (*Sdc4*). En cambio no se detectó ninguna unión de Rspo3 a las células transfectadas con *LRP6*, *Kremen1* o *Frizzled5* (*Fzd5*), las cuales sin embargo se unieron respectivamente a Dkk1 y Wnt5a recombinantes.

También ensayamos la unión a todos los sindecanos de las proteínas de fusión de todas las R-espondinas con AP. Encontramos que la Rspo2 y la Rspo3 se unían a todos los sindecanos, mientras que la Rspo1 y la Rspo4 no mostraron ninguna unión detectable en estas condiciones (figura 2A). Ninguna de las R-espondinas se unió a células transfectadas con *Fz7*. Todas las cuatro proteínas de fusión con AP se secretaron (figura 3) y fueron activas en los ensayos de señalización por Wnt, lo cual indica que son biológicamente activas. La ausencia de unión de la Rspo1 y la Rspo4 a los sindecanos está relacionada con su actividad significativamente menor en los ensayos indicadores, en comparación con Rspo2 y -3 (Kim y otros, 2008b).

A diferencia de la Wnt5a sola, una proteína de fusión Wnt8-Fzd5 se unió a células transfectadas con *Sdc4*, lo cual sugiere que la Wnt unida a su receptor es reconocida preferentemente por este HSPG (figura 1B y 1E). Se usó esta proteína de fusión porque está estrechamente relacionada con la Wnt5a y su comportamiento puede asumirse como modelo del que tiene la Wnt5a sola en estos ensayos.

Los primeros datos sugieren que la interacción con Rspo3 fue mediada por el núcleo proteico del *Sdc4*, puesto que la unión a la superficie celular también fue observada en células transfectadas con un mutante de *Sdc4* sin GAG y lo mismo sucedió con la unión de la proteína de fusión Wnt8-Fzd5 (figura 1B y 1E). Sin embargo las investigaciones posteriores revelaron que este mutante aún contenía [S³⁵] sulfato y por tanto GAG.

Por consiguiente, tal como se demuestra aquí, la interacción Rspo3-Sdc4 requiere GAG; el *Sdc4* producido a partir de células tratadas con clorato (Keller y otros, 1989), que inhibe la sulfatación (figura 4), suprimió la unión de Rspo3 (figura 2B, 2C). La unión a glipicano también resultó dependiente de GAG (figura 1C y 1F).

Usando el dominio extracelular de *Sdc4* y hRspo3-AP purificada determinamos el valor de 0,88 nM (figura 2D) para la Kd aparente. Concluimos que las R-espondinas se unen a los sindecanos, pero no a *Fz5* o -7, o a *LRP6*, lo cual sugiere que estos HSPG pueden actuar como receptores de gran afinidad o correceptores de las R-espondinas.

Independientemente del mecanismo por el cual las R-espondinas 2 o 3 interactúan con los sindecanos 1, 2, 3 4, el especialista en la materia advertirá la necesidad de usar en cualquier análisis una proteína que esté correctamente plegada y contenga todas las modificaciones post-translacionales que requiere la actividad. Esto es independiente de si la proteína está purificada de su entorno original o expresada de forma heteróloga. El especialista en la materia tiene la capacidad y los medios suficientes para asegurar que la(s) proteína(s) contenga(n) todas las modificaciones post-translacionales necesarias y además se indican aquí. En concreto el especialista en la materia reconocerá que el uso de una proteína que produzca una respuesta funcional en un ensayo (p.ej. en los ensayos de Wnt arriba descritos) demuestra que dicha proteína contiene todas las modificaciones post-translacionales necesarias.

La Rspo3 interactúa con glipicanos humanos

En los ensayos de unión a la superficie celular encontramos que la *Rspo3* se une al glipicano-1, glipicano-2, glipicano-3, glipicano-4, glipicano-5 y glipicano-6 humanos (figura 2E).

La Rspo3 actúa en la vía de señalización Wnt/PCP durante la gastrulación

En el *Xenopus*, el *Sdc4* interviene preponderantemente en la morfogénesis mediada por Wnt/PCP (Munoz y otros, 2006; Matthews y otros, 2008) y promueve notablemente la gastrulación regulando la intercalación mediolateral de las células y la extensión convergente. Esto suscita la pregunta de si la señalización de *Rspo3* no activa la vía Wnt/b-catenina exclusivamente, como en general se cree, sino también la señalización por Wnt/PCP. De hecho la inyección de un morfolino antisentido de *Rspo3* anteriormente caracterizado (Kazanskaya y otros, 2007) indujo defectos de gastrulación (espina bífida) al dirigirlo al mesodermo dorsal (figura 5A) y a una dosis 10 veces mayor que la empleada previamente (figura 5A). Este efecto del morfolino se evitó casi completamente inyectando ARNm para *Rspo3* humana (61% de espina bífida con *Rspo3* Mo, n = 66; 4% de espina bífida con *Rspo3* Mo + h*Rspo3* ARNm, n = 45).

La gastrulación es activada principalmente por el mesodermo dorsal y la *Rspo3* y el *sdc4* muestran una expresión importante en esta región (figura 6A). La expresión del marcador mesodérmico *Xbra* en los *Rspo3* morfantos fue normal (figura 5A) y la expresión de otros marcadores mesodérmicos, incluyendo *Xbra*, *cordina*, *dkk1*, *myoD* y *ventx2* (*Xvent2*) en los tejidos de hemisferio animal inyectados con activina también lo fue (figura 6G), descartándose así que los defectos de gastrulación fueran debidos a una menor inducción del mesodermo, más que afectar en sí a la morfogénesis. El *Rspo3* Mo también bloqueó el alargamiento de los hemisferios animales inducido por activina, confirmando que la *Rspo3* es necesaria para los movimientos de extensión convergente (figura 5A).

Como es característico de los genes que regulan los movimientos de la gastrulación, la sobreexpresión de ARNm para *Rspo3* también indujo defectos de gastrulación y actuó sinérgicamente con el *Sdc4* (figura 5A, 5B y 5C). Este efecto de la sobreexpresión de *Rspo3* fue suprimido casi totalmente por el *Sdc4* dominante negativo (Munoz y otros, 2006) (figura 5B) y por un *Wnt5a* Mo (Schambony y Wedlich, 2007) (figura 5B y 5D). La *Wnt5a* promueve la señalización embrionaria por Wnt/PCP y la gastrulación en *Xenopus* (Schambony y Wedlich, 2007). En cambio los defectos de gastrulación inducidos por *Wnt11* ARNm no fueron evitados por el *Wnt5a* Mo. Esto excluye que la señalización de *Rspo3* induzca únicamente la expresión de un gen PCP-Wnt como el *Wnt11*.

Los movimientos de extensión convergente son accionados por la actividad protrusiva de las células mesodérmicas (Wallingford y otros, 2000; Winklbauer y otros, 1996). El *Rspo3* Mo inhibió la actividad protrusiva de las células mesodérmicas y ésta se recuperó coinyectando pequeñas dosis de *Rspo3* ARNm humano, confirmandose así la especificidad del morfolino (figura 5E). La señalización por Wnt/PCP activa la fosforilación de JNK para inducir los movimientos de extensión convergente (Yamanaka y otros, 2002). Por consiguiente la inyección de *Rspo3* y *Wnt5a* ARNm indujo la fosforilación de JNK en las células mesodérmicas dorsales, mientras que los respectivos morfolinicos la inhibieron (fig. 5F).

Vistos en conjunto los resultados indican que la *Rspo3* interviene en la vía de señalización Wnt/PCP durante la gastrulación y que requiere *Wnt5a* y *Sdc4*.

La Rspo3 es necesaria para la morfogénesis del cartílago de cabeza

En el curso de nuestros análisis encontramos la intervención de la *Rspo3* en otro proceso regulado por Wnt/PCP, la morfogénesis del cartílago de cabeza. Durante la morfogénesis del cartílago de cabeza los condrocitos se aplanan e intercalan formando una columna que da lugar a unos elementos cartilaginosos en forma de barra y de placa. Esta intercalación implica el alargamiento y la acumulación de los condrocitos, los cuales recuerdan mucho a las células mesodérmicas dorsales durante la gastrulación (Clement y otros, 2008; Piotrowski y otros, 1996; Schilling y otros, 1996). En embriones de pez cebra se demostró como en la gastrulación que la morfogénesis del cartílago de cabeza depende de la señalización por Wnt/PCP y de los HSPG. Las mutaciones de genes de PCP, incluyendo *Wnt5a*, *knypek*/glipicano 4/6, un transportador de sulfato activado, y dos glicosiltransferasas necesarias para la síntesis de HSPG, interfieren todas ellas en la morfogénesis del cartílago de cabeza compactando el cartílago y atrofiando la cabeza (Clement y otros, 2008; Piotrowski y otros, 1996; Topczewski y otros, 2001).

De manera similar encontramos que la inyección en embriones de *Xenopus* de *Rspo3* Mo en blastómeros animales dirigido al ectodermo (y por lo tanto a la futura cresta neural), en lugar de al mesodermo primario, induce cabezas atrofiadas y cartílago compactado (figura 7A-B). Todos los elementos cartilaginosos se hallaron en los morfantos, pero eran más cortos y gruesos (figura 7C-D), lo cual indica que el fenotipo no se debía a la diferenciación o a los defectos de migración de la cresta neural. De acuerdo con ello no hubo ningún efecto del *Rspo3* Mo en la expresión del marcador de la cresta neural (figura 8). En cambio afectó a la acumulación y al alargamiento de los condrocitos. La relación media de longitud a anchura de los condrocitos individuales se redujo de 2,4 en los renacuajos naturales hasta 1,6 en los renacuajos morfantos (figura 7E-F). El cartílago de cabeza compactado, con deficiente acumulación y alargamiento de los condrocitos, también se obtuvo tras la inyección de un *Wnt5a* Mo previamente caracterizado (figura 7G-J) (Schambony y Wedlich, 2007).

Además las dosis bajas de *Rspo3* Mo actuaron sinérgicamente induciendo este fenotipo, bien coinyectadas con dosis bajas de *Sdc4* ARNm dominante-negativo o de *Sdc4* Mo, que por sí solas no edujeron ningún fenotipo (figura 9A-C, E), o combinadas con un tratamiento suave de clorato, que inhibe la sulfatación de HSPG (figura 9D). La *Rspo3* y el *Sdc4* se coexpresan en el cartílago de cabeza durante el desarrollo del mesodermo de la cabeza, lo cual

es consistente con un rol directo en este tejido (figura 6F). Estos resultados indican que la *Rspo3* es necesaria para la morfogénesis del cartílago de cabeza, donde también interactúa funcionalmente con el *Sdc4*.

La cooperación de Rspo3 y Wnt5a es necesaria para la señalización de PCP mediada por Sdc4

Durante la señalización por Wnt/PCP ciertas combinaciones Wnt/Fzd activan rho, rac y JNK mediante Dvl (Angers y Moon, 2009; Tada y Kai, 2009), produciendo la activación del factor de transcripción FTA2 (Schambony y Wedlich, 2007; Zhou y otros, 2007). Para corroborar molecularmente la activación de Wnt/PCP ensayamos varios indicadores de la respuesta a JNK para controlar la estimulación de Wnt/PCP en los embriones de *Xenopus*. Identificamos un indicador FTA2-luciferasa de la respuesta a JNK (van Dam y otros, 1995), que controlaba fielmente la señalización por Wnt/PCP en las gástrulas.

Este indicador de FTA2 se activó con *Wnt5a* ARNm microinyectado en combinación con *Fzd7*, una combinación de receptor-ligando que media en la señalización por Wnt/PCP en *Xenopus* (Kim y otros, 2008a). También fue activado por *Rspo3* ARNm en combinación con *Fzd7* (figura 10A). En los embriones no estimulados la actividad del indicador de FTA2 resultante de la señalización endógena fue reducida por los morfolinolinos dirigidos a *Rspo3*, *Wnt5a* o *Sdc4*, pero no por el morfolino dirigido al *LRP6* (figura 10B). De manera importante la actividad indicadora endógena fue reducida por *Rspo3* Mo en medida similar al *Wnt5a* y al *Sdc4* Mo, lo cual es consistente con el efecto del *Rspo3* Mo en la gastrulación, en la actividad protrusiva de las células mesodérmicas y en la fosforilación de JNK (figura 10B, izquierda). Este efecto del *Rspo3* Mo en la actividad endógena del indicador de FTA2 fue evitado por la inyección de *Rspo3* ARNm humano, confirmándose nuevamente la especificidad del Mo (figura 11).

La actividad indicadora en embriones estimulados exógenamente por *Wnt5a* ARNm fue bloqueada asimismo por morfolinolinos dirigidos a *Rspo3* y *Sdc4*. Un *LRP6* Mo, que inhibe potencialmente la señalización Wnt canónica (Hassler y otros, 2007), no tuvo ningún efecto en la señalización de *Wnt5a* ARNm (figura 10B), confirmando que el indicador es específico de PCP. Esto revela que la señalización por *Wnt5a*/FTA2 en los embriones tempranos de *Xenopus* requiere *Rspo3* así como *Sdc4*. Como los datos fenotípicos sugerían que también se daba el caso inverso, es decir, que la señalización de *Rspo3* depende del *Wnt5a* endógeno (figura 5D), confirmamos que la actividad indicadora de FTA2 estimulada por *Fzd7*/*Rspo3* fue realmente reducida por morfolinolinos dirigidos a *Wnt5a* y *Sdc4*, pero no por el morfolino dirigido al *LRP6* (figura 10C). El Dvl tiene un papel crítico en la señalización por Wnt/PCP. Cabe señalar que la unión del Dvl a *Sdc4* es necesaria para la señalización de Fz7-PCP en el *Xenopus* (Munoz y otros, 2006). Por tanto ensayamos si la señalización de *Rspo3*/FTA2 era afectada por el silenciamiento del Dvl. La inyección de un *Dvl2* Mo disminuyó la actividad endógena del indicador de FTA2 estimulada tanto por *Wnt5a* como por *Fzd7*/*Rspo3* (figura 10D).

De estos datos de ganancia y pérdida funcional concluimos que en embriones tempranos de *Xenopus* i) la *Rspo3* es necesaria para la señalización por Wnt/PCP, ii) que su señalización requiere *Sdc4* y más adelante en la cadena de señalización su efector Dvl, lo cual es consistente con la función de un receptor de *Rspo3*, y iii) que *Wnt5a* y *Rspo3* se necesitan mutuamente durante la señalización por Wnt/PCP.

Se realizaron ensayos adicionales para determinar la unión de las R-espondinas 1-4 a los sindecanos 1-4. De estos ensayos se puede concluir que la *Rspo2* y la *Rspo3* se unen a los cuatro sindecanos, pero en las condiciones del ensayo la *Rspo1* y la *Rspo4* no se unen a ninguno de los sindecanos (figura 2A).

La Rspo3 induce la endocitosis mediada por clatrina que requiere la señalización por Wnt/PCP

Una característica distintiva de los sindecanos es su capacidad para inducir la endocitosis tras la unión al ligando, lo cual es esencial p.ej. para la transducción de la señal del FGF (Fuki y otros, 2000; Li y otros, 2006; Tkachenko y otros, 2004; Wittrup y otros, 2009). Además hay pruebas de que la señalización por Wnt se procesa a través de un compartimento endocítico y de que la incorporación del complejo receptor de Wnt es una etapa fundamental en la señalización por Wnt, tanto canónica como no canónica (comprobado en (Kikuchi y Yamamoto, 2007)). Esto planteó la posibilidad de que el mecanismo molecular por el cual la *Rspo3* promueve la señalización por Wnt consistiese en inducir *Sdc4* e inducir la incorporación del complejo receptor de Wnt. Los ensayos de incorporación con *Rspo3* recombinante marcada con SNAP549 demostraron efectivamente que la proteína se incorpora en el intervalo de 1 h tras la aplicación en células de hemisferio animal de *Xenopus*, pues se encontró en vesículas intracelulares (figura 12A). La endocitosis de *Rspo3* fue inhibida por los morfolinolinos contra *Sdc4*, *Fz7*, pero no contra *Wnt5a* o *Lrp6*, lo cual es consistente con su proceso de incorporación mediante un complejo *Sdc4*/*Fz7*. Con el fin de descartar los efectos inespecíficos de los morfolinolinos en la endocitosis controlamos la absorción de dextrano-fluorescente, que quedó completamente inalterada (figura 13A, 13B).

El Dvl tiene un papel clave en la endocitosis durante la señalización por Wnt/PCP y en la señalización por Wnt es incorporado por las vesículas endocíticas (Chen y otros, 2003; Kim y otros, 2008a; Kishida y otros, 2007; Yu y otros, 2007). Por lo tanto controlamos la acumulación de Dvl-GFP en las vesículas tras la estimulación. En las células de hemisferio animal la Dvl-GFP muestra una tinción difusa, pero tras la coinyección de *Fz7* y *Rspo3* ARNm se acumuló en estructuras punteadas. Esta acumulación fue bloqueada por morfolinolinos contra *Sdc4*, *Wnt5a*, pero no contra *Lrp6* (figura 12B). Estos resultados corroboran que la *Rspo3* induce la endocitosis del complejo receptor de Wnt y del Dvl.

Los hallazgos suscitaron la cuestión de si la endocitosis mediada por Rspo3 era meramente un epifenómeno, p.ej. de depuración del receptor, o si la incorporación era necesaria para que prosiguiera la señalización por Wnt/PCP. Para averiguarlo tratamos células de hemisferios animales con la proteína Rspo3 y 1 h más tarde controlamos la incorporación de Rspo3 (en células disociadas) o realizamos la tinción para fosfo-JNK (en explantes intactos) como lectura de la activación de Wnt/PCP. La proteína marcada se incorporó después del tratamiento con Rspo3 y ello fue acompañado por la inducción de fosfo-JNK nuclear, lo cual es consistente con activación de Wnt/PCP (figura 12C-D, arriba). Cabe señalar que el bloqueo de la endocitosis mediada por clatrina con el uso de un morfolino dirigido al adaptador de clatrina *AP2μ2* (Borner y otros, 2007; Motley y otros, 2003; Yu y otros, 2007) causó la acumulación de Rspo3 en la superficie celular y dañó la incorporación y la fosforilación de JNK (figura 12C). Este desacoplamiento de la unión de Rspo3 procedente de la endocitosis es una prueba convincente de la importancia que la incorporación tiene para la señalización.

El *Rab5* ARNm dominante negativo, que inhibe la endocitosis mediada tanto por clatrina como por caveolina (Shin y otros, 2005), también bloqueó la incorporación y la inducción de fosfo-JNK nuclear. Del mismo modo, el inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina monodansilcadaverina (MDC) (Schlegel y otros, 1982) bloqueó la incorporación de Rspo3 y la inducción de fosfo-JNK nuclear (figura 12D). En cambio los inhibidores de la endocitosis mediada por caveolina, incluyendo la *caveolina* ARNm dominante negativa (Sanguinetti y Mastick, 2003), así como el tratamiento con filipina y nistatina (Rothberg y otros, 1992) no tuvieron ningún efecto en la incorporación de Rspo3 y en la acumulación de fosfo-JNK, aunque redujeron significativamente la absorción de fluoresceína-dextrano (figura 13C, 13D).

Concluimos que la Rspo3 induce la endocitosis mediada por clatrina y que esta incorporación es fundamental para la señalización por Wnt/PCP.

Desde su descubrimiento como nuevos efectores de Wnt, las R-espondinas han atraído una atención creciente y se progresado mucho en la caracterización de su biología y su implicación en enfermedades. En cambio su modo de señalización y la identidad de su receptor eran poco entendidas y controvertidas. Nuestro estudio arroja luz sobre el mecanismo de acción de las R-espondinas y sus principales hallazgos son i) la detección de los sindecanos como receptores de Rspo2 y Rspo3; ii) la implicación de Rspo2 y Rspo3 en la señalización por Wnt/PCP; iii) el papel esencial de Rspo2 y Rspo3 en la gastrulación del *Xenopus* y en la morfogénesis del cartílago de cabeza; iv) su mecanismo de acción al inducir la endocitosis mediada por clatrina.

La Rspo3 se une al sindecano-4

Proporcionamos líneas de evidencia independientes de que el Sdc4 actúa como receptor o correceptor de Rspo3, incluyendo la unión a la superficie celular, unión de proteínas recombinantes, cooperación funcional y necesidad de Sdc4 para la señalización de Rspo3/PCP *in vivo*. La afinidad de Rspo3 por Sdc4 es similar a la unión del bFGF a Sdc3 (Kd = 0,5 nM) y esta unión requiere cadenas de heparina (Chernousov y Carey, 1993). Otro ejemplo es la pleiotrofina, que se une a Sdc3 con 0,6 nM de Kd (Raulo y otros, 1994). Por otra parte hay varios ligandos que se unen a sindecanos con una afinidad 10-100 veces inferior, por ejemplo la catepsina G (56 nM), la elastasa (35 nM) (Kainulainen y otros, 1998) o la interleucina 8 (23 nM) (Halden y otros, 2004). Por lo tanto la Rspo3 se puede añadir a la lista de ligandos de gran afinidad por los sindecanos.

Considerando los numerosos estudios que involucran los sindecanos en la señalización del factor de crecimiento y en la interacción con la matriz extracelular, es sorprendente que los ratones mutantes carentes de *Sdc1*, 3, o 4 se desarrollen en general sin anomalías (Alexander y otros, 2000; Ishiguro y otros, 2000; Kaksonen y otros, 2002). En cambio los ratones mutantes de R-espondina presentan anomalías bastante obvias, incluyendo inversión de sexo (*Rspo1*), defectos de las extremidades y cráneo-faciales (*Rspo2*), letalidad embrionaria (*Rspo3*) y anoniquia (*Rspo4*). Una razón probable de los fenotipos más bien benignos de los mutantes de sindecano sería su expresión ubicua y elevada, que puede promover la compensación funcional. Sin embargo un examen más cercano revela una serie de roles biológicos coincidentes entre R-espondinas y sindecanos en los vertebrados, más allá de los descritos en nuestro estudio. La *Rspo3* y el *Sdc2* son esenciales para la angiogénesis (Chen y otros, 2004; Kazanskaya y otros, 2008) y la *Rspo2*, *Sdc3* y *Sdc4* regulan la diferenciación miogénica (Cornelison y otros, 2004; Kazanskaya y otros, 2004). El *Sdc1* es necesario para la activación de los queratinocitos durante la cicatrización de heridas y los pacientes con deficiencia de *Rspo1* presentan defectos de la piel (Parma y otros, 2006; Stepp y otros, 2002). Por último *Rspo2*, *Rspo3* y *Sdc1* promueven todos ellos la génesis de tumores mamarios en los ratones (Alexander y otros, 2000; Lowther y otros, 2005; Theodorou y otros, 2007).

La Rspo3 interviene en la señalización por Wnt/PCP en la embriogénesis del Xenopus

En los vertebrados inferiores los HSPG juegan un papel preponderante en la señalización por Wnt/PCP y en la morfogénesis. Los *glicicanos 4/6* (*Knypek*) en el pez cebra y el *Sdc4* en el *Xenopus* regulan los movimientos de gastrulación, el cierre del tubo neural y la migración de la cresta neural (Munoz y otros, 2006; Topczewski y otros, 2001). En la gastrulación del *Xenopus* el *Sdc4* actúa conjuntamente con Fz7 mediando la extensión convergente y la señalización por PCP (Munoz y otros, 2006). Demostramos que la señalización de Sdc4/PCP en las gástrulas requiere Rspo3, lo cual revela que la función de la R-espondina no se limita a la señalización por Wnt/ β -catenina y

es consistente con la función receptora/correceptora de Rspo3 propuesta para el Sdc4. De acuerdo con la noción de que las R-espondinas necesitan Wnt para efectuar la señal, encontramos que la Rspo3 depende del Wnt5a, el cual como es sabido controla la forma y el movimiento de las células durante la gastrulación del pez cebra y del *Xenopus* involucrando la vía de PCP para activar la JNK y el FTA2 (Cha y otros, 2008; Kilian y otros, 2003; Ma y Wang, 2007; Schambony and Wedlich, 2007).

Además de en la gastrulación, demostramos que Rspo3 y Sdc4 actúan conjuntamente en otro proceso regulado, como es sabido, por la vía de señalización Wnt/PCP, es decir, en la morfogénesis del cartílago de cabeza. En el pez cebra mutante de varios componentes de Wnt/PCP la morfogénesis de los condrocitos es deficiente y no pueden polarizarse ni intercalarse, por lo cual presenta un menor alargamiento de los elementos cartilaginosos larvarios (Clement y otros, 2008; LeClair y otros, 2009; Topczewski y otros, 2001). Demostramos que los embriones de *Xenopus* con función disminuida de Rspo3, Sdc4 o Wnt5a presentan el mismo fenotipo, planteando la posibilidad de que estos genes puedan estar implicados de manera más general en la señalización PCP, incluyendo posiblemente la formación del esqueleto adulto. Como los ratones mutantes de Rspo3 mueren por defectos angiogénicos durante la organogénesis temprana (Aoki y otros, 2006; Kazanskaya y otros, 2008), para este tipo de análisis se necesitará una mutagénesis condicional.

La Rspo3 induce la endocitosis de sindecano-4 para activar la señalización por Wnt/PCP

Está bien documentado que la unión del Wnt a su receptor Fz activa la incorporación de ligando y receptor (Chen y otros, 2003; Dubois y otros, 2001; Kurayoshi y otros, 2007; Rives y otros, 2006). Ahora se han recogido suficientes pruebas de que la endocitosis inducida por Wnt no es solo un mecanismo para depurar complejos receptor-ligando o para transportar proteínas Wnt por transcitosis, sino que la incorporación es una etapa obligatoria en la activación de la transducción de señales. En la vía de β -catenina la incorporación de Wnt-Fz es necesaria para una señalización correcta (Blitzer y Nusse, 2006; Seto y Bellen, 2006) y la endocitosis de LRP6 mediada por caveolas tiene un papel crítico en este proceso (Yamamoto y otros, 2006). La incorporación también es necesaria para la señalización PCP. El dominio DEP del Dvl media en la señalización PCP e interactúa con el complejo adaptador de clatrina 2 (AP-2), el cual es necesario para la incorporación de Frizzled-4 y la señalización PCP (Yu y otros, 2007). Un regulador crítico en este contexto es la β -arrestina, que regula la endocitosis de Fz y la señalización PCP en el *Xenopus* (Chen y otros, 2003; Kim y Han, 2007). Análogamente, una característica de los sindecanos es que su unión a los ligandos induce endocitosis (Fuki y otros, 1997; Fuki y otros, 2000; Tkachenko y otros, 2004) y esto va íntimamente vinculado a la iniciación de la señalización (Li y otros, 2006).

Proporcionamos pruebas de que la Rspo3 promueve la señalización por Wnt a través de la endocitosis mediada por clatrina, una vía de incorporación anteriormente implicada en la señalización por Wnt (Blitzer y Nusse, 2006; O'Connell y otros 2010; Yu y otros, 2007).

Nuestros datos corroboran la importancia de la endocitosis en la transducción de señales por Wnt y sugieren un modelo (fig. 14) en que el sindecano actúa como un correceptor cuya incorporación es regulada por R-espondina.

Aunque el presente estudio revela su papel en la señalización por Wnt/PCP, la Rspo3 también es un potente activador de la señalización por Wnt/ β -catenina. Nuestros datos indican claramente que en la señalización por Wnt/PCP la Rspo3 interviene independientemente del Lrp6, lo cual coincide con la noción de que el Lrp6 dirige la señalización por Wnt directamente hacia la vía de β -catenina. Los resultados indican que las R-espondinas sirven para amplificar la señalización del ligando Wnt en la β -catenina, así como la señalización PCP.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centro alemán de investigación del cáncer
 <120> Sindecanos como receptores de Rspo2 y Rspo3
 <130> 46558P WO
 <160> 13
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (1)..(272)
 <223> R-espondina-3 humana
 <400> 1

ES 2 573 643 T3

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

Met His Pro Asn Val Ser Gln Gly Cys Gln Gly Gly Cys Ala Thr Cys
35 40 45

Ser Asp Tyr Asn Gly Cys Leu Ser Cys Lys Pro Arg Leu Phe Phe Ala
50 55 60

Leu Glu Arg Ile Gly Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys
65 70 75 80

Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr
85 90 95

Lys Cys Lys Ala Asp Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr
100 105 110

Lys Cys Lys Ser Gly Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn
115 120 125

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

Ile Val His Cys Glu Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr
145 150 155 160

Lys Lys Gly Lys Thr Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val
165 170 175

Arg Glu Ile Ile Gln His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro
180 185 190

Thr Asn Glu Thr Arg Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys Gln Lys
195 200 205

Gly Glu Arg Gly Lys Lys Gly Arg Glu Arg Lys Arg Lys Lys Pro Asn
210 215 220

Lys Gly Glu Ser Lys Glu Ala Ile Pro Asp Ser Lys Ser Leu Glu Ser
225 230 235 240

Ser Lys Glu Ile Pro Glu Gln Arg Glu Asn Lys Gln Gln Gln Lys Lys
245 250 255

Arg Lys Val Gln Asp Lys Gln Lys Ser Val Ser Val Ser Thr Val His
260 265 270

ES 2 573 643 T3

<210> 2
 <211> 2089
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (1)..(2089)
 <223> R-espondina-3 humana
 <400> 2

5

10

```

ggagcgtctc ctgctcgcgc acgccagaag cagctcgggg tctctccgcc gccgccgccg      60
ctgccccgcc cggatccccgc ctgcggcagt tgccgcacaa catgctacct gcggccgccc      120
cggcggctcc tggaaccccg gttcgcggcg atgccagcca cccagcgaa gccgccgcag      180
ttcagtgttt ggataatttg aaagtacaat agttggtttc cctgtccacc cgccccactt      240
cgcttgccat cacagcacgc ctatcggatg tgagaggaga agtcccgctg ctcgggcact      300
gtctatatac gcctaacacc tacatatatt ttaaaaacat taaatataat taacaatcaa      360
aagaaagagg agaaaggaag ggaagcatta ctgggttact atgcacttgc gactgatttc      420
ttggcttttt atcattttga actttatgga atacatcggc agccaaaacg cctcccgggg      480
aaggcggccag cgaagaatgc atcctaactg tagtcaaggc tgccaaggag gctgtgcaac      540
atgctcagat tacaatggat gtttgtcatg taagcccaga ctatTTTTTg ctctggaaag      600
aattggcatg aagcagattg gagtatgtct ctcttcatgt ccaagtggat attatggaac      660
tcgatatcca gatataaata agtgtacaaa atgcaaagct gactgtgata cctgtttcaa      720
caaaaatttc tgcacaaaat gtaaaagtgg attttactta caccttggaag agtgccttga      780
    
```

ES 2 573 643 T3

caattgccca gaagggttgg aagccaacaa ccatactatg gagtgtgtca gtattgtgca 840
ctgtgaggtc agtgaatgga atccttggag tccatgcacg aagaagggaa aaacatgtgg 900
cttcaaaaga gggactgaaa cacgggtccg agaaataata cagcatcctt cagcaaaggg 960
taacctgtgt cccccaacaa atgagacaag aaagtgtaca gtgcaaagga agaagtgtca 1020
gaagggagaa cgaggaaaaa aaggaagggg gaggaaaaga aaaaaaccta ataaaggaga 1080
aagtaaagaa gcaataacctg acagcaaaag tctggaatcc agcaaagaaa tcccagagca 1140
acgagaaaac aaacagcagc agaagaagcg aaaagtccaa gataaacaga aatcggtatc 1200
agtcagcact gtacactaga gggttccatg agattattgt agactcatga tgctgctatc 1260
tcaaccagat gccaggaca ggtgctctag ccattaggac cacaatgga catgtcagtt 1320
attgctctgt ctaaacaaca ttcccagtag ttgctatatt cttcatacaa gcatagttaa 1380
caacaaagag ccaaaagatc aaagaagggg tactttcaga tggttgtctt gtgtgcttct 1440
ctgcattttt aaaagacaag acattcttgt acatattatc aataggctat aagatgtaac 1500
aacgaaatga tgacatctgg agaagaaaca tcttttcctt ataaaaatgt gttttcaagc 1560
tgttgtttta agaagcaaaa gatagttctg caaattcaaa gatacagtat cccttcaaaa 1620
caaataggag ttcaggggaag agaaacatcc ttcaaaggac agtgttgttt tgaccgggag 1680
atctagagag tgctcagaat tagggcctgg catttggaat cacaggattt atcatcacag 1740
aaacaactgt ttttaagatta gttccatcac totcatctcg tatttttata agaaacacaa 1800
gagtgcatac cagaattgaa tataccatat gggattggag aaagacaaat gtggaagaaa 1860
tcatagagct ggagactact tttgtgcttt acaaaaactgt gaaggattgt ggtcacctgg 1920
aacaggtctc caatctatgt tagcactatg tggctcagcc tctgttacct cttggattat 1980
atatcaacct gtaaactatg gcctgtaact tacttccaaa aacaaaatca tacttattag 2040
aagaaaattc tgattttata aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2089

<210> 3

<211> 243

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Característica miscelánea

<222> (1)..(243)

10 <223> R-espondina-2 humana

<400> 3

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

ES 2 573 643 T3

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

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 Leu 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

- <210> 4
- <211> 3149
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> Característica miscelánea
- <222> (1)..(3149)
- 10 <223> R-espondina-2 humana
- <400> 4

ES 2 573 643 T3

agcctagact tagatgcctt ggaccacagc accacctact tatagaagca tcccaagcct 60
 cagccggtct gcattctccat cggaaagtgc gcttgccaca tcccttcgga tcaacttcgtc 120
 ctcccagagag cgttctgcct tctacagctc ggaaagaaag aaatcttagc tgtgaagtga 180
 ccgtggagaa agcgcaggaa gcgacacaat tggttaggga ggagagagat gtgagcgggc 240
 gcaccccttg cctggggacc gcgctcgcgg gcggggacgg agcatcccag tggctgcacc 300
 cgccgctccg cgctcctgcc tggcgtcggc aaccccgcgg cggccgctgg aattccagag 360
 ctgccaggcg ctcccagccg gtctcggcaa acttttcccc agcccacgtg ctaaccaagc 420
 ggctcgcctc ccgagcccgg gatggagcac cgcgcctagg gaggccgcgc cggccgagac 480
 gtgcgcacgg ttcgtggcgg agagatgctg atcgcgctga actgaccggg gcggcccggg 540
 ggtgagtggc gagtctccct ctgagtcctc ccagcagcg cggccggcgc cggctctttg 600
 ggcgaaccct ccagttccta gactttgaga ggcgtctctc ccccgcccga ccgcccagat 660
 gcagtttcgc cttttctcct ttgccctcat cattctgaac tgcattgatt acagccactg 720
 ccaaggcaac cgatggagac gcagtaagcg agctagttat gtatcaaata ccatttgcaa 780
 gggttgtttg tcttgttcaa aggacaatgg gtgtagccga tgtcaacaga agttgttctt 840
 cttccttcga agagaaggga tgcgccagta tggagagtgc ctgcattcct gcccatccgg 900
 gtactatgga caccgagccc cagatatgaa cagatgtgca agatgcagaa tagaaaactg 960
 tgattcttgc tttagcaaag acttttgtac caagtgcaaa gtaggctttt atttgcatag 1020
 aggccggttc tttgatgaat gtccagatgg ttttgcacca ttagaagaaa ccatggaatg 1080
 tgtggaagga tgtgaagttg gtcattggag cgaatgggga acttgtagca gaaataatcg 1140
 cacatgtgga tttaaatggg gtctggaaac cagaacacgg caaattgtta aaaagccagt 1200
 gaaagacaca atactgtgtc caaccattgc tgaatccagg agatgcaaga tgacaatgag 1260
 gcattgtcca ggaggggaaga gaacaccaa ggccgaaggag aagaggaaca agaaaaagaa 1320
 aaggaagctg atagaaaggg cccaggagca acacagcgtc ttcctagcta cagacagagc 1380
 taaccaataa aacaagagat ccggtagatt tttaggggtt tttgtttttg caaatgtgca 1440
 caaagctact ctccactcct gcacactggt gtgcagcctt tgtgctgctc tgcccagtat 1500
 ctgttcccag taacatggtg aaaggaagca ccaccagcat ggcccctgtg ttatttatgc 1560
 tttgatttga atctggagac tgtgaaggca ggagtaagtg cacagcccgt gacttggtc 1620
 agtgtgtgct gagagaatcc gtccccggca ccatggacat gctagaggtg tgaggctgca 1680
 gaacaccgct ggaggacgga cttgtgccta tttatgtgaa agaagatgct tggcaggcaa 1740
 tgcgctactc actcgtgacc tttatttctc acattgtgca ttttcaagga tatgtttgtg 1800

ES 2 573 643 T3

tggatatctg cttagtgtta ccacatggta ttctcagcat gttaccttca cactgttgtg 1860
 cgatgaaact gcttttagct gaggatatgc tctggaaatt cctgctcagt ttcactgcag 1920
 ccctaatatg tacatatact gcaggagcta catataaagc tcttatttac tgtatattta 1980
 tgctttcttg tgggtaacaa gtcataacctg attaatatga tgccactttg tttctagtgg 2040
 ttcctaacc cttgtctgat aaatgacttt tctagtttgg ggaattgaca cttgttttgt 2100
 tgcctcttga aacttttttt ttttcccctc attgtgggct tatttctcat tgtaagggta 2160
 ggataaacta gtttttgtat atagagtcaa atgaccagtg tcaaagagtt tgcatattgg 2220
 gtagaccttc tccactccac atgtcccaca catatagata aagcagcagg cggcatctgg 2280
 caatcagaag cccaaactgc ctttgagtct aagatgtgat gactttgatg aacacaact 2340
 gaaaacatga gggactatat ccagtcactt gtagccagtt tcacaggcca gctacagaat 2400
 tgtccaaaca aacattatct ctgactgcaa tttttttccc ccaaatttaa agcaatccct 2460
 ggctttaaat gacaaggcac ctaccaatgt tcttgggtca ctgaagaagc tactaccatg 2520
 agcctgggca tagaatttta ggagataaaa ggatgaattt ctgtgactgc cagtcagatc 2580
 ttaacagggt tctgttgagc cagaatctgt ttcagatcca agatggagag gaacactatg 2640
 gaaacttccc aggtgacttt cagagcagtt gtttcaaaca catcattgtc cttttagggg 2700
 aaccagtttt tagaagggtg tgaattggct ttttcacaaa gcatgattat cttcctggct 2760
 gatccaggag aaaattagaa cagaaaaata atggttgtgg attttgaaac aaagcaaggt 2820
 aaagcctttt ttttttcacc ttgcattggc aaaactacct cttcagtggt ttttaactttt 2880
 gattcaaaaag catcttacca ataaggataa atatcatata catcgttatg aaaatattgc 2940
 tatgagataa taagccacat atgaatggtg tatacaactt tagggtttac atttaacct 3000
 gaagtgttac ctctttcat gtctatttac actattttcc catttactaa gtggggaggg 3060
 ggtctcctta tatagtgctt catcgttaat aagtcaatac ctggtgttcc tgggatgttc 3120
 ttttttgtgc attaaaaact tcaaaaatta 3149

<210> 5
 <211> 310
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (1)..(310)
 10 <223> sindecano-1 humano
 <400> 5

Met Arg Arg Ala Ala Leu Trp Leu Trp Leu Cys Ala Leu Ala Leu Ser
 1 5 10 15

Leu Gln Pro Ala Leu Pro Gln Ile Val Ala Thr Asn Leu Pro Pro Glu

15 20 25 30

ES 2 573 643 T3

Asp Gln Asp Gly Ser Gly Asp Asp Ser Asp Asn Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45
 Ala Gly Ala Leu Gln Asp Ile Thr Leu Ser Gln Gln Thr Pro Ser Thr
 50 55 60
 Trp Lys Asp Thr Gln Leu Leu Thr Ala Ile Pro Thr Ser Pro Glu Pro
 65 70 75 80
 Thr Gly Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ser Thr Ser Thr Leu Pro Ala Gly
 85 90 95
 Glu Gly Pro Lys Glu Gly Glu Ala Val Val Leu Pro Glu Val Glu Pro
 100 105 110
 Gly Leu Thr Ala Arg Glu Gln Glu Ala Thr Pro Arg Pro Arg Glu Thr
 115 120 125
 Thr Gln Leu Pro Thr Thr His Gln Ala Ser Thr Thr Thr Ala Thr Thr
 130 135 140
 Ala Gln Glu Pro Ala Thr Ser His Pro His Arg Asp Met Gln Pro Gly
 145 150 155 160
 His His Glu Thr Ser Thr Pro Ala Gly Pro Ser Gln Ala Asp Leu His
 165 170 175
 Thr Pro His Thr Glu Asp Gly Gly Pro Ser Ala Thr Glu Arg Ala Ala
 180 185 190
 Glu Asp Gly Ala Ser Ser Gln Leu Pro Ala Ala Glu Gly Ser Gly Glu
 195 200 205
 Gln Asp Phe Thr Phe Glu Thr Ser Gly Glu Asn Thr Ala Val Val Ala
 210 215 220
 Val Glu Pro Asp Arg Arg Asn Gln Ser Pro Val Asp Gln Gly Ala Thr
 225 230 235 240
 Gly Ala Ser Gln Gly Leu Leu Asp Arg Lys Glu Val Leu Gly Gly Val
 245 250 255
 Ile Ala Gly Gly Leu Val Gly Leu Ile Phe Ala Val Cys Leu Val Gly
 260 265 270
 Phe Met Leu Tyr Arg Met Lys Lys Lys Asp Glu Gly Ser Tyr Ser Leu
 275 280 285

ES 2 573 643 T3

Glu Glu Pro Lys Gln Ala Asn Gly Gly Ala Tyr Gln Lys Pro Thr Lys
 290 295 300

Gln Glu Glu Phe Tyr Ala
 305 310

- <210> 6
- <211> 3217
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> Característica miscelánea
- <222> (1)..(3217)
- 10 <223> sindecano-1 humano
- <400> 6

```

ggccgggaga cctggcggag ctgggggtgg ggggccagtt tttgcaacgg ctaaggaagg      60
gcctgtgggt ttattataag gcggagctcg gcgggagagg tgcgggccga atccgagccg      120
agcggagagg aatccggcag tagagagcgg actccagccg gcggaccctg cagccctcgc      180
ctgggacagc ggcgcgctgg gcaggcggcc aagagagcat cgagcagcgg aaccgcgaa      240
gccggcccgc agccgcgacc cgcgcagcct gccgctctcc cgccgcccgt ccgggcagca      300
tgaggcgcgc ggcgctctgg ctctggctgt gcgcgctggc gctgagcctg cagccggccc      360
tgccgcaaat tgtggctact aatttgcccc ctgaagatca agatggctct ggggatgact      420
ctgacaactt ctccggctca ggtgcaggtg ctttgcaaga tatcaccttg tcacagcaga      480
ccccctccac ttggaaggac acgcagctcc tgacggctat tcccacgtct ccagaacca      540
ccggcctgga ggctacagct gcctccacct ccaccctgcc ggctggagag gggcccaagg      600
agggagaggc tgtagtctct ccagaagtgg agcctggcct caccgcccgg gagcaggagg      660
ccaccccccg acccagggag accacacagc tcccgaccac tcatcaggcc tcaacgacca      720
cagccaccac ggcccaggag cccgccacct cccaccccca cagggacatg cagcctggcc      780
accatgagac ctcaaccctt gcaggacca gccaaactga ccttcacact cccacacag      840
aggatggagg tccttctgcc accgagaggg ctgctgagga tggagcctcc agtcagctcc      900
cagcagcaga gggctctggg gagcaggact tcaccttga aacctcgggg gagaatacgg      960
ctgtagtggc cgtggagcct gaccgcccga accagtcccc agtggatcag ggggccacgg     1020
gggcctcaca gggcctcctg gacaggaaag aggtgctggg aggggtcatt gccggaggcc     1080
tcgtggggct catctttgct gtgtgcctgg tgggtttcat gctgtaccgc atgaagaaga     1140
aggacgaagg cagctactcc ttggaggagc cgaaacaagc caacggcggg gcctaccaga     1200
agcccaccaa acaggaggaa ttctatgcct gacgcggggag ccatgcgccc cctccgcct     1260
gccactcact aggccccac ttgcctcttc cttgaagaac tgcaggccct ggcctcccct     1320
    
```

ES 2 573 643 T3

gccaccaggc cacctcccca gcattccagc ccctctggtc gctcctgcc acggagtcgt 1380
 ggggtgtgct gggagctcca ctctgcttct ctgacttctg cctggagact tagggcacca 1440
 ggggtttctc gcataggacc tttccaccac agccagcacc tggcatcgca ccattctgac 1500
 tcggtttctc caaactgaag cagcctctcc ccagggtccag ctctggaggg gagggggatc 1560
 cgactgcttt ggacctaaat ggcctcatgt ggctggaaga tcctgcgggt ggggcttggg 1620
 gctcacacac ctgtagcact tactggtaggt accaagcatc ttgggggggt ggccgctgag 1680
 tggcagggga caggagtcca ctttgtttcg tggggaggtc taatctagat atcgacttgt 1740
 ttttgacat gtttcctcta gttctttgtt catagcccag tagacctgt tacttctgag 1800
 gtaagttaag taagttgatt cggtatcccc ccatcttgct tccctaactc atggtcggga 1860
 gacagcatca gggtaagaa gacttttttt tttttttttt aaactaggag aaccaaactc 1920
 ggaagccaaa atgtaggctt agtttgtgtg ttgtctcttg agtttgtcgc tcatgtgtgc 1980
 aacagggtat ggactatctg tctgggtggc ccgtttctgg tggctctgtg gcaggctggc 2040
 cagtccaggc tgccgtgggg ccgccgcctc tttcaagcag tcgtgcctgt gtccatgcgc 2100
 tcagggccat gctgaggcct gggccgctgc cacgttgag aagcccgtgt gagaagtgaa 2160
 tgctgggact cagccttcag acagagagga ctgtaggag ggcggcaggg gcctggagat 2220
 cctcctgcag accacgcccg tcctgcctgt ggcgcctct ccaggggctg cttcctcctg 2280
 gaaattgacg aggggtgtct tgggcagagc tggctctgag cgcctccatc caaggccagg 2340
 ttctccgtta gctcctgtgg cccaccctg ggccctgggc tggaatcagg aatattttcc 2400
 aaagagtgat agtcttttgc ttttgcaaaa actctactta atccaatggg ttttccctg 2460
 tacagtagat tttccaaatg taataaactt taatataaag tagtcctgtg aatgccactg 2520
 ccttgccttc ttgcctctgt gctgtgtgtg acgtgaccgg acttttctgc aaacaccaac 2580
 atgttgggaa acttgctcg aatctctgtg ccttcgtctt tcccatgggg agggattctg 2640
 gttccagggc ccctctgtgt atttgctttt ttgttttggc tgaaattctc ctggaggtcg 2700
 gtaggttcag ccaaggtttt ataaggctga tgtcaatttc tgtgttgcca agctccaagc 2760
 cccatcttct aaatggcaaa ggaaggtgga tggccccagc acagcttgac ctgaggctgt 2820
 ggtcacagcg gaggtgtgga gccgaggcct accccgcaga caccttgac atcctcctcc 2880
 caccoggctg cagagccag agggccccag cccagggctc ctgcacttac ttgcttattt 2940
 gacaacgttt cagcgactcc gttggccact ccgagaggtg ggccagtctg tggatcagag 3000
 atgcaccacc aagccaaggg aacctgtgtc cggtatcga tactgcgact ttctgcctgg 3060
 agtgtatgac tgcacatgac tcgggggtgg ggaaaggggt cggctgacca tgctcatctg 3120
 ctggtcctgt ggacggtgcc caagccagag gctgggttca tttgtgtaac gacaataaac 3180
 ggtacttgtc atttcgggca aaaaaaaaa aaaaaaa 3217

<210> 7
 <211> 201
 <212> PRT

ES 2 573 643 T3

<213> Homo sapiens
 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (1)..(201)
 <223> sindecano-2 humano
 <400> 7

5

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

Ser Ala Glu Ser Arg Ala Glu Leu Thr Ser Asp Lys Asp Met Tyr Leu
 20 25 30

Asp Asn Ser Ser Ile Glu Glu Ala Ser Gly Val Tyr Pro Ile Asp Asp
 35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ala Asp Glu Asp Val Glu
 50 55 60

Ser Pro Glu Leu Thr Thr Ser Arg Pro Leu Pro Lys Ile Leu Leu Thr
 65 70 75 80

Ser Ala Ala Pro Lys Val Glu Thr Thr Thr Leu Asn Ile Gln Asn Lys
 85 90 95

Ile Pro Ala Gln Thr Lys Ser Pro Glu Glu Thr Asp Lys Glu Lys Val
 100 105 110

His Leu Ser Asp Ser Glu Arg Lys Met Asp Pro Ala Glu Glu Asp Thr
 115 120 125

Asn Val Tyr Thr Glu Lys His Ser Asp Ser Leu Phe Lys Arg Thr Glu
 130 135 140

Val Leu Ala Ala Val Ile Ala Gly Gly Val Ile Gly Phe Leu Phe Ala
 145 150 155 160

Ile Phe Leu Ile Leu Leu Leu Val Tyr Arg Met Arg Lys Lys Asp Glu
 165 170 175

Gly Ser Tyr Asp Leu Gly Glu Arg Lys Pro Ser Ser Ala Ala Tyr Gln
 180 185 190

Lys Ala Pro Thr Lys Glu Phe Tyr Ala
 195 200

10 <210> 8
 <211> 3485
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 15 <221> Característica miscelánea
 <222> (1)..(3485)
 <223> sindecano-2 humano
 <400> 8

ES 2 573 643 T3

agtcgcccag gggagcccgg agaagcaggc tcaggagggga gggagccaga ggaaaagaag 60
 aggaggagaa ggaggaggac ccggggaggg aggcgcggcg cgggaggagg aggggcgag 120
 ccgcgaggacc agtggccccg cttggacgcg ctgctctcca gatacccccg gagctccagc 180
 cgcgcggtac gcgcgctccc gccgctctgc ccctaaactt ctgccgtagc tccctttcaa 240
 gccagcgaat ttattcctta aaaccagaaa ctgaacctcg gcacgggaaa ggagtcgagc 300
 gaggagcaaa accacagcag agcaagaaga gcttcagaga gcagccttcc cggagcacca 360
 actccgtgtc gggagtgcag aaaccaacaa gtgagagggc gccgcgttcc cggggcgag 420
 ctgccccggg cgggagcagg cgcaggagga ggaagcgagc gcccccgagc cccgagcccc 480
 agtccccgag cctgagccgc aatcgctgcg gtactctgct ccggattcgt gtgcgcgggc 540
 tgcgccgagc gctgggcagg aggcttcggt ttgccctggt tgcaagcagc ggctgggagc 600
 agccggtccc tggggaatat gcggcgcgcg tggatcctgc tcacctggg cttggtggcc 660
 tgcgtgctcg cggagtcgag agcagagctg acatctgata aagacatgta ccttgacaac 720
 agtccattg aagaagcttc aggagtgtat cctattgatg acgatgacta cgcttctgag 780
 tctggctcgg gagctgatga ggatgtagag agtccagagc tgacaacatc tcgaccactt 840
 ccaaagatac tgttgactag tgctgctcca aaagtggaaa ccacgacgct gaatatacag 900
 aacaagatac ctgctcagac aaagtcacct gaagaaactg ataaagagaa agttcacctc 960
 tctgactcag aaaggaaaat ggaccagcc gaagaggata caaatgtgta tactgagaaa 1020
 cactcagaca gtctgtttaa acggacagaa gtccctagcag ctgtcattgc tggaggagtt 1080
 attggctttc tctttgcaat ttttcttacc ctgctggttg tgtatcgcag gagaaagaag 1140
 gatgaaggaa gctatgacct tggagaacgc aaaccatcca gtgctgctta tcagaaggca 1200
 cctactaagg agttttatgc gtaaaactcc aacttagtgt ctctatztat gagatcactg 1260
 aacttttcaa aataaagctt ttgcatagaa taatgaagat ctttggtttt tgttttcatt 1320
 aaagagccat tctggcactt taatgataaa atcccattgt atttaaaaca tttcatgtat 1380
 ttcttttagaa caacataaaa ttaaaattta acatctgcag tgttctgtga atagcagtgg 1440
 caaaatatta tgttatgaaa accctcgatg ttcattggaat tggtttaaac ttttatgcgc 1500
 aaatacaaaa tgattgtctt tttcctatga ctcaaagatg aaagctgttt catttgtgct 1560

ES 2 573 643 T3

agcatgtctc agattgacct taccaagttg gtcttacttt gttaatttat ctgttgtccc 1620
 cttcctctcc tctgccctcc cttcttgtgc ccttaaaacc aaaccctatg cctttttag 1680
 ctgtcatggg gcaatttgtc tttggaaaat tcagataatg gtaatttagt gtatatgtga 1740
 ttttcaaata tgtaaacttt aacttccact ttgtataaat ttttaagtgt cagactatcc 1800
 attttacact tgctttatatt ttcattacct gtagctttgg gcagatttgc aacagcaaat 1860
 taatgtgtaa aattggatta ttactacaaa accgtttagt catatctatc taatcagatc 1920
 ttcttttggg aggatttgat gtaagttact gacaagcctc agcaaacca aagatgttaa 1980
 cagtatttta agaagttgct gcagattcct ttggccactg tatttgtaa tttcttgcaa 2040
 tttgaaggta cgagtagagg tttaaagaaa aatcagtttt tgttcttaa aatgcattta 2100
 agttgtaaac gtctttttta gcctttgaag tgccctctgat tctatgtaac ttgttgcaaga 2160
 ctgggtgtaa tgagtatatg taacagttta aaaaaaagt tggattttta taagcacaga 2220
 caattctaata ggtaactttt gtagtcttat gaatagacat aaattgtaat ttgggaacat 2280
 aaaaactact gaataaatca tgtggcctaa tattgaaaat gtcactgtta taaattttgt 2340
 acatttttga tcaaatgtac atctcccctt tgctaacggc cgtctgctct caaggatgac 2400
 gtggggttga tttctaagtg tttcacagtg tctgtaaatc aagaccaaag agcctgtcga 2460
 tgagactggt tattaccaga ttcacttctg aattggccag aggaaatctg aatgtattat 2520
 cctgtgtgtg tctaggtaga gatattggaa ggctgccagg ggatttcgaa gtttgcaacc 2580
 tttataggat aactgatggc aatattaaga cagacgcctg cttttgcaaa taacttacia 2640
 gactgtaaat tccaaagatc tgaatggggc tttcctgatg ttggatctta aggcttaggc 2700
 ctatagattg atttaccttt ggaattgtgc tccaaatgtc tactgaagct taaccgaaga 2760
 actaataaat ggactacagt agctcacgtt acagggagg agggtaggca gggaggctct 2820
 gtgtgttaaa atgagggctc cactgcttta ggattgaagt ggctggaaag agtgatgcct 2880
 ggggaaggag atggagttat gagggactg tggctggtac tttctgtact aaacatttcc 2940
 tttttctatt ttaccactaa ttttgtttta aactgtgagc cgtccaagtc agaagaagac 3000
 agcaaaaaaa gcaacttttc caacatacaa tttactttta ataaagtatg aatatttcat 3060
 tttgagaaca ttccctggaa ttgccacata attcattaaa aacatttttt taagcaacac 3120
 ttggaacagt gtttacttta aatccttaat ggccttaatt aattctcaga ttctgcccc 3180
 atcacttaca gaaccaattc acttttagagt gactaaaagg aaacgatagc ctagctttct 3240
 aaagccacgc tgtgtccctc aattacagag ggtaggaatg ggtatacctc taactgtgca 3300
 aagcagagtg aaattcaatt catagaataa caactgctgg gaatatccgt gccaggaaaa 3360
 gaaaaatttc tggcaaatat tttgtcactg ctgtaaagca aatattttgt gaaagtgcc 3420
 aaataaagtc tgtcatgcc 3480
 actgt 3485

ES 2 573 643 T3

<210> 9
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (1)..(442)
 <223> sindecano-3 humano
 <400> 9

5

10

```

Met Lys Pro Gly Pro Pro His Arg Ala Gly Ala Ala His Gly Ala Gly
 1          5          10          15

Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ala Arg Gly Leu Leu Leu
 20          25          30

Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Gly Arg Ala Ala Gly Ala Gln
 35          40          45

Arg Trp Arg Ser Glu Asn Phe Glu Arg Pro Val Asp Leu Glu Gly Ser
 50          55          60

Gly Asp Asp Asp Ser Phe Pro Asp Asp Glu Leu Asp Asp Leu Tyr Ser
 65          70          75          80

Gly Ser Gly Ser Gly Tyr Phe Glu Gln Glu Ser Gly Ile Glu Thr Ala
 85          90          95

Met Arg Phe Ser Pro Asp Val Ala Leu Ala Val Ser Thr Thr Pro Ala
 100         105         110

Val Leu Pro Thr Thr Asn Ile Gln Pro Val Gly Thr Pro Phe Glu Glu
 115         120         125

Leu Pro Ser Glu Arg Pro Thr Leu Glu Pro Ala Thr Ser Pro Leu Val
 130         135         140

Val Thr Glu Val Pro Glu Glu Pro Ser Gln Arg Ala Thr Thr Val Ser
 145         150         155         160

Thr Thr Met Ala Thr Thr Ala Ala Thr Ser Thr Gly Asp Pro Thr Val
 165         170         175

Ala Thr Val Pro Ala Thr Val Ala Thr Ala Thr Pro Ser Thr Pro Ala
 180         185         190

Ala Pro Pro Phe Thr Ala Thr Thr Ala Val Ile Arg Thr Thr Gly Val
 195         200         205
    
```

ES 2 573 643 T3

Arg Arg Leu Leu Pro Leu Pro Leu Thr Thr Val Ala Thr Ala Arg Ala
 210 215 220

Thr Thr Pro Glu Ala Pro Ser Pro Pro Thr Thr Ala Ala Val Leu Asp
 225 230 235 240

Thr Glu Ala Pro Thr Pro Arg Leu Val Ser Thr Ala Thr Ser Arg Pro
 245 250 255

Arg Ala Leu Pro Arg Pro Ala Thr Thr Gln Glu Pro Asp Ile Pro Glu
 260 265 270

Arg Ser Thr Leu Pro Leu Gly Thr Thr Ala Pro Gly Pro Thr Glu Val
 275 280 285

Ala Gln Thr Pro Thr Pro Glu Thr Phe Leu Thr Thr Ile Arg Asp Glu
 290 295 300

Pro Glu Val Pro Val Ser Gly Gly Pro Ser Gly Asp Phe Glu Leu Pro
 305 310 315 320

Glu Glu Glu Thr Thr Gln Pro Asp Thr Ala Asn Glu Val Val Ala Val
 325 330 335

Gly Gly Ala Ala Ala Lys Ala Ser Ser Pro Pro Gly Thr Leu Pro Lys
 340 345 350

Gly Ala Arg Pro Gly Pro Gly Leu Leu Asp Asn Ala Ile Asp Ser Gly
 355 360 365

Ser Ser Ala Ala Gln Leu Pro Gln Lys Ser Ile Leu Glu Arg Lys Glu
 370 375 380

Val Leu Val Ala Val Ile Val Gly Gly Val Val Gly Ala Leu Phe Ala
 385 390 395 400

Ala Phe Leu Val Thr Leu Leu Ile Tyr Arg Met Lys Lys Lys Asp Glu
 405 410 415

Gly Ser Tyr Thr Leu Glu Glu Pro Lys Gln Ala Ser Val Thr Tyr Gln
 420 425 430

Lys Pro Asp Lys Gln Glu Glu Phe Tyr Ala
 435 440

- <210> 10
- <211> 5121
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> Característica miscelánea
- <222> (1)..(5121)
- 10 <223> sindecano-3 humano
- <400> 10

ES 2 573 643 T3

acaaaggcgc cgcgccgccc cccgccgccc gcgccgcgc gcgccccatg aagccggggc 60
 cgccgcaccg tgccggggcc gcccacgggg ccggcgccgg gcccggggccc gcggccgggc 120
 ccggggcccg cgggctgctc ctgccaccgc tgctgctgct gctgctggcg gggcgcgccg 180
 cgggggcccga gcgctggcgc agtgagaact tcgagagacc cgtggacctg gagggtctg 240
 gggatgatga ctcccttccc gatgatgaac tggatgacct ctactcgggg tcgggtcgg 300
 gctacttcga gcaggagtgc ggcattgaga cagccatgcg cttcagcccga gatgtagccc 360
 tggcgggtgc caccacacct gcggtgctgc ccaccacgaa catccagcct gtgggcacac 420
 catttgaaga gctcccctct gagcgccccca ccctggagcc agccaccagc cccctggtgg 480
 tgacagaagt cccggaagag cccagccaga gagccaccac cgtctccact accatggcta 540
 ccactgctgc cacaagcaca ggggacccga ctgtggccac agtgcctgcc acagtggcca 600
 ccgccacccc cagcaccctc gcagcaccccc cttttacggc caccactgct gttataagga 660
 ccactggcgt acggaggctt ctgcctctcc cactgaccac agtggctacg gcacgggcca 720
 ctacccccga ggcgcctctc ccgccacca ccggcgctgt cttggacacc gaggcccaa 780
 caccaggtc ggtcagcaca gctacctccc ggccaagagc ccttcccagg ccggccacca 840
 cccaggagcc tgacatccct gagaggagca ccctgcccct ggggaccact gccctggac 900
 ccacagaggt ggctcagacc ccaactccag agaccttcc gaccacaatc cgggatgagc 960
 cagaggttcc ggtgagtggg gggcccagtg gagacttcga gctgccagaa gaagagacca 1020
 cacaaccaga cacagccaat gaggtggtag ctgtgggagg ggctgcccgc aaggcatcat 1080
 ctccacctgg gacactgccc aagggtgccc gcccgggccc tggcctcctg gacaatgcca 1140
 tcgactcggg cagctcagct gctcagctgc ctcagaagag tatcctggag cggaaggagg 1200
 tgctcgtagc tgtgattgtg ggcgggggtg tgggcgccct ctttctgccc ttcttggtca 1260
 cactgctcat ctatcgtatg aagaaaaagg atgagggcag ctacacgctg gaggaaccca 1320
 agcaggcgag cgtcacatac cagaagcctg acaagcagga ggagttctat gcctagtgga 1380
 gccacagtgc ctccctgag cctcaacacc accctgctgt ccagtcccca gcctggcccc 1440
 accagcccaa gcctgggact gggcctgga cctggcccca gttcttctct gccctctctc 1500
 ccaaggtctg ccaggtctgc cagcctcaca cagatcttcc ccgaggaaga ggggtctgctg 1560
 ccatctgccc cagactgtgc ccttacgagc tcatctcttg tccccctcat ccctgccacc 1620
 agtctggggc ttcagacct catgtcagat ggatgggagg aagaaagctc ctgattggct 1680

ES 2 573 643 T3

ggtggtgga gaaaggtgg ggcttgagat gagcctgagc cctgacttgg caccacagt 1740
 gctcactgag atctcctttt tggggcagag aggcactcag gctggtttcc aggacaaaca 1800
 tttggtaaac acagcccttg aatcatcta gacactgcaa cctcttgctc gtatcccagg 1860
 gcctctctct agctgggtga gaggggtgtcc cttgtcacca gcctgttttg tcctgggtctc 1920
 tctggggttg ttgaatctct cctcttgccct gccaaagtaca catgtacca gacttcattt 1980
 ctttctgcat cttccccca gaaacagctt cctgaggggtg ctggggcagc cactggtgag 2040
 gaggggctgc tctgatgtcc ctccatgag gggactctgc acagacacca ttgccacac 2100
 tatcaccata ttttactca gtcacacaca agacaaaagc atgcaatgac aaaaccatac 2160
 gcaatcctga ccgcccagcc aatcaagaca tatcacagaa cacacgcgtc cttccaagaa 2220
 tgtttatcct catgcatcac ttacacacc ccagacacgt actgcaatgc aagtcactag 2280
 tcatggtcac atgacagtga cagtgtggcc tcctcctacc ccaaatacac ccacactctg 2340
 gcaccacaca cattgtctcc agctttcagg cttactgggg aggggtggaat cgagccagaa 2400
 caatcagccc atattgggtc cccctaagtt gcccogtcat actcagtccc atgccatggt 2460
 gccacacca accatgcagc cgccaacccc agccagtgtc agacacaatc ccatgtggat 2520
 gcacagtctc actccacatg acctgctctc aatgctggag ggaaacaggc aggcccttgc 2580
 ctttctcgga aaaagtgtgg ggccacagcc cttttagggc attgcatgca ggtgggcctg 2640
 gcttcacccc tacctgcttc ctcccaccg cagctggcag agggggaggt ttggggccag 2700
 acccccacta gctgggagcc tgggggctcc tctaaggctg aggaaggaaa tttggcccca 2760
 ggttggtggg gggcttggg tctcccagga cggaaggccc agggcagggg gggggcatgt 2820
 ggttgggctc ctttatctcc ctgtgtccc ttctgcttt gagctagggg gctgactctg 2880
 cctcccagga cacaagtctc caaagtgcct gtgagggcgg gccctccgca ccctctgccc 2940
 tctgcctggc agccaacct cagcccacct gccagaggc cctccctgtg gacaccccct 3000
 cacctatttg gccaaacaat tctggctgca gcttcagggg ccatggctgg aagcagcccc 3060
 tgcagatccc tcaggccccg aggtcagggg ttgagggatg agaccaggtg atagtggggg 3120
 aggggttact tcctttgta cctagcaagt agggctatth ccatcggtat tttaaatgtg 3180
 gggtcacaga tcttttggg aggggtgtgtc tggcaggggg cctcttgag ccaaaggat 3240
 gtggtgtgag ttgcgattgg ctggcactca caccaccac cctcaccac atcccagatt 3300
 caagttagga aggcaggtt tatttcaggg cccttttcaa gatgccctgg cagcagattt 3360
 ctgcaggatg agggtagcg gtgtgtaggc agtgaggggg aggttccagg ggctgtccca 3420
 cagcctgtct tttccaggct gggctccatc ttccagtccc aaaaccctcc ttcacagggc 3480
 ccagaggctt gtgaggaagc caggtggacc cagccttaga agagtgggca tggggggccc 3540
 ctgatatctg gagggggcgg gttggcctca gtcacttttg gagcagaagg gctgggtcct 3600
 ggggccacag accacaaggc tcagcctccc taccctgctc cctgggggtgc tgctgtcttg 3660

ES 2 573 643 T3

gagagcacag ctctggtgag acggcctggg caggccgagg ctgagaaacc agggaggata 3720
gaggagaaaa gggcttgggc cccagcccc agaagatgct ggaccccagg tgggagaccc 3780
aacagtgggt gcagtttctc agtagggctg gagccaatgg tgggggtggc cccggcaggc 3840
ctggctcctc acatcccagg ggttggcttc tgatttgggg cttgggctcc aggcactggc 3900
ttctcttctc tgtgtcctta gcatttgaga gaagaggcca ggggccttgt tcatggatcc 3960
ctggacccaa ggcagatgtc caggctttat cctcctgagg atgaggagtc tgaccagccc 4020
aaatctgccc tggccggcct gaccggggca aggcagtcca agagagttca gtgaggacca 4080
gctaggctct cccaggtgca atgtgggtgc agggccctca tgtccccta cccctgcctg 4140
tgatggagtg ttctgagggg ctttggcatt tgctggaagc acagggagt tccaaatgaga 4200
gggagcttct gtggcttgag agcctctggg gccttggctg ccagagcacg aggcaggcca 4260
ggacctggag agcccagacc ctgtctccag gaggccagga ggccagatgg gggccttgcc 4320
tgaaagactg gtccccttga tcgctggagg catgtgggtg gcaaccaggg ctgggcaggg 4380
cttagggtgt gtggggccaaa cccccctggg gttggcaaag ccgcctgtca ggcctcctgg 4440
tgggggcccc tggacacagg gagcagaccc tctgcctcat ggggtaggag tggctgcctc 4500
ctgtgttctc tggatttctt ctccaacaa ctacaaccct ggacttgcct ccccaggcct 4560
cttgctgta aatagaagcc cgcaaactgt acagatttac agaggcatcg agactgggcc 4620
ctgggagtgt ccatctgaga gccgatggcc ccagcatccc ccaggtgcct gcctggcacc 4680
acagtgaccc tggcctcagc gtggcaaatg catgtaaata ttttctgtag gcagcgtggc 4740
tccagagagc cccctgaaga cagtgtccct ccctcctgtg agtcctttct cctgtacaga 4800
acctgcctgg ggtgggtggg ggtctgccat tccctcccc aggccttccc tgccccttct 4860
ctcccctgta acctgtttat taaccatacc tgtcctgagt tcatggccaa aaccttaaat 4920
aagaaaaaca aaagaaaaag acagtggaaa aaagagacca aggcgcctgc cccactgagg 4980
gtactctcct gttccagcct tgtgaaggaa ctggttttgt ttttgtttt ttttttttt 5040
ttttttttt gtttgtttgt ttttttaaca cttcctgtgc tgtgccatt tataagagga 5100
aataaaatta agctgaaatg a 5121

<210> 11
<211> 198
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> Característica miscelánea
<222> (1)..(198)
10 <223> sindecano-4 humano
<400> 11

ES 2 573 643 T3

Met Ala Pro Ala Arg Leu Phe Ala Leu Leu Leu Phe Phe Val Gly Gly
 1 5 10 15

Val Ala Glu Ser Ile Arg Glu Thr Glu Val Ile Asp Pro Gln Asp Leu
 20 25 30

Leu Glu Gly Arg Tyr Phe Ser Gly Ala Leu Pro Asp Asp Glu Asp Val
 35 40 45

Val Gly Pro Gly Gln Glu Ser Asp Asp Phe Glu Leu Ser Gly Ser Gly
 50 55 60

Asp Leu Asp Asp Leu Glu Asp Ser Met Ile Gly Pro Glu Val Val His
 65 70 75 80

Pro Leu Val Pro Leu Asp Asn His Ile Pro Glu Arg Ala Gly Ser Gly
 85 90 95

Ser Gln Val Pro Thr Glu Pro Lys Lys Leu Glu Glu Asn Glu Val Ile
 100 105 110

Pro Lys Arg Ile Ser Pro Val Glu Glu Ser Glu Asp Val Ser Asn Lys
 115 120 125

Val Ser Met Ser Ser Thr Val Gln Gly Ser Asn Ile Phe Glu Arg Thr
 130 135 140

Glu Val Leu Ala Ala Leu Ile Val Gly Gly Ile Val Gly Ile Leu Phe
 145 150 155 160

Ala Val Phe Leu Ile Leu Leu Leu Met Tyr Arg Met Lys Lys Lys Asp
 165 170 175

Glu Gly Ser Tyr Asp Leu Gly Lys Lys Pro Ile Tyr Lys Lys Ala Pro
 180 185 190

Thr Asn Glu Phe Tyr Ala
 195

- <210> 12
- <211> 2640
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> Característica miscelánea
- <222> (1)..(2995)
- 10 <223> sindecano-4 humano
- <400> 12

actcgcgcga gcctgcgcgc cttctccagt ccgcggtgcc atggcccccg cccgtctgtt 60

ES 2 573 643 T3

cgcgctgctg ctgttcttcg taggcggagt cgccgagtcg atccgagaga ctgaggtcat 120
 cgacccccag gacctcctag aaggccgata cttctccgga gccctaccag acgatgagga 180
 tgtagtgggg cccgggcagg aatctgatga ctttgagctg tctggctctg gagatctgga 240
 tgacttgaa gactccatga tcggccctga agttgtccat cccttgggtgc ctctagataa 300
 ccatatccct gagagggcag ggtctgggag ccaagtcccc accgaacca agaaactaga 360
 ggagaatgag gttatcccca agagaatctc acccgttga gagagtgagg atgtgtccaa 420
 caaggtgtca atgtccagca ctgtgcaggg cagcaacatc tttgagagaa cggaggtcct 480
 ggcagctctg attgtgggtg gcatcgtggg catcctcttt gccgtcttcc tgatcctact 540
 gctcatgtac cgtatgaaga agaaggatga aggcagctat gacctgggca agaaacccat 600
 ctacaagaaa gccccacca atgagttcta cgcgtgaagc ttgcttgtgg gactggctt 660
 ggacttttagc ggggagggaa gccaggggat tttgaagggt ggacattagg gtagggtagg 720
 gtcaacctaa tactgacttg tcagtatctc cagctctgat tacctttgaa gtgttcagaa 780
 gagacattgt cttctactgt tctgccagggt tcttcttgag ctttgggcct cagttgcct 840
 ggcagaaaaa tggattcaac ttggcctttc tgaaggcaag actgggattg gatcacttct 900
 taaacttcca gttaagaatc taggtccgcc ctcaagcca tactgaccat gcctcatcca 960
 gagctcctct gaagccaggg ggctaacgga tgttgtgtgg agtcctggct ggaggtcctc 1020
 ccccagtggc cttcctccct tcctttcaca gccggctctct ctgccaggaa atgggggaag 1080
 gaactagaac cacctgcacc ttgagatggt tctgtaaagtg ggtacttgtg atcacactac 1140
 gggaatctct gtggtatata cctggggcca ttctaggctc tttcaagtga cttttggaaa 1200
 tcaacctttt ttatttgggg gggaggatgg ggaaaagagc tgagagtta tgctgaaatg 1260
 gatttataga atattttaa atctatctt agtgtttgtt cgttttttta actgttcatt 1320
 cctttgtgca gagtgtatat ctctgcctgg gcaagagtgt ggaggtgccg aggtgtcttc 1380
 attctctcgc acatttccac agcacctgct aagtttgtat ttaatggtt ttgtttttgt 1440
 ttttgtttgt ttcttgaaaa tgagagaaga gccggagaga tgatttttat taattttttt 1500
 tttttttttt ttttttact atttatagct ttagataggg cctcccttcc cctcttcttt 1560
 ctttgttctc tttcattaa ccccttcccc agtttttttt ttatacttta aacccgctc 1620
 ctcatggcct tggccctttc tgaagctgct tcctcttata aaatagcttt tgccgaaaca 1680
 tagttttttt ttagcagatc ccaaaatata atgaagggga tgggtgggata tttgtgtctg 1740
 tgttcttata atatattatt attcttcctt ggttctagaa aaatagataa atatattttt 1800
 ttcaggaaat agtgtggtgt ttccagtttg atgttgctgg gtggttgagt gagtgaattt 1860
 tcatgtggct ggggtgggtt ttgccttttt ctcttgccct gttcctggtg ccttctgatg 1920
 gggctggaat agttgaggtg gatggttcta ccctttctgc cttctgtttg ggaccagct 1980

ES 2 573 643 T3

ggtgttcttt ggtttgcttt cttcaggctc tagggctgtg ctatccaata cagtaaccac 2040
 atgCGGctgt ttaaagttaa gccaattaaa atcacataag attaaaaatt ccttcctcag 2100
 ttgcactaac cacgtttcta gaggcgtcac tgtatgtagt tcatggctac tgtactgaca 2160
 gcgagagcat gtccatctgt tggacagcac tattctagag aactaaactg gcttaacgag 2220
 tcacagcctc agctgtgctg ggacgaccct tgtctccctg ggtagggggg ggggaatggg 2280
 ggagggctga tgaggcccca gctggggcct gttgtctggg accctccctc tcctgagagg 2340
 ggaggcctgg tggccttagcc tgggcaggtc gtgtctcctc ctgaccccag tggctgCGgt 2400
 gaggggaacc accctccctt gctgcaccag tggccattag ctcccgtcac cactgcaacc 2460
 cagggctcca gctggctggg tcctcttctg cccccagtgc ccttcccctt gggctgtggt 2520
 ggagtgagca cctcctctgt aggcacctct cacactgttg tctgttactg attttttttg 2580
 ataaaaagat aataaaacct ggtactttct aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2640

<210> 13

<211> 25

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Morfolino R3 Mo2

<400> 13

10 gcagtcgcaa tgcatagta acctt 25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para identificar un modulador de la actividad de R-espondina-2 (Rspo2), R-espondina-3 (Rspo3) y/o sindecano (Sdc), es decir sindecano-1 (Sdc1), sindecano-2 (Sdc2), sindecano-3 (Sdc3) y/o sindecano-4 (Sdc4), que consiste en evaluar y/o detectar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de modular la unión de un polipéptido de Rspo2 o de un polipéptido de Rspo3 a un polipéptido de Sdc1, Sdc2, Sdc3 y/o Sdc4 en comparación con un control.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, que consiste en evaluar y/o detectar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de estimular o inhibir la unión.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 o 2, según el cual la unión se determina en un sistema libre de células o en un sistema celular, como p.ej. una célula recombinante o un organismo transgénico no humano.
- 20 4. Método según la reivindicación 3, según el cual la unión se determina en una célula u organismo que sobreexpresa Rspo2 o Rspo3 y/o un Sdc elegido entre Sdc1, Sdc2, Sdc3, Sdc4 y combinaciones de los mismos.
5. Método según una de las reivindicaciones 1-4 para identificar y/o evaluar posibles agentes destinados a tratar un trastorno relacionado con Rspo2, Rspo3 y/o Sdc, y/o un trastorno de tipo proliferativo, seleccionando el trastorno preferiblemente entre el cáncer, una enfermedad inflamatoria, una afección ósea o la cicatrización de heridas.

Figura 1

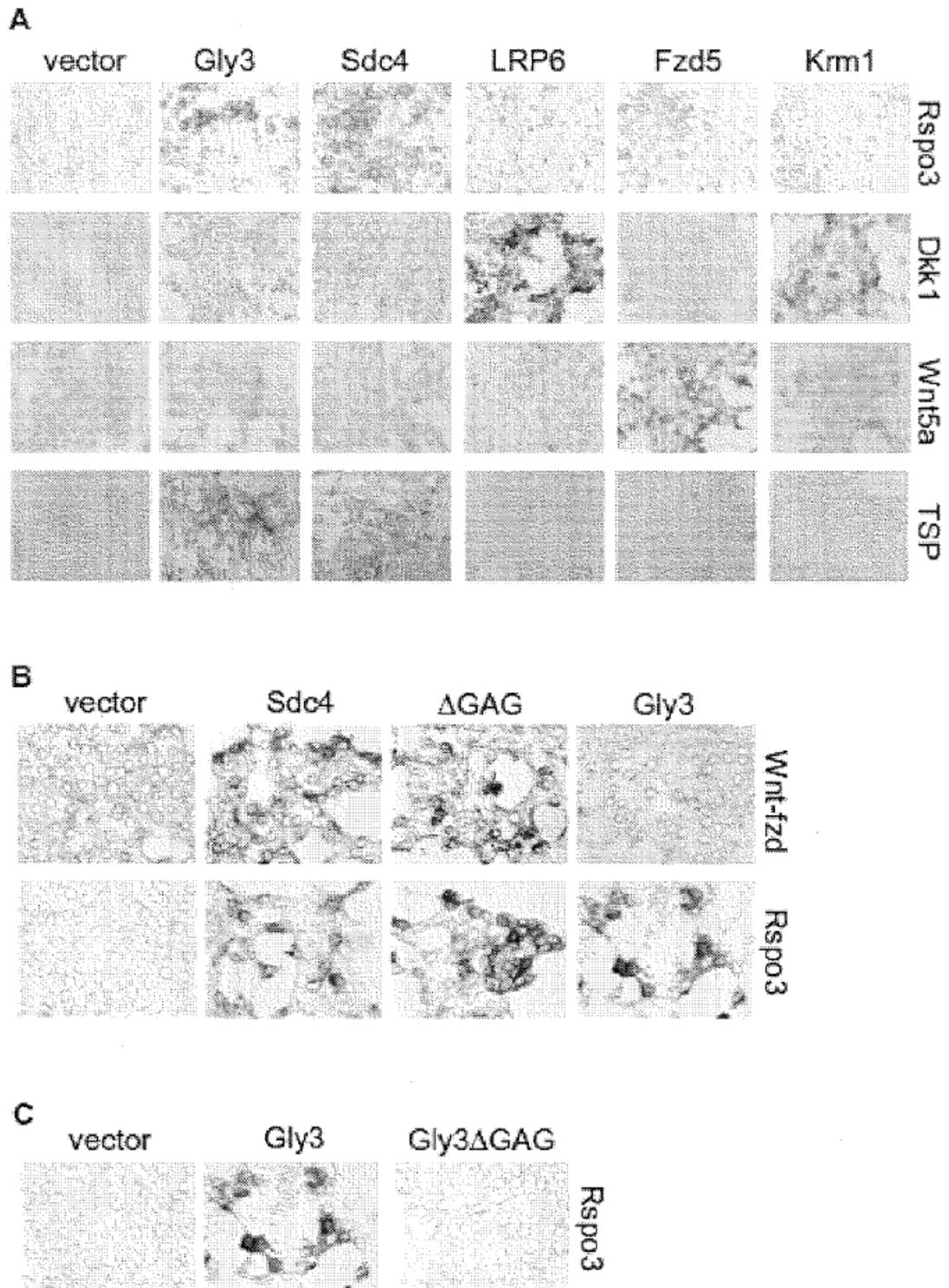
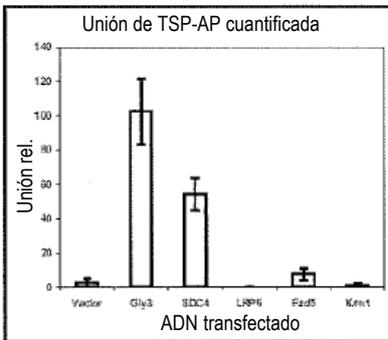
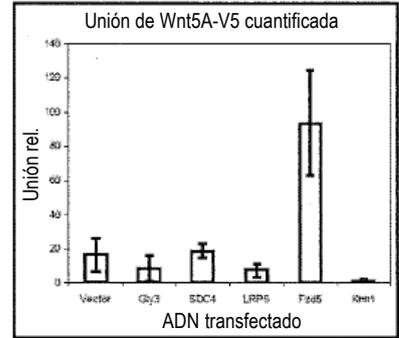
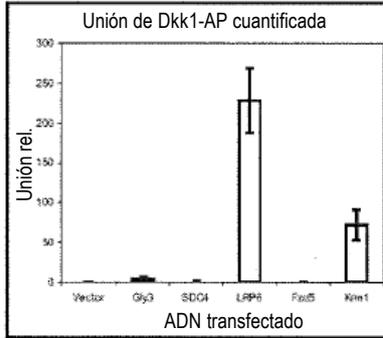
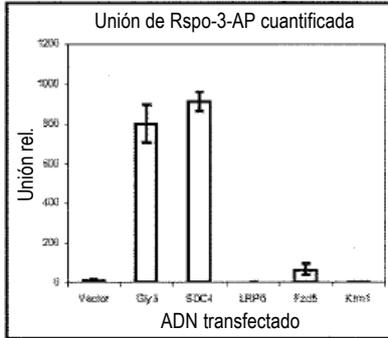
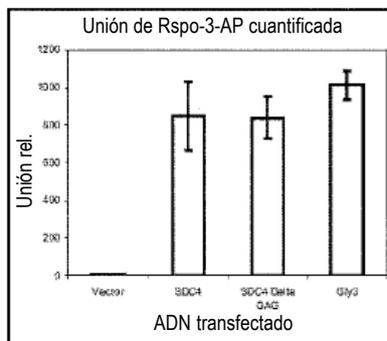
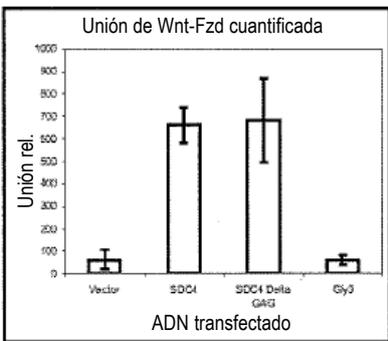


Figura 1, continuación

D



E



F

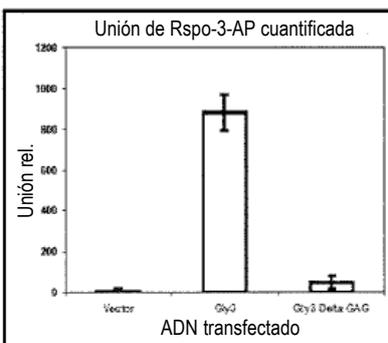


Figura 2

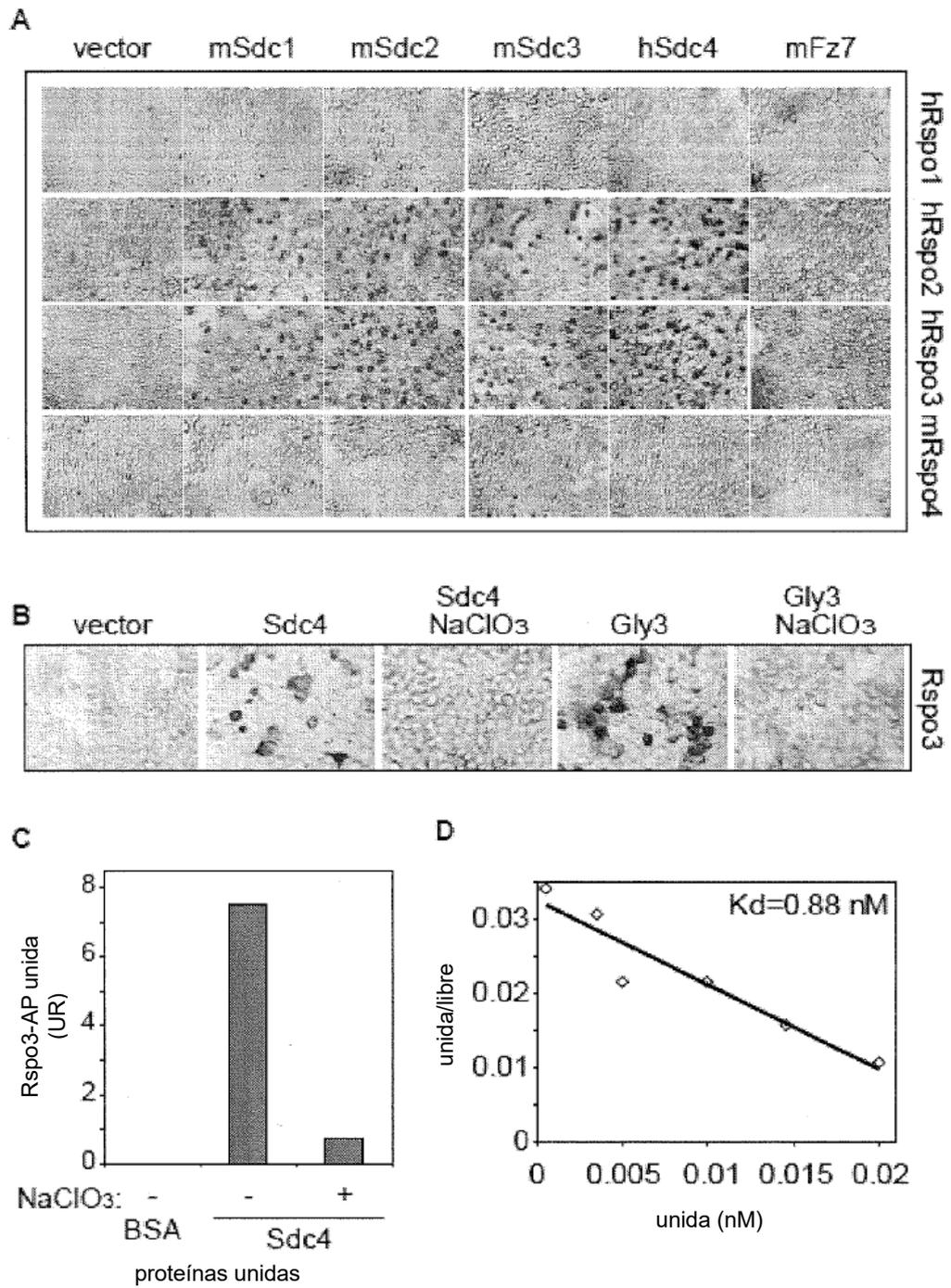


Figura 2, continuación

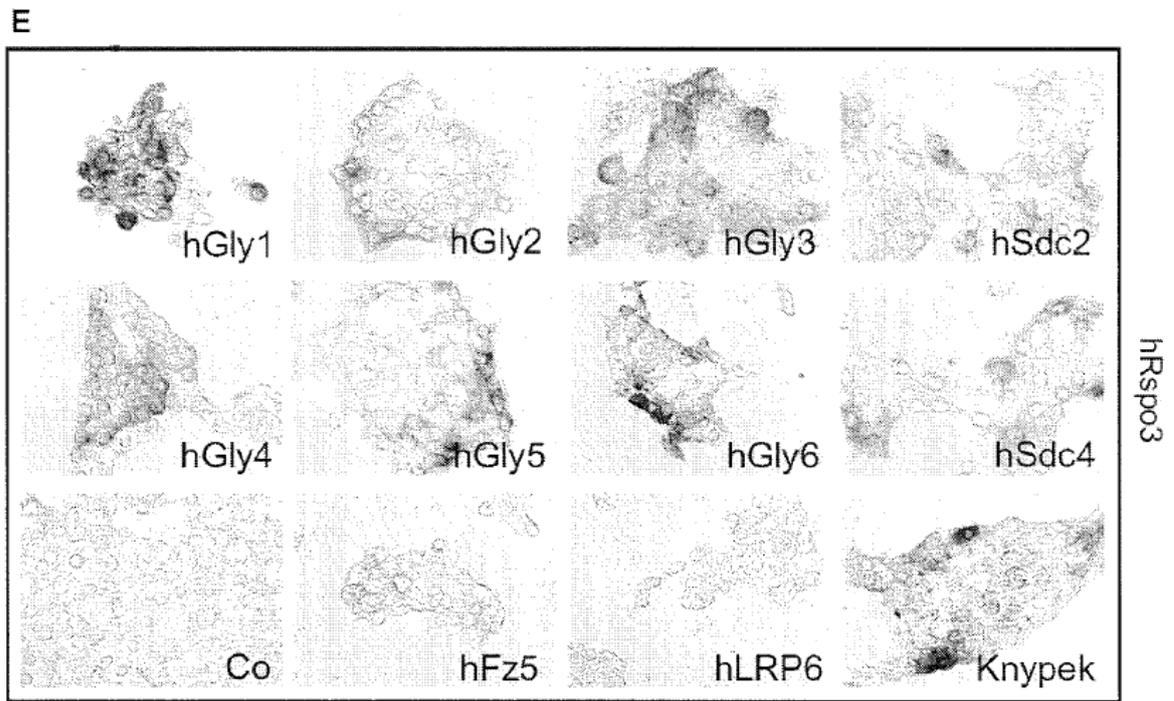


Figura 3

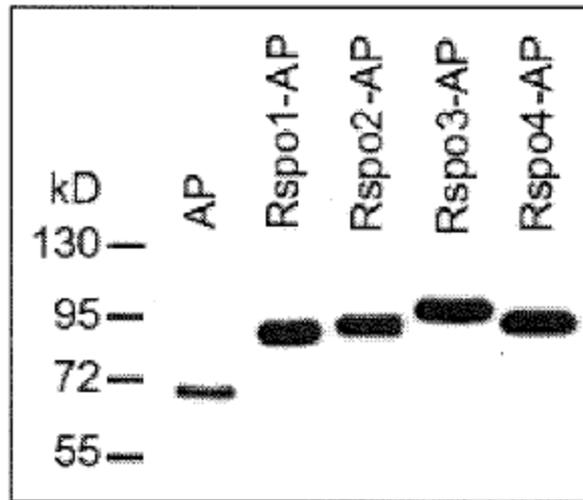


Figura 4

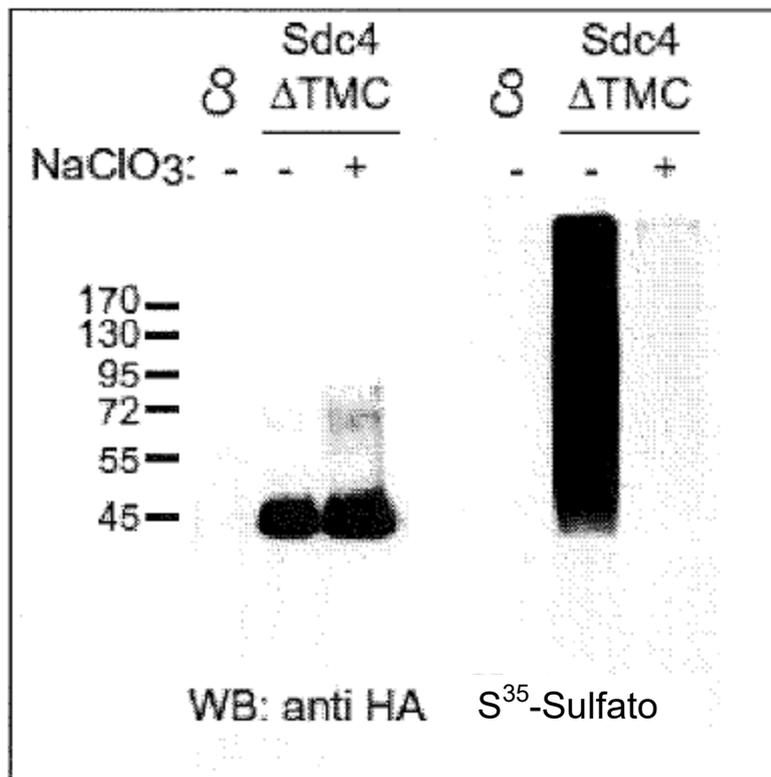


Figura 5

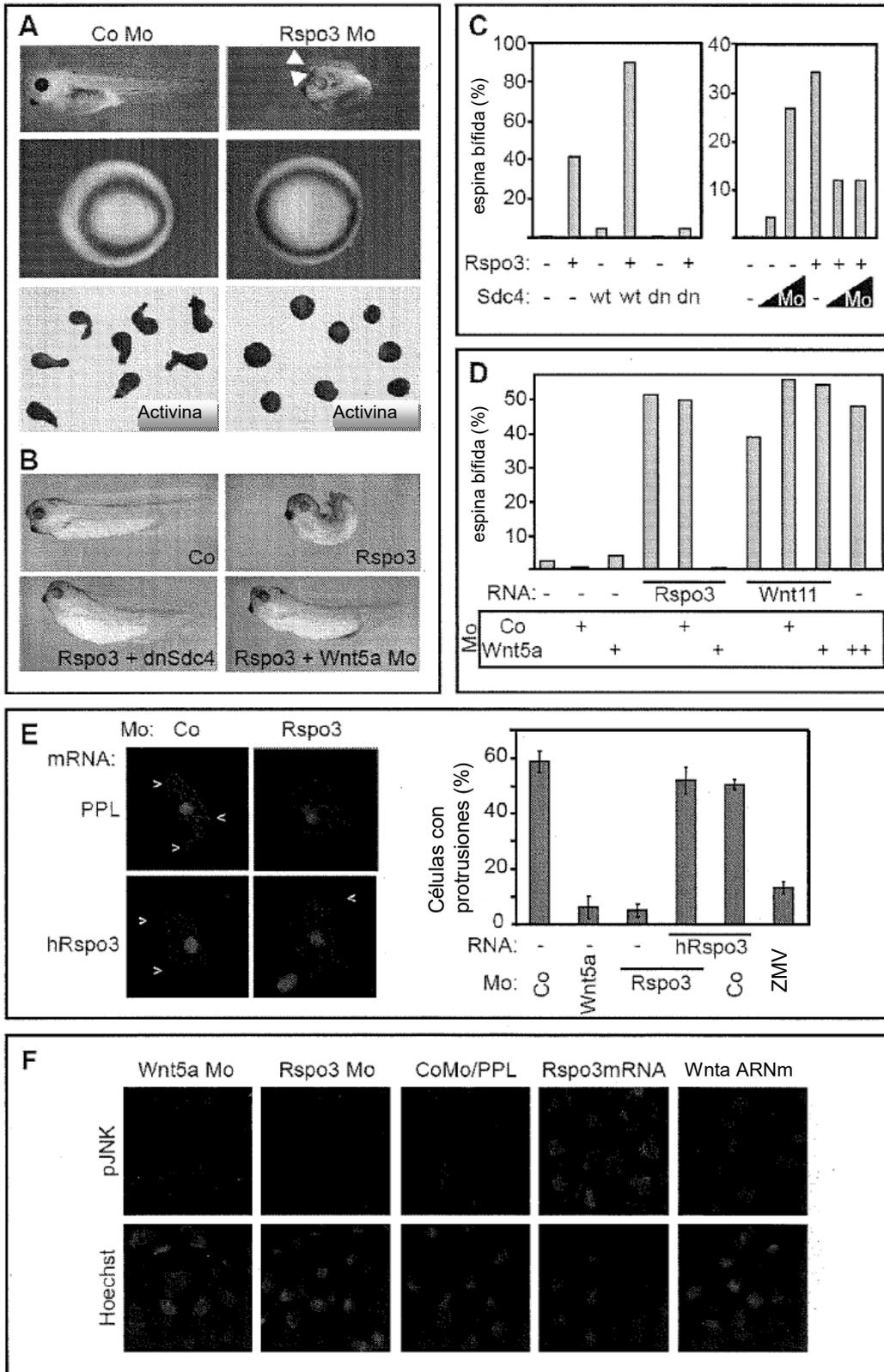


Figura 6

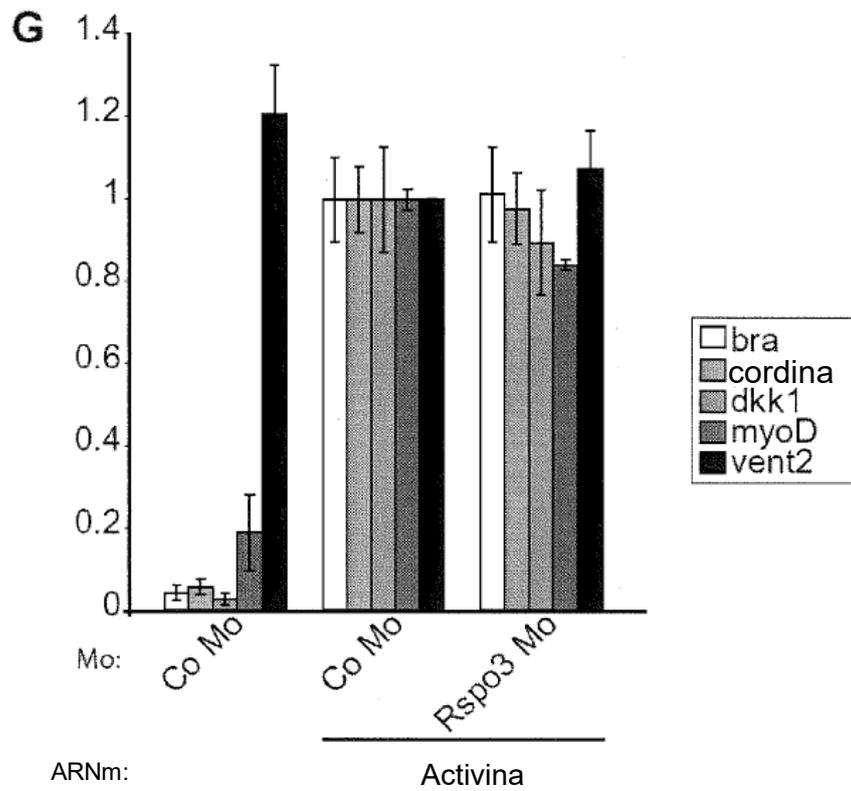
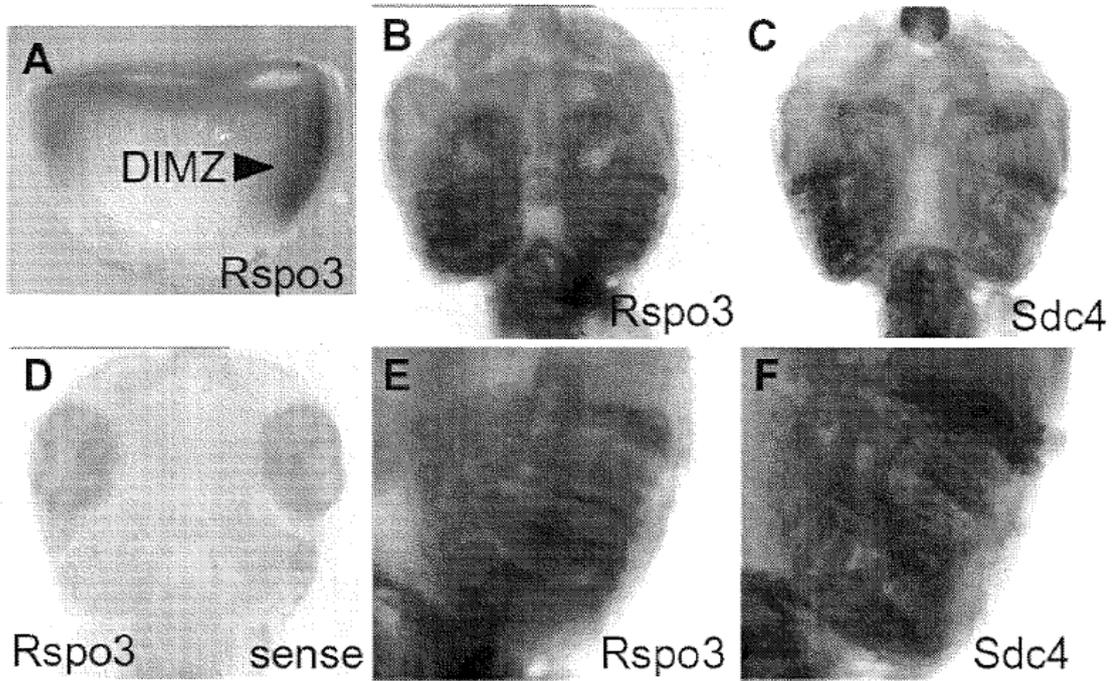


Figura 7

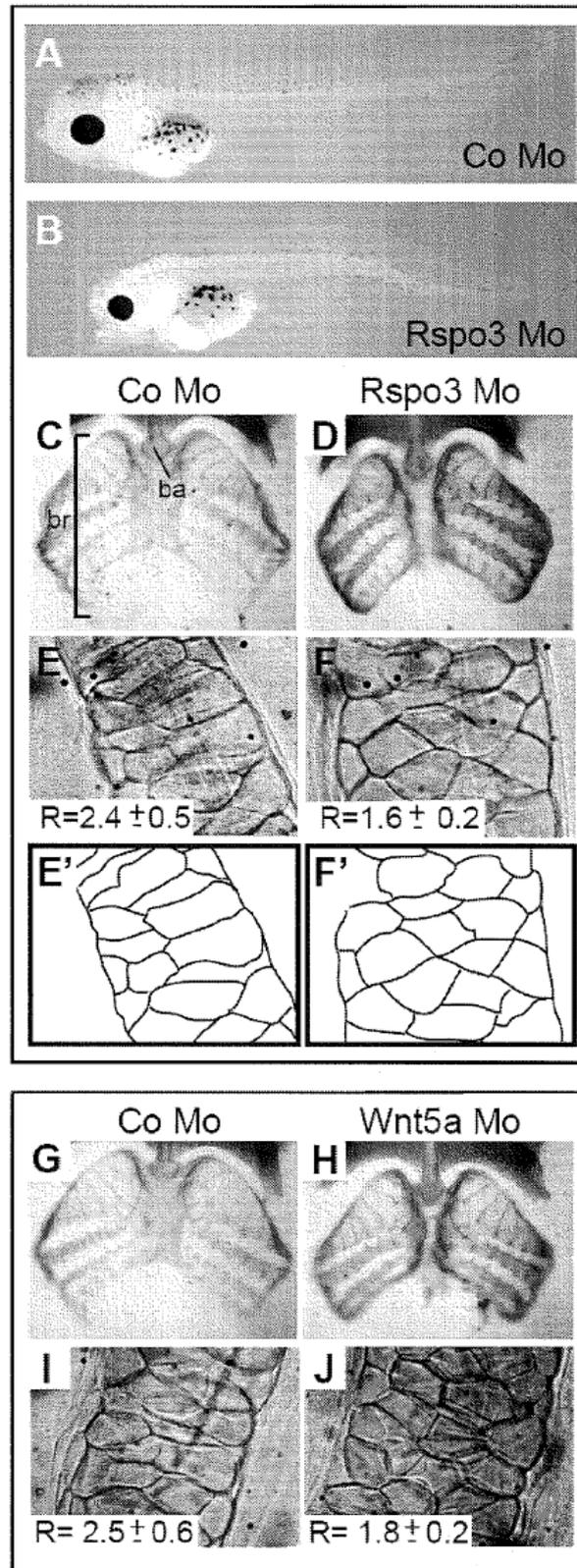


Figura 8

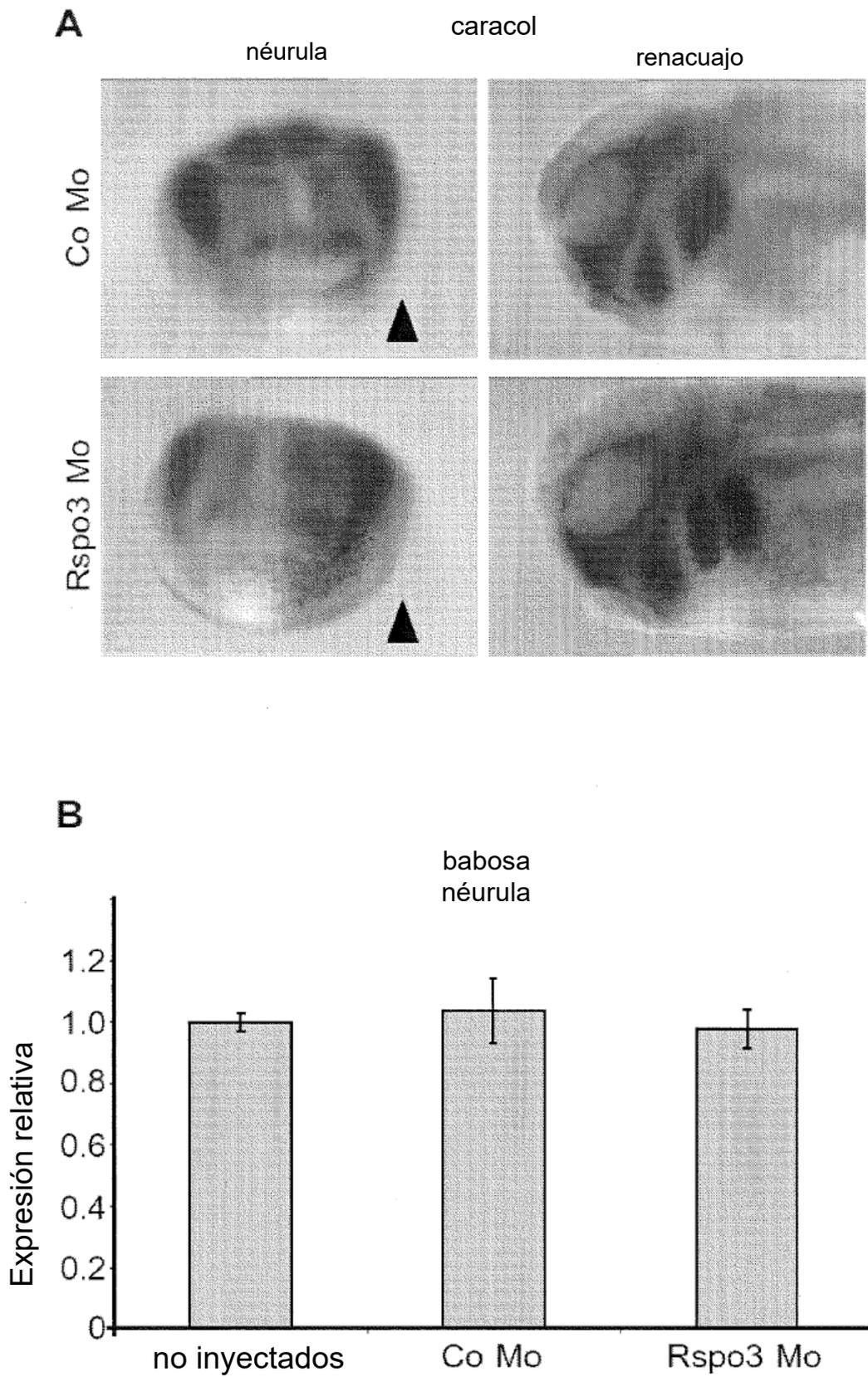


Figura 9

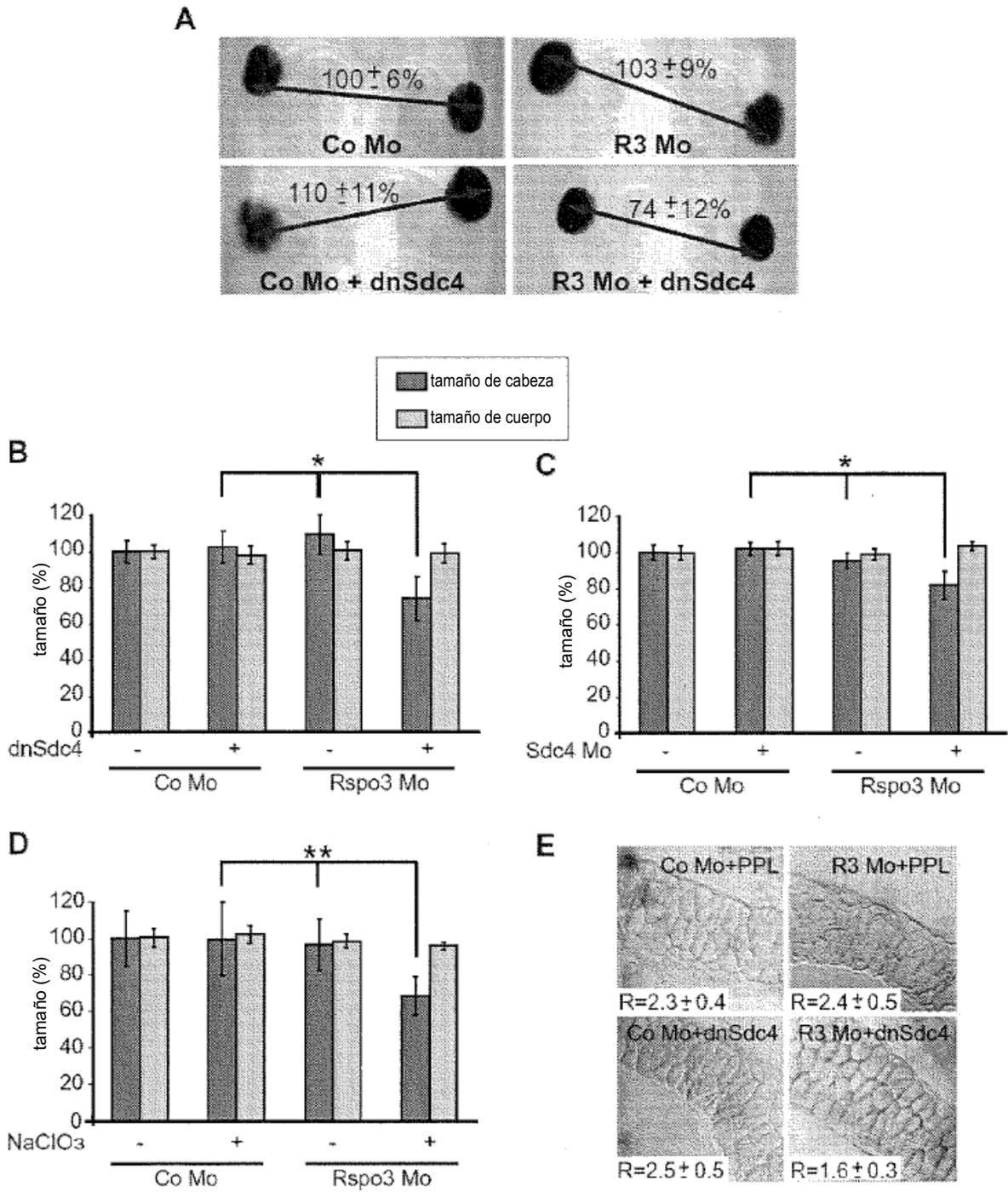


Figura 10

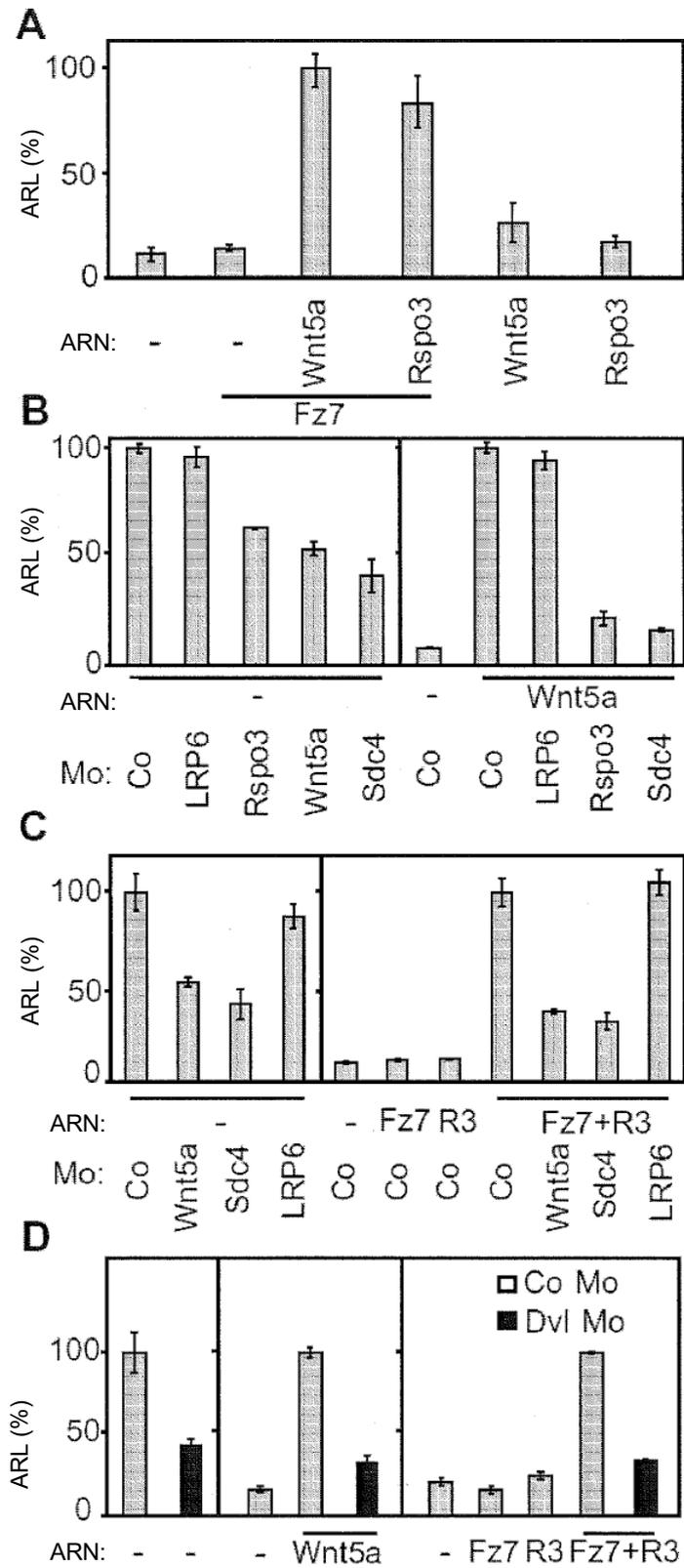


Figura 11

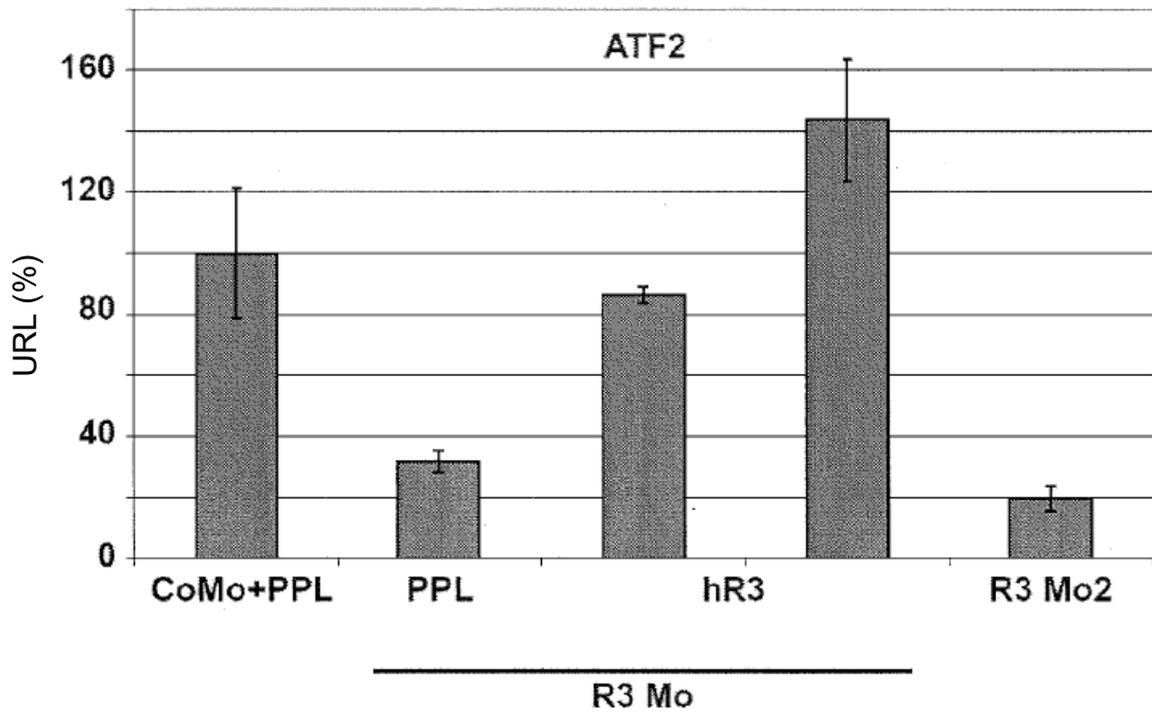


Figura 12

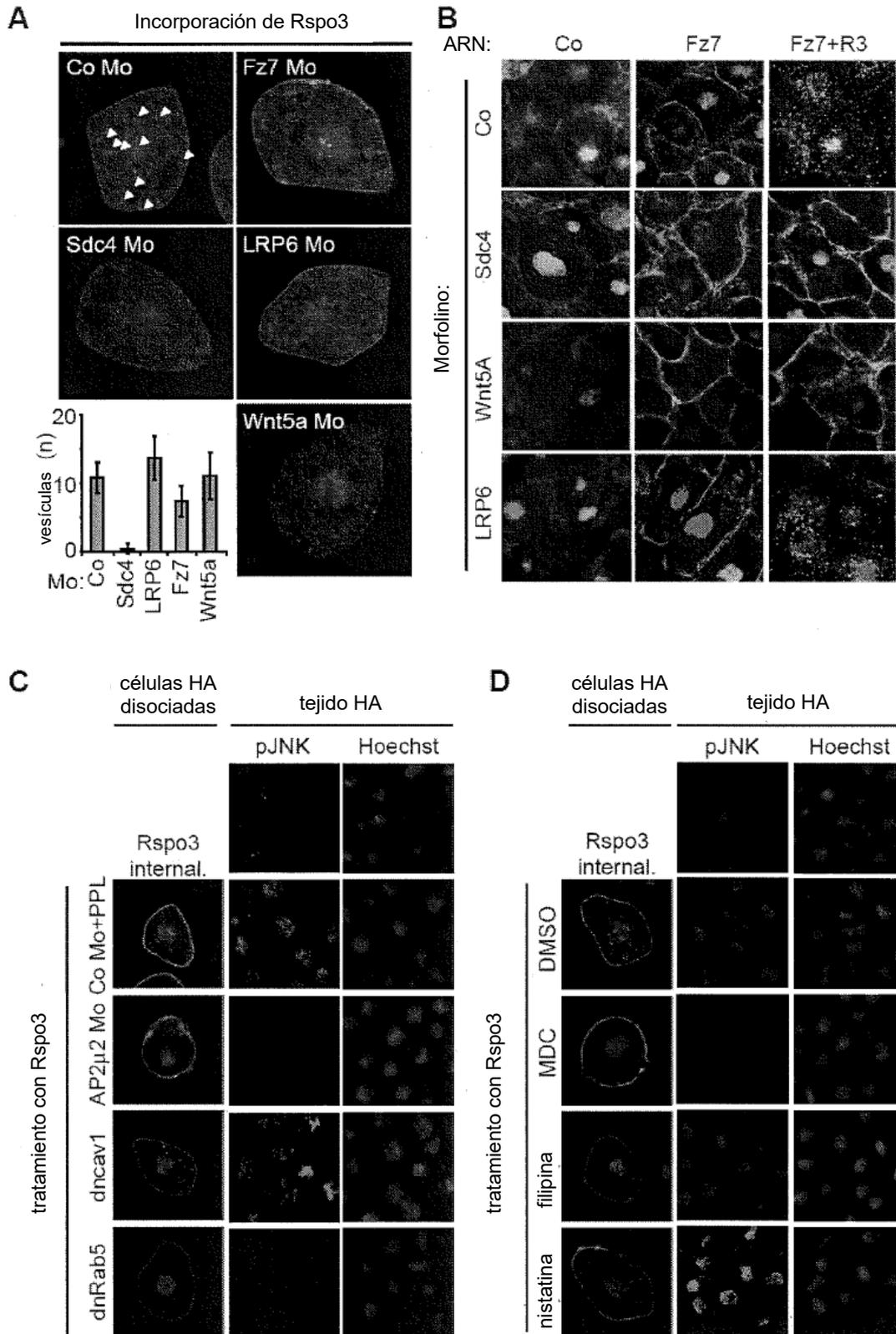


Figura 13

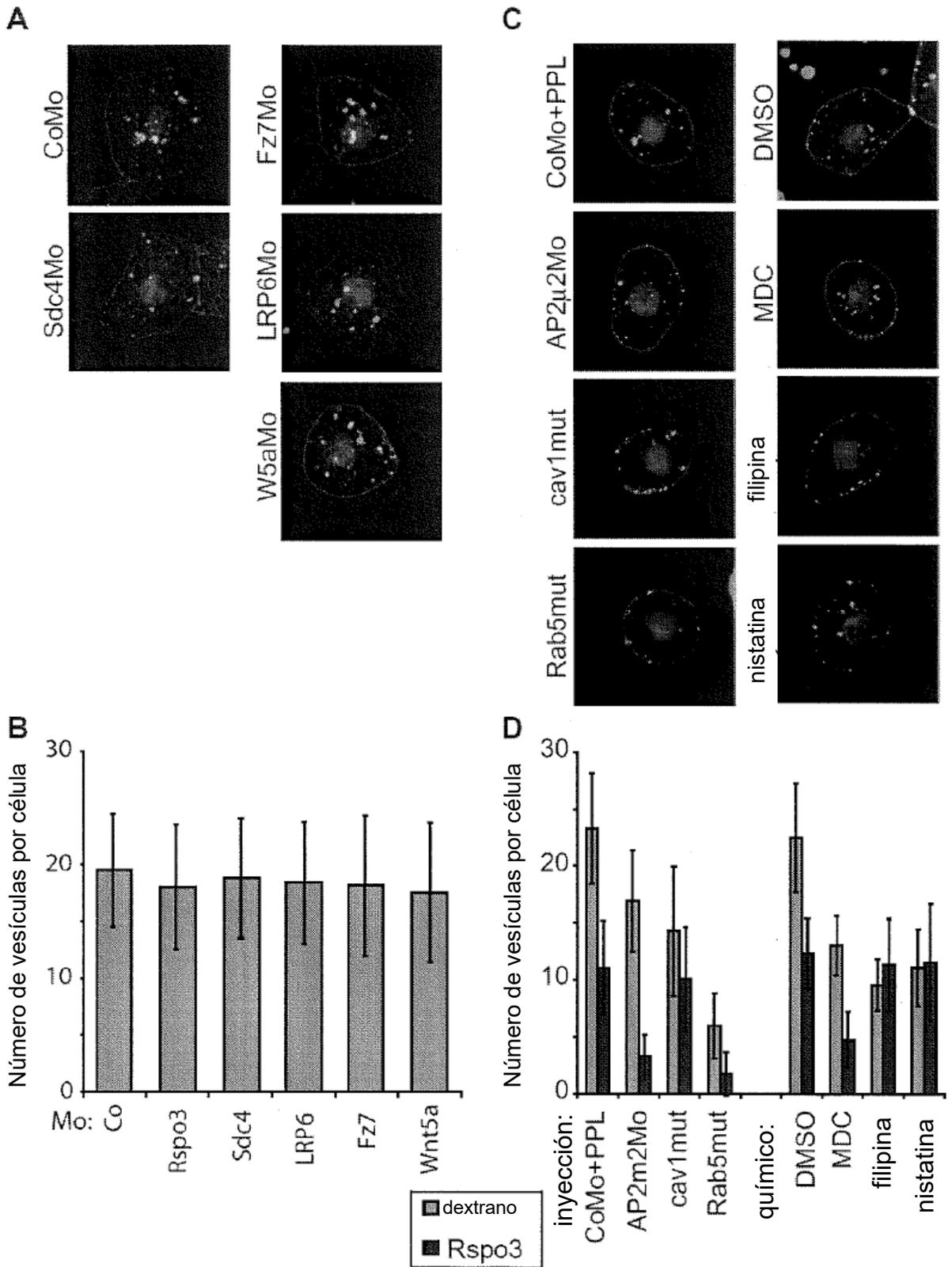


Figura 14

