

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 591**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**C07K 14/46** (2006.01)  
**C07K 14/475** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C12N 9/12** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**A61K 35/14** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2005** E 11166715 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017** EP 2409709

54 Título: **Métodos para la regulación de células madre**

30 Prioridad:

**30.12.2004 US 26399**

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

**20.02.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF WASHINGTON (50.0%)  
4311-11th Avenue NE, Suite 500 Seattle  
Washington, 98105-4608 , US y  
ROBARTS RESEARCH INSTITUTE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MOON, RANDALL T;  
BHATIA, MICKIE y  
TROWBRIDGE, JENNIFER, JEAN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 655 591 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Métodos para la regulación de células madre

**5 Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas**

Esta solicitud se refiere a la solicitud estadounidense con n.º de serie 11/026.399, presentada el 30 de diciembre de 2004.

**10 Campo**

La invención se refiere generalmente a métodos para aumentar la actividad satisfactoria de células madre, células madre/progenitoras hematopoyéticas, células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas, células madre/progenitoras musculares o células madre/progenitoras neurales *in vivo* en un sujeto mamífero. La invención se refiere además a métodos de tratamiento de una enfermedad inmunitaria, una enfermedad degenerativa mesodérmica/mesenquimatosa o una enfermedad neurodegenerativa administrando uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog en un sujeto mamífero que lo necesita.

**20 Antecedentes**

Las células madre hematopoyéticas (HSC) son células poco comunes del sistema hematopoyético con la capacidad para autorrenovarse y diferenciarse en todos los linajes sanguíneos maduros, manteniendo de ese modo la homeostasis hematopoyética y la función inmunitaria. Se ha usado eficazmente terapia de trasplante de HSC para tratar tumores malignos hematopoyéticos, insuficiencia hematopoyética/de médula ósea e inmunodeficiencia. Baron *et al.*, Arch Med Res 34:528-44, 2003; Giral, Curr Hematol Rep 3:165-72, 2004; Vollweiler *et al.*, Bone Marrow Transplant 32:1-7, 2003. A pesar de la utilidad satisfactoria de HSC, sigue habiendo varias limitaciones clínicas. Éstas incluyen la disponibilidad de donantes de HSC alogénicas y la incapacidad de recolección de números adecuados de HSC por donante. Moscardo *et al.*, Leuk Lymphoma 45:11-8, 2004. Aunque recolecciones autólogas de HSC mediante movilización de G-CSF a la sangre periférica han aliviado algo de la carga clínica para trasplante de HSC alogénica, muchos pacientes siguen siendo resistentes a la movilización y posterior reconstitución de HSC. Cohena y Nagler, Leuk Lymphoma 44:1287-99, 2003. Se ha sugerido la expansión *ex vivo* de HSC como medio para aumentar el número de HSC disponibles para trasplante autólogo o alogénico. Desafortunadamente, los métodos actuales de expansión de HSC *ex vivo* no han demostrado beneficiar a los receptores sometidos a trasplante, y pruebas experimentales sugieren que el cultivo *ex vivo* de HSC afecta negativamente a su capacidad de reconstitución hematopoyética. Devine *et al.*, Bone Marrow Transplant 31:241-52, 2003; Shih *et al.*, J Hematother Stem Cell Res 9:621-8, 2000; Srour *et al.*, J Hematother 8:93-102, 1999.

La selección como diana *in vivo* directa de HSC de pacientes proporcionaría un contexto más fisiológico para modular la función de HSC como alternativa al aislamiento de HSC y la manipulación *ex vivo*. Sin embargo, la comprensión actual de reguladores extrínsecos de HSC se ha derivado de estudios limitados a sistemas de cultivo *ex vivo* en los que se estudian HSC en sistemas de cultivo artificiales y subóptimos. Como tales, muchos factores implicados en la regulación de la autorrenovación de HSC *in vitro* no son susceptibles de uso *in vivo*.

La glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK-3) es una serina/treonina cinasa activa de manera constitutiva, identificada originalmente como glucógeno sintasa de inactivación. Frame y Cohen, Biochem J 359:1-16, 2001; Cohen, Biochem Soc Trans 7:459-80, 1979; Embi *et al.*, Eur J Biochem 107:519-27, 1980. Se ha vinculado la inhibición de GSK-3 en la regulación de varias rutas, incluyendo Wnt, Hedgehog y Notch. Behrens *et al.*, Science 280:596-599, 1998; Yost *et al.*, Genes Dev 10: 1443-1454, 1996; Jia *et al.*, Nature 416:548-552, 2002; Foltz *et al.*, Curr Biol 12:1006-1011, 2002; Espinosa *et al.*, J Biol Chem 278:32227-35, 2003. Importante para HSC, estas mismas rutas se han asociado recientemente con la función de HSC o bien mediante sobreexpresión ectópica forzada de reguladores anteriores clave de estas rutas, o bien mediante presentación de ligandos *in vitro*. Murdoch *et al.*, PNAS 100:3422-3427, 2003; Reya *et al.*, Nature 423:409-14, 2003; Bhardwaj *et al.*, Nat Immunol 2: 172-80, 2001; Karanu *et al.*, J Exp Med 192:1365-72, 2000; Karanu *et al.*, Blood 97:1960-7, 2001; Cline *et al.*, Diabetes 51:2903-2910, 2002; Ring *et al.*, Diabetes 52:588-595, 2003.

Las enfermedades musculares degenerativas, tales como distrofia muscular (DM), incluyen un grupo de enfermedades genéticas caracterizadas por debilidad progresiva y degeneración de los músculos esqueléticos que controlan el movimiento. No hay ningún tratamiento específico para ninguna de las formas de DM. La terapia respiratoria, la terapia física para prevenir contracturas musculares dolorosas, los aparatos ortopédicos usados para apoyo y la cirugía ortopédica correctora pueden mejorar la calidad de vida en algunos casos. La miopatía es un trastorno neuromuscular en el que el síntoma primario es debilidad muscular debido a disfunción de las fibras musculares. Los tratamientos para las miopatías dependen de la enfermedad o estado y las causas específicas. El tratamiento sintomático y de apoyo puede ser el único tratamiento disponible o necesario para algunos trastornos.

No se han identificado reguladores de células madre hematopoyéticas (HSC), células madre, que produzcan sus

efectos *in vivo*, limitando la manipulación clínica de HSC a sistemas *ex vivo*. No se han identificado reguladores de células progenitoras musculares o células progenitoras neurales para el tratamiento *in vivo* de enfermedades musculares degenerativas o enfermedades neurodegenerativas. Existe una necesidad en la técnica de una terapia mejorada que implique células madre hematopoyéticas para el tratamiento de enfermedades inmunitarias, y de una  
 5 terapia mejorada que implique células madre, células progenitoras musculares o células progenitoras neurales para el tratamiento de enfermedades musculares degenerativas o enfermedades neurodegenerativas.

**Sumario**

10 La presente invención se refiere a un método para aumentar la actividad satisfactoria de células madre y células progenitoras, por ejemplo, células madre/progenitoras hematopoyéticas (HSC), células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas, células madre/progenitoras endoteliales, o células madre/progenitoras neurales o ectodérmicas *in vivo* en un sujeto mamífero que comprende hacer interaccionar uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog con las células madre/progenitoras en el sujeto mamífero y aumentar las células madre/progenitoras en el sujeto mamífero. En particular la invención proporciona una composición que comprende un inhibidor de glucógeno sintasa cinasa-3 para su uso en el aumento del injerto de células progenitoras o células madre hematopoyéticas en un sujeto mamífero, en la que el inhibidor de glucógeno sintasa cinasa-3 inhibe la expresión o actividad de glucógeno sintasa cinasa-3. La invención proporciona además una composición que comprende un inhibidor de glucógeno sintasa cinasa-3 para su uso en el aumento de la reconstitución de células progenitoras o células madre hematopoyéticas en un sujeto mamífero, en la que el inhibidor de glucógeno sintasa cinasa-3 inhibe la expresión o actividad de glucógeno sintasa cinasa-3. Las células madre/progenitoras pueden incluir, pero no se limitan a, células madre/progenitoras hematopoyéticas (HSC), células madre, células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas, células madre/progenitoras endoteliales, células madre/progenitoras ectodérmicas, células madre/progenitoras musculares, células madre/progenitoras endodérmicas o células madre/progenitoras neurales. La interacción de uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog con células madre/progenitoras, por ejemplo, células madre/progenitoras hematopoyéticas, se produce o bien mediante interacción directa de los agentes que promueven la señal con las células madre/progenitoras hematopoyéticas o bien a través de una interacción indirecta entre un segundo factor de señalización o tipo celular que actúa como intermediario entre los agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog y las células madre/progenitoras hematopoyéticas. Ya sea el efecto sobre la HSC, o célula madre/progenitora, sobre la proliferación, supervivencia, diferenciación celular o injerto de células madre/progenitoras en el tejido diana, el efecto neto de la activación de la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina es un aumento en la actividad de células progenitoras/células madre medida. Una célula madre/progenitora, por ejemplo, una  
 25 células madre/progenitora hematopoyética, puede derivarse de una variedad de fuentes, incluyendo, pero sin limitarse a, médula ósea adulta o células de sangre de cordón umbilical de un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad inmunitaria que comprende administrar uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog a un sujeto mamífero y hacer interaccionar el agente con las células madre/progenitoras hematopoyéticas del sujeto mamífero. Se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad degenerativa que comprende administrar uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog a un sujeto mamífero y hacer interaccionar el agente con células madre/progenitoras hematopoyéticas, células madre, células progenitoras mesenquimatosas, células progenitoras mesodérmicas, células progenitoras musculares, células progenitoras endoteliales o células progenitoras neurales del sujeto mamífero. La enfermedad neurodegenerativa incluye, pero no se limita a, enfermedad degenerativa mesenquimatosas, enfermedad degenerativa mesodérmica, enfermedad degenerativa muscular, enfermedad degenerativa endotelial o enfermedad neurodegenerativa. Se proporciona un método de tratamiento de citopenia en un sujeto mamífero que comprende administrar uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog al sujeto mamífero.

50 Se proporciona un método para aumentar *in vivo* las células madre hematopoyéticas en un sujeto mamífero que comprende hacer interaccionar uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog con las células madre hematopoyéticas en el sujeto mamífero y aumentar las células madre hematopoyéticas en el sujeto mamífero en comparación con las células madre hematopoyéticas en el sujeto mamífero antes del tratamiento. En un aspecto, el agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina es un agonista de uno o más de Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt7c, Wnt8, Wnt8a, Wnt8b, Wnt8c, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt14, Wnt15 o Wnt16. En un aspecto adicional, el agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina es un agonista de Wnt3a o Wnt8. En otro aspecto, el agente que promueve la señal de Notch es un agonista de Notch, Delta, Serrate, Jagged, Deltex, Mastermind, Enhancer of Split, Hes1, Split, Hairless, Suppressor of Hairless o RBP-Jk. En otro aspecto, el agente que promueve la señal de Hedgehog es un agonista de Desert hedgehog, Sonic hedgehog, Indian hedgehog, Gli, Gli-1, Gli-3, Patched o Patched1.  
 60

El método para aumentar *in vivo* las células madre hematopoyéticas en un sujeto mamífero proporciona además el aumento de las células madre hematopoyéticas en el sujeto como resultado de proliferación celular, migración celular, disminución de la apoptosis, autorrenovación o aumento de la supervivencia celular. En un aspecto adicional, las células madre hematopoyéticas comprenden células progenitoras de células eritroides, células de  
 65

granulocitos, células de macrófagos, células de granulocitos-macrófagos, células B, células T y tipos de colonias de linaje mixto multipotentes.

5 El método para aumentar células madre hematopoyéticas *in vivo* en un sujeto mamífero proporciona además que el agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog sea un polipéptido, ácido nucleico, molécula pequeña, oligonucleótido antisentido, ribozima, constructo de iARN, ARNip, ARNhp o anticuerpo. En un aspecto, el agente que promueve la señal de Wnt o la señal de  $\beta$ -catenina es un polipéptido, por ejemplo, un polipéptido de wnt, un polipéptido de Dishevelled o un polipéptido de  $\beta$ -catenina. En un aspecto adicional, el agente que promueve la señal de Notch es un polipéptido de Notch, polipéptido de Delta, polipéptido de Serrate, polipéptido de Jagged, polipéptido de Deltex, polipéptido de Mastermind, polipéptido de Split, polipéptido de Hairless, polipéptidos de RBP-Jk o polipéptido de Hes1. En un aspecto adicional, el agente que promueve la señal de Hedgehog es un polipéptido de Desert hedgehog, polipéptido de Sonic hedgehog, polipéptidos de Indian hedgehog, polipéptido de Gli, polipéptido de Gli-1, polipéptido de Gli-3, polipéptido de Patched o polipéptido de Patched1.

15 El método para aumentar células madre hematopoyéticas *in vivo* en un sujeto mamífero proporciona además que el agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog sea un inhibidor de glucógeno sintasa cinasa (GSK). En un aspecto adicional, el inhibidor de glucógeno sintasa cinasa (GSK) es un inhibidor de GSK-3 o un inhibidor de GSK-3 $\beta$ .

20 Se proporciona un método para tratar una enfermedad de tipo inmune en un sujeto mamífero que lo necesita que comprende administrar uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog al sujeto, y hacer interaccionar el uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog con células madre hematopoyéticas, y aumentar de ese modo *in vivo* las células madre hematopoyéticas en el sujeto para tratar la enfermedad inmunitaria en comparación con las células madre hematopoyéticas en el sujeto mamífero antes del tratamiento. En un aspecto adicional, el método comprende aumentar las células madre hematopoyéticas en el sujeto como resultado de proliferación celular, migración celular, disminución de la apoptosis, autorrenovación o aumento de la supervivencia celular. En un aspecto adicional, la enfermedad inmunitaria es diabetes, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de inmunodeficiencia, tumor maligno hematopoyético, insuficiencia hematopoyética o trasplante de células madre hematopoyéticas.

30 Se proporciona un método para tratar una enfermedad inmunitaria en un sujeto mamífero que lo necesita que comprende administrar células madre hematopoyéticas al sujeto, administrar al sujeto uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog que se ponen en contacto con las células madre hematopoyéticas en el sujeto, y hacer interaccionar el uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog con células madre hematopoyéticas, y aumentar *in vivo* las células madre hematopoyéticas en el sujeto para tratar la enfermedad inmunitaria en comparación con las células madre hematopoyéticas en el sujeto mamífero antes del tratamiento. En un aspecto adicional, el método comprende aumentar las células madre hematopoyéticas en el sujeto como resultado de proliferación celular, migración celular, disminución de la apoptosis, autorrenovación o aumento de la supervivencia celular. En un aspecto, las células madre hematopoyéticas son células de neonato, células de sangre de cordón umbilical, células de hígado fetal, células de adulto, células de médula ósea, células de sangre periférica.

45 En un aspecto adicional, las células madre hematopoyéticas son células madre hematopoyéticas autólogas o alogénicas. En un aspecto adicional, la enfermedad inmunitaria es diabetes, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de inmunodeficiencia, tumor maligno hematopoyético, insuficiencia hematopoyética o trasplante de células madre hematopoyéticas.

50 Se proporciona un método para tratar una enfermedad degenerativa en un sujeto mamífero que lo necesita que comprende administrar uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog al sujeto, y aumentar *in vivo* una o más células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas o células madre/progenitoras endoteliales en el sujeto para tratar la enfermedad degenerativa en comparación con las células madre/progenitoras en el sujeto mamífero antes del tratamiento. En un aspecto adicional, el método comprende aumentar las células madre/progenitoras en el sujeto como resultado de proliferación celular, migración celular, disminución de la apoptosis, autorrenovación o aumento de la supervivencia celular.

60 En un aspecto adicional, el método comprende aumentar *in vivo* una o más células madre/progenitoras mesenquimatosas o células madre/progenitoras mesodérmicas en el sujeto para tratar una enfermedad muscular degenerativa o para tratar una enfermedad mesenquimatosas degenerativa. En un aspecto, la enfermedad mesenquimatosas degenerativa se trata aumentando o reparando el hueso, condrocitos/cartílago, músculo esquelético, células endoteliales o células adiposas. En un aspecto adicional, el método comprende aumentar *in vivo* una o más células madre/progenitoras endoteliales en el sujeto para tratar una enfermedad endotelial degenerativa. En un aspecto, la enfermedad endotelial degenerativa se trata aumentando la vascularización o aumentando la angiogénesis.

65

En un aspecto, la enfermedad muscular degenerativa es distrofia muscular, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia muscular miotónica, miopatía congénita o miopatía mitocondrial. En un aspecto adicional, la enfermedad muscular degenerativa es cardiomiopatía familiar, cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía restrictiva o arteriopatía coronaria con cardiomiopatía isquémica resultante. En un aspecto adicional, el método comprende aumentar *in vivo* una o más células madre/progenitoras mesenquimatosas o células madre/progenitoras mesodérmicas en el sujeto para tratar una enfermedad hepática degenerativa, enfermedad nefrítica, cirrosis, cirrosis alcohólica, hígado graso, hepatitis alcohólica, hepatitis viral, carcinoma de hígado, cirrosis postnecrótica, cirrosis biliar, lesión hepatocelular o un trastorno del tracto biliar. En un aspecto adicional, el método comprende aumentar *in vivo* una o más células madre/progenitoras mesenquimatosas o células madre/progenitoras mesodérmicas en el sujeto para tratar una enfermedad pancreática degenerativa, diabetes, trastorno relacionado con diabetes, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, resistencia a la insulina, metabolismo de la glucosa alterado, obesidad, retinopatía diabética, degeneración macular, cataratas, nefropatía diabética, glomeruloesclerosis, neuropatía diabética, disfunción eréctil, síndrome premenstrual, reestenosis vascular, colitis ulcerosa, cardiopatía coronaria, hipertensión, angina de pecho, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, trastornos del tejido conjuntivo y de la piel, ulceraciones del pie, acidosis metabólica, artritis u osteoporosis.

Se proporciona un método para tratar una enfermedad degenerativa en un sujeto mamífero que lo necesita que comprende administrar una o más células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas o células madre/progenitoras endoteliales al sujeto, administrar al sujeto uno o más agentes que promueven la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog que se ponen en contacto con las células madre/progenitoras en el sujeto, y hacer interaccionar el uno o más agentes que promueven la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog con las células madre/progenitoras, y aumentar *in vivo* las células madre/progenitoras en el sujeto para tratar la enfermedad degenerativa en comparación con las células madre/progenitoras en el sujeto mamífero antes del tratamiento. En un aspecto, las células madre/progenitoras son células de neonato, células de sangre de cordón umbilical, células de hígado fetal, células de adulto, células de médula ósea, células de sangre periférica o células madre embrionarias. En un aspecto adicional, las células madre o células progenitoras musculares son células madre/células progenitoras musculares autólogas o alogénicas. En un aspecto adicional, el método comprende aumentar las células madre/progenitoras en el sujeto como resultado de proliferación celular, migración celular, disminución de la apoptosis, autorrenovación o aumento de la supervivencia celular.

En un aspecto adicional, el método comprende aumentar *in vivo* una o más células madre/progenitoras mesenquimatosas o células madre/progenitoras mesodérmicas en el sujeto para tratar una enfermedad muscular degenerativa, distrofia muscular, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia muscular miotónica, miopatía congénita o miopatía mitocondrial. En un aspecto, la enfermedad muscular degenerativa es cardiomiopatía familiar, cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía restrictiva o arteriopatía coronaria con cardiomiopatía isquémica resultante. En un aspecto adicional, el método comprende aumentar *in vivo* una o más células madre/progenitoras mesenquimatosas o células madre/progenitoras mesodérmicas en el sujeto para tratar una enfermedad hepática degenerativa, enfermedad nefrítica, cirrosis, cirrosis alcohólica, hígado graso, hepatitis alcohólica, hepatitis viral, carcinoma de hígado, cirrosis postnecrótica, cirrosis biliar, lesión hepatocelular o un trastorno del tracto biliar.

En un aspecto adicional, el método comprende aumentar *in vivo* una o más células madre/progenitoras mesodérmicas en el sujeto para tratar una enfermedad pancreática degenerativa, diabetes, trastorno relacionado con diabetes, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, resistencia a la insulina, metabolismo de la glucosa alterado, obesidad, retinopatía diabética, degeneración macular, cataratas, nefropatía diabética, glomeruloesclerosis, neuropatía diabética, disfunción eréctil, síndrome premenstrual, reestenosis vascular, colitis ulcerosa, cardiopatía coronaria, hipertensión, angina de pecho, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, trastornos del tejido conjuntivo y de la piel, ulceraciones del pie, acidosis metabólica, artritis u osteoporosis.

En un aspecto adicional, el método comprende aumentar *in vivo* una o más células madre/progenitoras mesenquimatosas en el sujeto para tratar una enfermedad mesenquimatosas degenerativa. En un aspecto, la enfermedad mesenquimatosas degenerativa se trata aumentando o reparando el hueso, aumentando o reparando condrocitos/cartílago, aumentando o reparando el músculo esquelético, aumentando o reparando células endoteliales, o aumentando o reparando células adiposas. En un aspecto adicional, el método comprende aumentar *in vivo* una o más células madre/progenitoras endoteliales en el sujeto para tratar una enfermedad endotelial degenerativa. En un aspecto, la enfermedad endotelial degenerativa se trata aumentando la vascularización o aumentando la angiogénesis.

Se proporciona un método para tratar una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto mamífero que lo necesita que comprende administrar uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog al sujeto, y aumentar *in vivo* una o más células madre/progenitoras neurales en el sujeto para tratar la enfermedad neurodegenerativa en comparación con las células madre/progenitoras neurales en el sujeto mamífero antes del tratamiento. En un aspecto adicional, el método comprende aumentar las células madre/progenitoras neurales en el sujeto como resultado de proliferación celular, migración celular, disminución de la apoptosis,

autorrenovación o aumento de la supervivencia celular. En un aspecto, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple (EM) o esclerosis lateral amiotrófica.

5 Se proporciona un método para tratar una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto mamífero que lo necesita que comprende administrar células madre/progenitoras neurales al sujeto, administrar al sujeto uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog que se ponen en contacto con las células madre/progenitoras neurales en el sujeto, y hacer interaccionar el uno o más agentes que promueven la  
10 señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog con las células madre/progenitoras neurales, y aumentar *in vivo* las células madre/progenitoras neurales en el sujeto para tratar la enfermedad neurodegenerativa en comparación con las células madre/progenitoras neurales en el sujeto mamífero antes del tratamiento. En un aspecto, las células madre/progenitoras neurales son células madre/progenitoras autólogas o alogénicas. En un aspecto adicional, las células madre/progenitoras neurales son células de neonato, células de sangre de cordón umbilical, células de adulto, células de médula ósea, células de sangre periférica o células madre embrionarias. En un  
15 aspecto adicional, el método comprende aumentar las células madre/progenitoras neurales en el sujeto como resultado de proliferación celular, migración celular, disminución de la apoptosis, autorrenovación o aumento de la supervivencia celular. En un aspecto, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple (EM) o esclerosis lateral amiotrófica.

20 Se proporciona un método para tratar la enfermedad de leucemia en un sujeto mamífero que lo necesita que comprende administrar uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog al sujeto, y disminuir *in vivo* la proliferación de células madre/progenitoras leucémicas en el sujeto para tratar la enfermedad de leucemia en comparación con las células madre/progenitoras leucémicas en el sujeto mamífero antes del tratamiento.

25 Se proporciona un método para tratar una enfermedad de leucemia en un sujeto mamífero que lo necesita que comprende administrar células madre/progenitoras hematopoyéticas al sujeto, administrar al sujeto uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog que se ponen en contacto con las células madre/progenitoras hematopoyéticas en el sujeto, y hacer interaccionar el uno o más agentes que  
30 promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog con las células madre/progenitoras hematopoyéticas, y disminuir *in vivo* la proliferación de células madre/progenitoras de leucemia en el sujeto para tratar la enfermedad de leucemia en comparación con las células madre/progenitoras leucémicas en el sujeto mamífero antes del tratamiento. En un aspecto, la enfermedad de leucemia es leucemia mielógena crónica.

35 Para los métodos proporcionados para tratar una enfermedad inmunitaria en un sujeto mamífero, para tratar una enfermedad degenerativa relacionada con células madre/progenitoras hematopoyéticas, células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas o células madre/progenitoras endoteliales, para tratar una enfermedad neurodegenerativa, o para tratar una enfermedad de leucemia, se administran uno o más agentes que promueven la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog al sujeto  
40 mamífero que se ponen en contacto con las células madre/progenitoras en el sujeto. En un aspecto, el agente que promueve la señal de Wnt o señal de  $\beta$ -catenina es un agonista de uno o más de Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt7c, Wnt8, Wnt8a, Wnt8b, Wnt8c, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt14, Wnt15 o Wnt16. En un aspecto adicional, el agente que promueve la señal de Notch es un agonista de Notch, Delta, Serrate, Jagged, Deltex, Mastermind, Enhancer of Split, Hes1, Split, Hairless, Suppressor of Hairless o RBP-Jk. En un aspecto adicional, el agente que promueve la señal de Hedgehog es un agonista de Desert hedgehog, Sonic hedgehog, Indian hedgehog, Gli, Gli-1, Gli-3, Patched o Patched1.

45 En un aspecto, el agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog es un polipéptido, ácido nucleico, molécula pequeña, oligonucleótido antisentido, ribozima, constructo de iARN, ARNip, ARNhp o anticuerpo. En un aspecto adicional, el agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o  
50 señal de Hedgehog es un polipéptido. El agente que promueve la señal de Wnt o  $\beta$ -catenina proporcionado en un aspecto adicional es un polipéptido de Wnt, un polipéptido de Dishevelled o un polipéptido de  $\beta$ -catenina.

55 En un aspecto adicional, el agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog es un inhibidor de glucógeno sintasa cinasa (GSK). En un aspecto adicional, el inhibidor de glucógeno sintasa cinasa (GSK) es un inhibidor de GSK-3 o un inhibidor de GSK-3 $\beta$ .

60 Se proporciona un método de tratamiento de citopenia en un sujeto mamífero que comprende hacer interaccionar uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog con las células madre hematopoyéticas en el sujeto mamífero y aumentar las células madre hematopoyéticas en el sujeto mamífero para tratar la citopenia en comparación con las células madre hematopoyéticas en el sujeto mamífero antes del  
tratamiento. En un aspecto, la citopenia resulta de la irradiación del sujeto mamífero. En otro aspecto, la citopenia resulta de la irradiación medioambiental. En un aspecto detallado, la citopenia resulta de la irradiación para terapia  
65 contra el cáncer. En un aspecto detallado adicional, la citopenia resulta de la quimioterapia contra el cáncer.

5 Se proporciona un método para identificar un compuesto de prueba que aumenta las células madre/progenitoras hematopoyéticas en un sujeto mamífero que comprende hacer interaccionar un compuesto de prueba con una célula madre/progenitora hematopoyética en un sistema de ensayo a base de células, someter a ensayo para detectar un efecto del compuesto de prueba sobre la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog en el sistema de ensayo a base de células y sobre la modulación de células madre/progenitoras hematopoyéticas, identificando de ese modo compuestos que aumentan las células madre/progenitoras hematopoyéticas en el sujeto mamífero en comparación con las células madre hematopoyéticas en el sujeto mamífero antes del tratamiento.

10 Se proporciona un método para seleccionar candidatos a fármaco en un sujeto mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto al sujeto mamífero en el que el compuesto actúa como activador de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, y en el que el compuesto aumenta las células madre/progenitoras hematopoyéticas en un sistema de ensayo a base de células en comparación con las células madre hematopoyéticas en el sujeto mamífero antes del tratamiento.

15 Se proporciona un método para seleccionar candidatos a fármaco en un sujeto mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto al sujeto mamífero en el que el compuesto actúa como activador de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, y en el que el compuesto aumenta las células madre/progenitoras hematopoyéticas en el sujeto mamífero en comparación con las células madre hematopoyéticas en el sujeto mamífero antes del tratamiento.

### Breve descripción de los dibujos

25 Las figuras 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h, 1i, 1j y 1k muestran que la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 aumenta la capacidad de repoblación de HSC silvestre.

Las figuras 2a, 2b, 2c, 2d y 2e muestran que la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 aumenta la capacidad de HSC de neonato y de adulto humanas.

30 Las figuras 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h y 3i muestran que la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 expande un subconjunto de células Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> con capacidad progenitora pero no potencial de reconstitución secundaria.

35 Las figuras 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g, 4h, 4i, 4j y 4k muestran que la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 a ratones TOP-gal potencia la actividad de HSC y regula las dianas de las rutas de Wnt, Notch y Hedgehog.

Las figuras 5a, 5b, 5c y 5d muestran que la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 a ratones Ptc-1<sup>+/-lacZ</sup> potencia la actividad de HSC y disminuye las dianas de señalización de Hedgehog.

40 Las figuras 6a, 6b, 6c y 6d muestran los efectos *in vitro* del inhibidor de GSK-3 sobre HSC purificadas.

La figura 7 muestra un modelo propuesto para los efectos funcionales y moleculares de la inhibición de GSK-3 sobre HSC de mamífero.

### 45 Descripción detallada

La invención se refiere generalmente a un método para aumentar la actividad satisfactoria de células madre y células progenitoras, por ejemplo, células madre/progenitoras hematopoyéticas (HSC), células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas, células madre/progenitoras endoteliales o células madre/progenitoras neurales o ectodérmicas *in vivo* en un sujeto mamífero que comprende hacer interaccionar uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog con las células madre/progenitoras en el sujeto mamífero y aumentar las células madre/progenitoras en el sujeto mamífero. Las células madre/progenitoras pueden incluir, pero no se limitan a, células madre/progenitoras hematopoyéticas (HSC), células madre, células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas, células madre/progenitoras endoteliales, células madre/progenitoras ectodérmicas, células madre/progenitoras musculares, células madre/progenitoras endodérmicas o células madre/progenitoras neurales. La interacción de uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog con células madre/progenitoras, por ejemplo, células madre/progenitoras hematopoyéticas, se produce o bien mediante interacción directa de los agentes que promueven la señal con las células madre/progenitoras hematopoyéticas o bien a través de una interacción indirecta entre un segundo factor de señalización o tipo celular que actúa como intermediario entre los agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog y las células madre/progenitoras hematopoyéticas. Ya sea el efecto sobre la HSC, o célula madre/progenitora, sobre la proliferación, supervivencia, diferenciación celular o injerto de células madre/progenitoras en el tejido diana, el efecto neto de la activación de la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina es un aumento en la actividad de células progenitoras/células madre medida. Una célula madre/progenitora, por ejemplo, una célula madre/progenitora

hematopoyética, puede derivarse de una variedad de fuentes, incluyendo, pero sin limitarse a, médula ósea adulta, células de sangre de cordón umbilical o células madre embrionarias de un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad inmunitaria que comprende administrar uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog a un sujeto mamífero y hacer interaccionar el agente con las células madre/progenitoras hematopoyéticas del sujeto mamífero. Se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad degenerativa que comprende administrar uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog a un sujeto mamífero y hacer interaccionar el agente con células madre/progenitoras hematopoyéticas, células madre, células progenitoras mesenquimatosas, células progenitoras mesodérmicas, células progenitoras musculares, células progenitoras endoteliales o células progenitoras neurales del sujeto mamífero. La enfermedad degenerativa incluye, pero no se limita a, enfermedad degenerativa mesenquimatosa, enfermedad degenerativa mesodérmica, enfermedad degenerativa muscular, enfermedad degenerativa endotelial o enfermedad neurodegenerativa.

Aún no se han identificado reguladores de células madre/progenitoras hematopoyéticas (HSC) que produzcan sus efectos *in vivo*, limitando la manipulación clínica de HSC a sistemas *ex vivo*. La función de HSC puede aumentarse mediante la administración de agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, por ejemplo, inhibidores de glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK-3), a ratones receptores sometidos a trasplante con o bien HSC de reconstitución de ratón silvestre o bien HSC humanas. Utilizando modelos indicadores de ratón y tratamiento directo de HSC purificadas, los inhibidores de GSK-3 demostraron potenciar la actividad de HSC y modular dianas génicas de las rutas de Wnt, Hedgehog y Notch, sin afectar a células hematopoyéticas más maduras. Este estudio establece que GSK-3 es un modulador específico de la actividad de HSC, que puede regular las rutas de Wnt, Hedgehog y Notch. La administración de inhibidores de GSK-3 de cualquier naturaleza química puede proporcionar un enfoque clínico para potenciar la capacidad de HSC *in vivo*, proporcionando de ese modo una alternativa a la manipulación *ex vivo* que necesita la extracción de las HSC de su entorno fisiológico.

La presente invención demuestra que la administración *in vivo* de uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, por ejemplo, un inhibidor de GSK-3, aumenta la función de repoblación de HSC de ratón silvestre trasplantadas, y aumenta la capacidad de HSC de neonato y de adulto humanas *in vivo*. En la presente invención, se ha investigado el papel de los inhibidores de GSK-3 competitivos con ATP en la regulación de HSC humanas y de ratón. Los hallazgos demuestran que los inhibidores de GSK-3 aumentan la función de HSC *in vivo* y modulan dianas de Wnt, Hedgehog y Notch específicamente en HSC, proporcionando de ese modo un enfoque potente y único para potenciar directamente la función de HSC *in vivo*.

Debe entenderse que esta invención no se limita a métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares, que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares sólo, y no debe interpretarse que es limitativa. Tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una combinación de dos o más células, y similares.

El término “aproximadamente” tal como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, quiere decir que abarca variaciones de  $\pm 20\%$  o  $\pm 10\%$ , más preferiblemente  $\pm 5\%$ , incluso más preferiblemente  $\pm 1\%$ , y todavía más preferiblemente  $\pm 0,1\%$  del valor especificado, según tales variaciones sean apropiadas para realizar los métodos dados a conocer.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica para someter a prueba la presente invención, se describen los materiales y métodos preferidos en el presente documento. Al describir y reivindicar la presente invención, se usará la siguiente terminología.

“Aumentar las células madre hematopoyéticas *in vivo* en un sujeto mamífero” o “aumentar las células madre hematopoyéticas en un sujeto mamífero” o “aumentar la actividad satisfactoria de células madre/progenitoras, o células madre/progenitoras hematopoyéticas *in vivo* en un sujeto mamífero” o “aumentar la actividad satisfactoria de la HSC o célula madre/progenitora” se refiere a aumentar un aspecto del ciclo de vida de la célula madre/progenitora o la célula madre/progenitora hematopoyética (HSC), por ejemplo, como resultado de un proceso, incluyendo pero sin limitarse a, proliferación celular, migración celular al tejido diana deseado (por ejemplo, se proporcionan por vía intravenosa HSC trasplantadas y se establecen en la médula ósea), disminución de la apoptosis, autorrenovación o aumento de la supervivencia celular. Un aumento en las células madre/progenitoras hematopoyéticas *in vivo* puede medirse mediante un ensayo celular tal como se da a conocer en el presente documento (por ejemplo, ensayo de repoblación de células madre hematopoyéticas *in vivo*, o ensayo de unidades formadoras de colonias (CFU)) u otro ensayo celular conocido en la técnica. El aumento de las células madre/progenitoras hematopoyéticas *in vivo* en un sujeto mamífero o el aumento de la actividad satisfactoria puede medirse comparando el aumento en veces en HSC en un sujeto mamífero tratado mediante la administración de uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog al sujeto mamífero en comparación con las HSC en un sujeto

mamífero en ausencia de tal tratamiento, tal como se mide mediante cualquiera de los ensayos de actividad celular para HSC o células madre/progenitoras comentados en el presente documento o conocidos por un experto en la técnica. El número inicial de HSC en un sujeto mamífero se considera la actividad satisfactoria de las HSC en un sujeto mamífero en ausencia de tal tratamiento. El aumento en HSC en el sujeto mamífero tratado mediante la administración de uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog puede ser, por ejemplo, de al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces o al menos 10 veces en comparación con HSC en el sujeto mamífero antes del tratamiento.

“Aumentar *in vivo* las células madre/progenitoras mesenquimatosas o células madre/progenitoras mesodérmicas en un sujeto mamífero” o “aumentar las células madre/progenitoras mesenquimatosas o células madre/progenitoras mesodérmicas en un sujeto mamífero” o “aumentar *in vivo* las células madre/progenitoras neurales en un sujeto mamífero” o “aumentar las células madre/progenitoras neurales en un sujeto mamífero” o “aumentar la actividad satisfactoria de las células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas o células progenitoras neurales *in vivo* en un sujeto mamífero” se refiere a aumentar un aspecto del ciclo de vida de las células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas, células progenitoras neurales, células madre o células progenitoras musculares, por ejemplo, como resultado de un proceso celular, incluyendo pero sin limitarse a, proliferación celular, migración celular al tejido diana deseado (por ejemplo, se proporcionan por vía intravenosa células madre, células progenitoras musculares o células progenitoras neurales trasplantadas y se establecen en la médula ósea, músculo o tejido nervioso), disminución de la apoptosis, autorrenovación o aumento de la supervivencia celular. Un aumento en las células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas, células progenitoras neurales, células madre o células progenitoras musculares *in vivo* puede medirse mediante un ensayo celular tal como se da a conocer en el presente documento (por ejemplo, ensayo de repoblación de células madre hematopoyéticas *in vivo*, ensayo de unidades formadoras de colonias (CFU) hematopoyéticas, ensayo de repoblación de células progenitoras o células madre *in vivo*, ensayo de unidades formadoras de colonias (CFU) de células progenitoras o células madre u otro ensayo celular conocido en la técnica). El aumento de las células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas, células progenitoras neurales, células madre o células progenitoras musculares *in vivo* en un sujeto mamífero puede medirse comparando el aumento en veces en células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas, células progenitoras neurales, células madre o células progenitoras musculares en un sujeto mamífero tratado mediante la administración de uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog al sujeto mamífero en comparación con el número de células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas, células progenitoras neurales, células madre o células progenitoras musculares en un sujeto mamífero en ausencia de tal tratamiento. El aumento en células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas, células progenitoras neurales, células madre o células progenitoras musculares en el sujeto mamífero tratado mediante la administración de uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog puede ser, por ejemplo, de al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces o al menos 10 veces en comparación con las células madre/progenitoras en el sujeto mamífero antes del tratamiento.

“Hacer interaccionar uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog con las células madre hematopoyéticas en el sujeto mamífero” se refiere a o bien (1) un contacto directo entre el agente y la célula o bien (2) una interacción indirecta entre el agente y la célula a través de una molécula intermediaria o tipo celular intermediario. La etapa de hacer interaccionar puede referirse a poner en contacto directamente la célula madre/progenitora hematopoyética con los agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog para inducir señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog dentro de la célula madre/progenitora, por ejemplo, a través de la interacción receptor/ligando, señalización intracelular, regulación transcripcional de la expresión génica, interacción célula-célula o señalización intercelular.

Alternativamente, la etapa de “hacer interaccionar” se refiere a una interacción indirecta entre una célula madre/progenitora hematopoyética y los agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog mediada a través de un tercer componente, por ejemplo, a través de una molécula de señalización intermediaria, receptor, ligando, factor de crecimiento o tipo celular, que afecta, o se ve afectado, por la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. Por ejemplo, “la interacción de uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog con las células madre/progenitoras hematopoyéticas en el sujeto mamífero” puede producirse mediante una interacción indirecta entre células madre/progenitoras hematopoyéticas, células madre, células progenitoras musculares, células progenitoras neurales, con los agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog. La interacción indirecta puede producirse a través de moléculas de señalización intermediarias, por ejemplo, factores de crecimiento, ligandos, receptores o a través de otros tipos celulares que transmiten las señales intermediarias. Las moléculas de señalización intermediarias, factores de crecimiento, factores de transcripción, ligandos o receptores que aumentan las HSC, células madre/progenitoras mesenquimatosas o células madre/progenitoras mesodérmicas, células madre/progenitoras neurales, células madre/progenitoras musculares o células madre *in vivo* en un sujeto mamífero incluyen, pero no se limitan a, Notch, Notch1, Jagged-1, Delta, Delta-1,

- Delta-4, Oct-3/4, Rex-1, Nanog, LIF-STAT2, STAT5, STAT5A, Sonic hedgehog, proteínas morfogenéticas óseas, inhibidor de cinasa dependiente de ciclina, p21<sup>Cipl/Waff</sup>, HoxB4 o citocinas, por ejemplo, SCF, Fit-3L, G-CSF, IL-3, IL-6 o IL-11. Una interacción indirecta entre las células madre/progenitoras hematopoyéticas y los agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog puede producirse poniendo en contacto las células madre/progenitoras hematopoyéticas con varios factores de crecimiento diferentes o en varios tipos celulares diferentes. Los tipos celulares incluyen, pero no se limitan a, células estromales en médula ósea, cualquier célula en músculo y todas las células neurales incluyendo células gliales y astrocitos.
- “Agente que promueve la señal de Wnt o  $\beta$ -catenina” se refiere a un agonista de la ruta de señalización de Wnt, incluyendo pero sin limitarse a un agonista de uno o más de Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt7c, Wnt8, Wnt8a, Wnt8b, Wnt8c, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt14, Wnt15 o Wnt16. “Agente que promueve la señal de Wnt o  $\beta$ -catenina” se refiere a uno o más de los siguientes polipéptidos o un fragmento de los mismos: un polipéptido de Dkk, un polipéptido de Crescent, un polipéptido de Cerberus, un polipéptido de axina, un polipéptido de Frzb, un polipéptido de glucógeno sintasa cinasa, un polipéptido de factor de células T o un polipéptido de Dishevelled dominante negativo.
- “Agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog” se refiere además a agonistas o antagonistas de moléculas de señalización positivas o negativas, respectivamente, de la ruta de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. Las moléculas de señalización de la ruta de señalización de Wnt incluyen, pero no se limitan a,  $\beta$ -catenina, producto génico supresor de tumores de poliposis adenomatosa coli (APC), axina, glucógeno sintasa cinasa (GSK)-3 $\beta$ , factores de transcripción TCF/LEF, Crescent, Groucho, CBP, receptor Frizzled, proteínas relacionadas con Frizzled, LRP, LRP5, LRP6, kremina, Dvl/Dsh (Dishevelled), Dickkopf, proteína de unión a GSK-3 (GBP), FRAT/GBP y cualquiera de los factores de la ruta de señalización de Wnt enumerados en <http://www.stanford.edu/~musse/pathways/cell2.html>.
- “Agente que promueve la señal de  $\beta$ -catenina” se refiere a agonistas o antagonistas de moléculas de señalización positivas o negativas, respectivamente, de la señalización de  $\beta$ -catenina, por ejemplo, cualquier agente que active la señalización de  $\beta$ -catenina a través de la inhibición de GSK-3 en presencia o ausencia de señalización de Wnt. Por ejemplo, puede producirse activación de la señalización de  $\beta$ -catenina en ausencia de señalización de Wnt mediante la activación de cinasa ligada a integrina, activación de p53 que conduce a activación de Siah1 o activación de la señalización de FGF. “Agente que promueve la señal de  $\beta$ -catenina” se refiere además a cualquier molécula de señalización que active genes diana de  $\beta$ -catenina y se logra mediante la inhibición de GSK-3 que puede tener potencial terapéutico. “Agente que promueve la señal de  $\beta$ -catenina” se refiere además a cualquier molécula de señalización que active genes diana de  $\beta$ -catenina independientemente de GSK-3 que puede tener potencial terapéutico. La activación de genes diana de  $\beta$ -catenina sin inhibir GSK-3 puede lograrse mediante la inhibición (por ejemplo, mediante terapia farmacológica, terapia por iARN o terapia génica) de cualquier inhibidor de la función de  $\beta$ -catenina, incluyendo, pero sin limitarse a, APC, axina, Chibby, ICAT, Groucho, CtBP.
- “Agente que promueve la señal de Wnt o la señal de  $\beta$ -catenina” se refiere a uno o más de los siguientes: un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de Wnt, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de Wnt, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un receptor de Wnt activado, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un receptor de Wnt activado, una molécula orgánica pequeña que promueve la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, una molécula orgánica pequeña que inhibe la expresión o actividad de un antagonista de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, un oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión de un antagonista de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, una ribozima que inhibe la expresión de un antagonista de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, un constructo de iARN, ARNip o ARNhp que inhibe la expresión de un antagonista de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, un anticuerpo que se une a e inhibe la actividad de un antagonista de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de  $\beta$ -catenina, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de  $\beta$ -catenina, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de Lef-1, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de Lef-1.
- “Agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog” se refiere a uno o más de los siguientes: un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de GSK-3, GSK3 $\alpha$  o GSK3 $\beta$  dominante negativo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de GSK-3, GSK3 $\alpha$  o GSK3 $\beta$  dominante negativo, una molécula orgánica pequeña que se une a e inhibe la expresión o actividad de GSK-3, GSK3 $\alpha$  o GSK3 $\beta$ , un constructo de iARN, ARNip o ARNhp que se une a e inhibe la expresión y/o actividad de GSK-3, GSK3 $\alpha$  o GSK3 $\beta$ , un oligonucleótido antisentido que se une a e inhibe la expresión de GSK-3, GSK3 $\alpha$  o GSK3 $\beta$ , un anticuerpo que se une a e inhibe la expresión y/o actividad de GSK-3, GSK3 $\alpha$  o GSK3 $\beta$ , una ribozima que se une a e inhibe la expresión de GSK-3, GSK3 $\alpha$  o GSK3 $\beta$ , y cualquier reactivo independiente de GSK-3 que active genes diana de  $\beta$ -catenina similares en efecto a la inhibición de GSK-3.

Agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, LiCl u otros inhibidores de GSK-3, tal como se muestra a modo de ejemplo en las patentes estadounidenses 6.057.117 y 6.608.063; y las solicitudes estadounidenses 2004/0092535 y 2004/0209878; los inhibidores de GSK-3 selectivos, competitivos con ATP CHIR-911 y CHIR-837 (también denominados CT-99021 y CT-98023 respectivamente). Chiron Corporation (Emeryville, CA). Estos inhibidores se purificaron hasta >95% mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. Se formuló CHIR-911 en disolución de captisol al 10% para administración *in vivo* mediante inyección intraperitoneal, con una concentración eficaz semi-máxima [CE<sub>50</sub>] de 766 nM y una selectividad >10.000 veces para GSK-3. Ring *et al.*, Diabetes 52: 588-595, 2003. Se formuló CHIR-837 en DMSO para su uso *in vitro*, con una CE<sub>50</sub> de 375nM y una selectividad >5.000 veces para GSK-3 Cline *et al.*, Diabetes 51: 2903-2910, 2002.

“Compuesto de Hedgehog” se refiere a una clase de moléculas de la familia de Hedgehog que incluye proteína Hedgehog recombinante, análogos y derivados de proteínas Hedgehog, y agonistas y antagonistas de receptores de proteínas Hedgehog y equivalentes funcionales de los mencionados anteriormente. Véase, por ejemplo, las solicitudes internacionales PCT WO 95/18856 y WO 96/17924.

“Agonista de Hedgehog” se refiere a un agente que potencia o recapitula la bioactividad de Hedgehog, tal como activando la transcripción de genes diana. Pueden usarse agonistas de Hedgehog preferidos para superar una ganancia de función de *ptc* y/o una pérdida de función de *Smoothened*, denominándose también estos últimos agonistas de *Smoothened*. “Agonista de Hedgehog” se refiere no sólo a cualquier agente que pueda actuar activando directamente la función normal de la proteína Hedgehog, sino también a cualquier agente que active la ruta de señalización de Hedgehog, y por tanto inhiba la función de *ptc*.

Las proteínas agonistas de Hedgehog adicionales incluyen, pero no se limitan a, proteínas TGF- $\beta$ , por ejemplo, TGF- $\beta$ 1, proteína morfogenética ósea (BMP), por ejemplo, BMP-4; proteínas de factor de necrosis tumoral (TNF), por ejemplo, TNF- $\alpha$ ; la familia Wnt; y proteínas Hedgehog. Los compuestos también pueden incluir agonistas, antagonistas, análogos y derivados de los anteriores que se producen de manera natural y sintéticos. Estas moléculas pueden interactuar con proteínas de membrana que inician rutas de transducción de señales de Wnt, Hedgehog o Notch dando como resultado una respuesta biológica. Por tanto, además de los compuestos anteriores, agonistas y antagonistas para estas proteínas de unión a membrana incluyendo los receptores, agonistas de receptores y antagonistas de receptores asociados con receptores de unión a Hedgehog y rutas de transducción de la señalización de Hedgehog tales como *Smoothened*, *Patched* y *Gli* pueden tener utilidad en la regulación de la hematopoyesis y el crecimiento vascular.

Se proporcionan métodos para tratar una enfermedad en un sujeto mamífero o métodos para aumentar las células madre hematopoyéticas *in vivo* en un sujeto mamífero mediante la administración de una composición terapéutica, por ejemplo, un polipéptido, ácido nucleico, molécula pequeña, oligonucleótido antisentido, ribozima, constructo de iARN, ARNip, ARNhp o anticuerpo, al sujeto mamífero. Por ejemplo, la composición terapéutica puede ser uno o más moduladores de molécula pequeña de la señalización de Hedgehog. La composición terapéutica puede ser un inhibidor de GSK-3. Además, se ha estudiado la eficacia terapéutica del antagonista de la ruta de Hedgehog, ciclopamina, en modelos preclínicos de meduloblastoma, un tumor cerebral maligno común en niños. Berman *et al.*, Science 297: 1559-1561, 2002. Se ha estudiado la eficacia terapéutica de los agonistas de la ruta de Hedgehog para el tratamiento de estados degenerativos crónicos y traumáticos. Se ha demostrado que los agonistas de la ruta de Hedgehog seleccionan como diana la proteína *Smoothened*. Se ha demostrado que tanto antagonistas como agonistas de la ruta de Hedgehog seleccionan como diana la proteína *Smoothened*. La eficacia terapéutica de un agonista de la ruta de Hedgehog, SAG, un agonista de la ruta de Hedgehog que contiene clorobenzotiofeno, se une a la proteína *Smoothened* de una manera que antagoniza la acción de la ciclopamina. King, Journal of Biology 1:8, 2002; Stecca *et al.*, Journal of Biology 1:9, 2002; Frank-Kamenetsky, *et al.*, Journal of Biology 1:10, 2002; Chen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 99: 14071-14076, 2002.

La presente invención se refiere a métodos para aumentar las células no diferenciadas de manera terminal *in vivo*, por ejemplo, células progenitoras o células madre, activando la ruta de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog en una célula madre/progenitora de manera que se inhibe la diferenciación de la célula madre/progenitora sin destruir la capacidad de la célula para proliferar. “Células precursoras” o “célula madre/progenitora” deben significar cualquier célula no diferenciada de manera terminal. La presente invención se refiere también a métodos para aumentar células no diferenciadas de manera terminal *in vivo*, por ejemplo, células progenitoras o células madre, activando la ruta de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog en las células de manera que se inhibe la diferenciación de la célula madre/progenitora sin afectar a la actividad mitótica de las células. Además, las células madre/progenitoras pueden aislarse de una población celular, si se desea, antes o después de la activación de la ruta de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog.

La activación de la ruta de Notch se logra preferiblemente poniendo en contacto la célula con un ligando de Notch, por ejemplo, en forma soluble o expresado de manera recombinante en una superficie celular o inmovilizado sobre

- una superficie sólida, o introduciendo en la célula un ácido nucleico recombinante que expresa un mutante de Notch activo dominante o un ligando de Notch activante, u otra molécula que activa la ruta de Notch. Los agonistas de la ruta de Notch pueden activar la ruta de Notch al nivel de interacción de proteína—proteína o de interacción de proteína-ADN. Los agonistas de Notch incluyen pero no se limitan a proteínas que comprenden las partes de
- 5 proteínas topográficas tales como Delta o Serrate o Jagged (Lindsell *et al.*, Cell 80: 909-917, 1995) que median la unión a Notch, y ácidos nucleicos que codifican para las anteriores (que pueden administrarse para expresar sus productos codificados *in vivo*) y proteínas, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas o derivados de los mismos que regulan la actividad o expresión génica de estas proteínas. En una realización adicional, el agonista es una proteína o derivado o fragmento de la misma que comprende un fragmento funcionalmente activo tal como un fragmento de
- 10 un ligando de Notch que media la unión a una proteína Notch. En otra realización, el agonista es una proteína humana o parte de la misma (por ejemplo, Delta humana). En otra realización, el agonista es Deltex o Suppressor of Hairless o un ácido nucleico que codifica para los anteriores (que puede administrarse para expresar su producto codificado *in vivo*).
- 15 La ruta de Notch es una ruta de transducción de señales que comprende elementos que interaccionan, genética y/o molecularmente, con la proteína de receptor de Notch. Por ejemplo, elementos que interaccionan con la proteína Notch tanto en una base molecular como genética son, por ejemplo, y no a modo de limitación, Delta, Serrate y Deltex. Elementos que interaccionan con la proteína Notch genéticamente son, por ejemplo, y no a modo de limitación, Mastermind, Hairless y Suppressor of Hairless.
- 20 “Citopenia” se refiere a una deficiencia de un elemento celular de la sangre incluyendo, pero sin limitarse a, anemia (bajo recuento de eritrocitos), neutropenia (bajo recuento de neutrófilos), leucopenia (bajo recuento de leucocitos), trombocitopenia (bajo recuento de plaquetas).
- 25 “Adulto” se refiere a tejidos y células derivados de o dentro de un sujeto animal en cualquier momento tras su nacimiento. “Embrionario” se refiere a tejidos y células derivados de o dentro de un sujeto animal en cualquier momento antes de su nacimiento.
- 30 “Desarrollo sanguíneo” se refiere a hematopoyesis y crecimiento vascular. “Crecimiento vascular” se refiere a al menos una de vasculogénesis y angiogénesis e incluye la formación de capilares, arterias, venas o vasos linfáticos.
- “Hematopoyesis” se refiere al proceso de producción de células madre/progenitoras a partir de las cuales se derivan muchos tipos celulares. “Célula madre hematopoyética” se refiere a un precursor multipotencial a partir del cual se derivan todas las clases de células sanguíneas; además, pueden derivarse células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas, células madre/progenitoras epiteliales y células
- 35 madre/progenitoras neurales o ectodérmicas a partir de células madre hematopoyéticas. “Células sanguíneas definitivas” se refiere a células sanguíneas del organismo fetal o adulto. “Células sanguíneas primitivas” se refiere a una población transitoria de células sanguíneas que se forman durante el desarrollo sanguíneo en el embrión.
- 40 “Células progenitoras” o “células madre” se refiere a células no diferenciadas que están más restringidas en su potencial para dar lugar a tipos celulares diferenciados en comparación con una célula madre. La célula progenitora o célula madre incluye, pero no se limita a, células madre/progenitoras hematopoyéticas, células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas, células madre/progenitoras epiteliales, células madre/progenitoras renales, células madre/progenitoras neurales, células madre/progenitoras cutáneas, células
- 45 madre/progenitoras de osteoblastos, células madre/progenitoras de condrocitos, células madre/progenitoras hepáticas o células madre/progenitoras musculares.
- “Asignado” se refiere a células destinadas a diferenciarse a lo largo de un linaje específico en vez de conservar la multipotencia.
- 50 “Efecto sinérgico” se refiere a dos o más compuestos en los que se observa un efecto biológico escaso o ausente con los compuestos solos pero juntos los compuestos tienen un efecto biológico potente.
- Se han identificado células madre/progenitoras hematopoyéticas (HSC) humanas en médula ósea (BM), sangre periférica y sangre de cordón umbilical (CB). La capacidad funcional de las células derivadas de estos tejidos puede hacer que se diferencien en un destino de célula hematopoyética. Además, se encontró que células estromales derivadas de la médula se diferenciaban a lo largo del linaje osteogénico. Estudios adicionales indicaron que residen
- 55 células madre/progenitoras mesenquimatosas (MSC) multipotentes dentro de la BM, y podían dar lugar a linajes de células adiposas, óseas, de cartílago, de músculo esquelético y endoteliales. Estos hallazgos combinados han conducido a la noción actual de que la BM es por tanto una fuente tanto de MSC como de HSC. De manera similar a la BM, las HSC humanas pueden encontrarse también en CB umbilical y sangre periférica, sin embargo, estudios destinados a aislar células progenitoras/madre mesenquimatosas a partir de estas fuentes hematopoyéticas alternativas han proporcionado resultados mixtos. Células de CB antes del parto presentaban propiedades mesenquimatosas mientras que estudios más recientes notificaron una falta de MSC a partir de CB después del
- 60 parto. De manera similar, los informes han demostrado la presencia o ausencia de precursores mesenquimatosos a partir de sangre periférica. Jay *et al.* Cell Research 14: 268-282, 2004 .
- 65

La sangre de cordón umbilical (CB) humana contiene una combinación de células primitivas y células maduras que se han asignado a los diversos linajes hematopoyéticos. Los estudios se han centrado en la caracterización y utilidad clínica de células madre/progenitoras a partir de CB parcialmente debido a la facilidad de obtención de esta fuente celular abundante y la inmunogenicidad disminuida de estas células tras trasplante alogénico. Para el destino celular hematopoyético, los progenitores que pueden producir hematopoyesis de múltiples linajes residen entre subconjuntos celulares de células de CB no asignadas que no expresan marcadores de linaje hematopoyético específicos. Estas células de CB maduras pueden extraerse basándose en la expresión en superficie de proteínas asociadas con diversos linajes hematopoyéticos para derivar un subconjunto restante de células primitivas denominado fracción de linaje reducido (Lin<sup>-</sup>). Se ha mostrado que HSC humanas candidatas residen exclusivamente en la fracción Lin<sup>-</sup> y pueden enriquecerse adicionalmente en subconjuntos de Lin<sup>-</sup> que expresan CD34 pero carecen de CD38 (Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>). Estudios posteriores identificaron subpoblaciones adicionales de células Lin<sup>-</sup> que tienen función progenitora hematopoyética que carecían tanto de CD34 como CD38 (Lin<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>), lo que indica que CD34 puede no ser único para el fenotipo de HSC humanas. Esta serie de estudios ilustra la heterogeneidad de la población Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> en CB humana y sugiere que pueden seguir por identificar subpoblaciones adicionales dentro de la población Lin<sup>-</sup>.

Se ha identificado una población de células en CB humana que carecen del marcador de destino celular hematopoyético, CD45. Análisis funcionales de las células Lin<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> revelaron que de manera similar a células CD45<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> de BM, estas células tienen potencial de diferenciación condrocítico y por tanto comparten propiedades de progenitores mesenquimatosos. Sin embargo, a diferencia de células madre/progenitoras mesenquimatosas derivadas de BM, las células Lin<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> derivadas de CB tienen una capacidad progenitora hematopoyética de múltiples linajes *de novo* única. El potencial funcional que presenta esta población novedosa sugiere que las células Lin<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> derivadas de CB humana son dianas terapéuticas potenciales para terapias celulares para deficiencias osteogénicas así como hematopoyéticas y representan una población de células humanas con potencial de desarrollo único. Jay *et al.* Cell Research 14: 268-282, 2004.

Las dianas terapéuticas de la terapia génica con células madre/progenitoras correctiva incluyen, pero no se limitan a, trasplante de células madre/progenitoras hematopoyéticas alogénicas o autólogas para el tratamiento de leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, enfermedad de Hodgkin, síndrome mielodisplásico.

Se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad inmunitaria en el que la enfermedad es una enfermedad de inmunodeficiencia, por ejemplo, inmunodeficiencia primaria, tal como SCID deficiente en ADA, SCID ligada al cromosoma X, inmunodeficiencia variable común, enfermedad granulomatosa crónica (CGD), agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, síndrome de Wiskott-Aldrich; hemoglobinopatía, tal como anemia drepanocítica,  $\beta$ -talasemia; otros trastornos de un único gen, tales como enfermedad de Hurler, enfermedad de Gaucher, hemofilia A, hemofilia B, deficiencia de  $\alpha$ -1 antitripsina; o defectos de células madre, tales como anemia de Fanconi.

Un método de tratamiento de una enfermedad o estados usando los métodos de la presente invención incluye pero no se limita a los siguientes estados patológicos. El gen y la alteración genética se proporcionan entre paréntesis. Esquizofrenia (*WNT1* elevado); tetra-amelia (*WNT3* LOF); intersexualidad (*WNT4* GOF); daño renal (*WNT4* elevado); enfermedad renal poliquística (*WNT4* variable); leucemia (*WNT5 $\alpha$*  LOF; reducido); metástasis (*WNT5 $\alpha$*  elevado); osteoartritis (*sFRP3* SNP; reducido); FEVR (*FZ4* LOF); vitreorretinopatía exudativa familiar (*LRP5*, masa ósea baja LOF); masa ósea alta (*LRP5* GOF); cáncer de pulmón (*DSH/DVL* elevado); cáncer (*APC* LOF); cáncer (*AXIN* LOF); cáncer (*AXIN2*, agénesis dental LOF); cáncer ( $\beta$ -*catenina* GOF); fibromatosis agresiva ( $\beta$ -*catenina* elevada); fibrosis pulmonar ( $\beta$ -*catenina* elevada); enfermedad de Alzheimer; enfermedad cardiovascular (abreviaturas: *APC*, poliposis adenomatosa coli; *DSH/DVL*, Dishevelled; *FZ*, Frizzled; GOF, ganancia de función; LOF, pérdida de función; *LRP*, proteína relacionada con receptores de LDL; *sFRP*, proteína relacionada con Frizzled secretada). Moon *et al.*, Nature Reviews Genetics 5: 689-699, 2004.

Pueden usarse inhibidores de la señalización de WNT/ $\beta$ -catenina para el tratamiento de cánceres. La señalización de WNT/ $\beta$ -catenina parece estar implicada en la progresión del cáncer, y no tan sólo en la iniciación. Kim, *et al.*, Mol. Cancer Ther. 1: 1355-1359, 2002; Gunther, *et al.*, Genes Dev. 17: 488-501, 2003; Derksen, *et al.* Proc. Natl Acad Sci. USA 101: 6122-6127, 2004. Los enfoques para el tratamiento del cáncer incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de molécula pequeña que bloquean la interacción de  $\beta$ -catenina con TCF86 o proteína de unión a CREB (CBP) (Emami, K. H. *et al.* Proc. Natl Acad Sci. USA, 2004), ARNip (Giles, *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1653: 1-24, 2003) y el uso terapéutico de anticuerpos contra WNT. He, *et al.*, Neoplasia 6, 7-14 (2004); You, *et al.*, Oncogene 21 de junio de 2004 [publicación electrónica antes de la impresión].

Otros inhibidores terapéuticos potenciales de la señalización de  $\beta$ -catenina incluyen agentes que no tienen vinculación obvia con la ruta de  $\beta$ -catenina, tal como calcio extracelular, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, incluyendo exisulind, sulindaco y aspirina, y el inhibidor de tirosina cinasa STI571/Gleevec96. A la inversa, activadores de la señalización de  $\beta$ -catenina probablemente serán útiles en el tratamiento de la osteoporosis y

enfermedad de Alzheimer, y podrían incluir activadores de LRP5 así como inhibidores de GSK3. Moon *et al.*, Nature Reviews Genetics 5: 689-699, 2004.

5 Se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad muscular degenerativa en el que la enfermedad es una distrofia muscular o miopatía. Distrofia muscular (MD) se refiere a un grupo de enfermedades genéticas  
 10 caracterizadas por debilidad progresiva y degeneración de los músculos esqueléticos que controlan el movimiento. Hay muchas formas de distrofia muscular, algunas perceptibles en el nacimiento (distrofia muscular congénita), otras en la adolescencia (MD de Becker). Los 3 tipos más comunes son de Duchenne, facioescapulohumeral y miotónica. Estos tres tipos difieren en cuanto al patrón de herencia, la edad de aparición, la velocidad de progresión y la  
 15 distribución de la debilidad. La distrofia muscular de Duchenne afecta principalmente a niños varones y es el resultado de mutaciones en el gen que regula la distrofina, una proteína implicada en el mantenimiento de la integridad de las fibras musculares. La aparición es entre los 3-5 años y progresa rápidamente. La distrofia muscular facioescapulohumeral aparece en la adolescencia y provoca debilidad progresiva en músculos faciales y  
 20 determinados músculos en los brazos y piernas. Progresa lentamente y puede variar en los síntomas de leve a incapacitante. La distrofia muscular miotónica varía en la edad de aparición y se caracteriza por miotonía (espasmo muscular prolongado) en los dedos y músculos faciales; una marcha con pies caídos, en alto estepaje; cataratas; anomalías cardíacas; y alteraciones endocrinas.

20 “Miopatía” se refiere a trastornos neuromusculares en los que el síntoma primario es debilidad muscular debida a disfunción de las fibras musculares. Otros síntomas de la miopatía pueden incluir calambres musculares, entumecimiento y espasmo. Las miopatías pueden heredarse (tal como las distrofias musculares) o adquirirse (tal como los calambres musculares comunes). La miopatía congénita se caracteriza por retrasos del desarrollo en las habilidades motoras; ocasionalmente son evidentes anomalías esqueléticas y faciales en el nacimiento. La distrofia muscular se caracteriza por debilidad progresiva en los músculos voluntarios; algunas veces evidente en el  
 25 nacimiento. La miopatía mitocondrial está provocada por anomalías genéticas en las mitocondrias, las estructuras celulares que controlan la energía; incluyen síndrome de Kearns-Sayre, MELAS y MERRF. Las enfermedades de almacenamiento de glucógeno del músculo están provocadas por mutaciones en genes que controlan enzimas que metabolizan el glucógeno y la glucosa (azúcar en sangre); incluyen las enfermedades de Pompe, Andersen y Cori. La mioglobinuria está provocada por trastornos en el metabolismo de un combustible (mioglobina) necesario para el  
 30 trabajo muscular; incluyen las enfermedades de McArdle, Tarui y DiMauro. La dermatomiositis es una miopatía inflamatoria de la piel y el músculo. La miositis osificante se caracteriza por hueso que crece en el tejido muscular. La parálisis periódica familiar se caracteriza por episodios de debilidad en los brazos y piernas. La polimiositis, miositis por cuerpos de inclusión y miopatías relacionadas son miopatías inflamatorias del músculo esquelético. La neuromiotonía se caracteriza por episodios alternos de tirones y entumecimiento, y el síndrome del hombre rígido se  
 35 caracteriza por episodios de rigidez y espasmos reflejos. El entumecimiento y los calambres musculares comunes, y la tetania se caracterizan por espasmos prolongados de los brazos y piernas.

Cardiomiopatía se refiere a una enfermedad del miocardio asociada con disfunción ventricular tal como se define por la Organización Mundial de la Salud. La cardiomiopatía dilatada se caracteriza por dilatación y contractilidad alterada  
 40 del ventrículo izquierdo (o derecho). La presentación es habitualmente con insuficiencia cardíaca. Son comunes arritmia, tromboembolia y muerte súbita. La cardiomiopatía hipertrófica se caracteriza por hipertrofia ventricular izquierda (o derecha), que es habitualmente asimétrica e implica al tabique interventricular. Normalmente, se reduce el volumen ventricular izquierdo. Están presentes algunas veces gradientes sistólicos. Las presentaciones típicas incluyen disnea, arritmia y muerte súbita. La cardiomiopatía restrictiva se caracteriza por llenado restrictivo del  
 45 ventrículo izquierdo (o derecho) con grosor de la pared y contractilidad ventricular normal o casi normal. Las presentaciones son habitualmente con insuficiencia cardíaca. Las cardiomiopatías no son la única causa del síndrome de insuficiencia cardíaca. En los países occidentales, la arteriopatía coronaria con cardiomiopatía isquémica resultante sigue siendo la causa principal de síndrome de insuficiencia cardíaca.

50 Se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa en el que la enfermedad es un trastorno del sistema nervioso central o trastorno del sistema nervioso periférico. Los trastornos del sistema nervioso central abarcan numerosas afecciones tales como enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson), lesión cerebral aguda (por ejemplo, accidente cerebrovascular, traumatismo craneoencefálico, parálisis cerebral) y un gran número de disfunciones del SNC (por ejemplo, depresión, epilepsia y  
 55 esquizofrenia). Estas enfermedades, que incluyen enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Parkinson, se han vinculado a la degeneración de células neurales en ubicaciones particulares del SNC, que conducen a la incapacidad de estas células o de la región del cerebro para llevar a cabo su función prevista.

60 “Activadores”, “inhibidores” y “moduladores” de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog se usan para referirse a moléculas activantes, o moduladoras, respectivamente, identificadas usando ensayos *in vitro* e *in vivo* para agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, por ejemplo, ligandos, agonistas, antagonistas y sus homólogos y miméticos. “Modulador” incluye inhibidores y activadores. Los inhibidores son agentes que, por ejemplo, se unen a, bloquean  
 65 parcial o totalmente la estimulación, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o regulan por disminución la actividad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de

Hedgehog, por ejemplo, antagonistas. Los activadores son agentes que, por ejemplo, se unen a, estimulan, aumentan, abren, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan o regulan por incremento la actividad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, por ejemplo, agonistas. Los moduladores incluyen agentes que, por ejemplo, alteran la interacción de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog con:

5 proteínas que se unen a activadores o inhibidores, receptores, incluyendo proteínas, péptidos, lípidos, hidratos de carbono, polisacáridos o combinaciones de los anteriores, por ejemplo, lipoproteínas, glicoproteínas y similares. Los moduladores incluyen versiones genéticamente modificadas de ligandos de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog que se producen de manera natural, por ejemplo, polipéptidos de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog con actividad alterada, así como ligandos, antagonistas, agonistas, moléculas químicas pequeñas y similares sintéticos y que se producen de manera natural. Tales ensayos para inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, aplicar supuestos

10 compuestos moduladores a una célula que expresa Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog y entonces determinar los efectos funcionales sobre la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, tal como se describe en el presente documento. Se comparan muestras o ensayos que comprenden señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog que se tratan con un activador, inhibidor o modulador potencial con muestras control sin el inhibidor, activador o modulador para examinar el grado de inhibición. Pueden asignarse muestras control (no tratadas con activadores, inhibidores o moduladores) a un valor de actividad de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog relativo del 100%. Se logra la inhibición de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog cuando el valor de actividad de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog con respecto al control es de aproximadamente el 80%, opcionalmente el 50% o el 25-0%. Se logra la activación de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog cuando el valor de actividad de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog con respecto al control es el 110%, opcionalmente el 150%, opcionalmente el 200-500% o el 1000-3000% superior. La activación de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog puede medirse en un ensayo celular para aumentar las células madre/progenitoras hematopoyéticas *in vivo* en un sujeto mamífero o aumentar las células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas, células madre/progenitoras neurales, células madre/progenitoras musculares o células madre *in vivo* en un sujeto mamífero, tal como se describe en el presente documento.

“Agonista” se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite o potencie una actividad biológica de polipéptidos de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, o la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. Las moléculas agonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos agonistas o fragmentos de anticuerpo, fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, moléculas orgánicas pequeñas y similares. Los métodos para identificar agonistas de polipéptidos de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog pueden comprender poner en contacto un polipéptido de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog con una molécula agonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, por ejemplo, la unión de Wnt al receptor de Frizzled, o la acumulación intracelular de  $\beta$ -catenina.

“Antagonista” se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquee, inhiba o neutralice parcial o completamente un inhibidor de una actividad biológica de un polipéptido de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, o la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. Las moléculas antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos antagonistas o fragmentos de anticuerpo, fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, moléculas orgánicas pequeñas y similares. Los métodos para identificar antagonistas de un inhibidor de una actividad biológica de un polipéptido de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, o de la señalización de Wnt o  $\beta$ -catenina pueden comprender poner en contacto polipéptidos de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, o polipéptidos de señalización de Wnt o  $\beta$ -catenina con una molécula antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog.

“Señalización en células” se refiere a la interacción de un ligando, tal como un ligando endógeno o exógeno, por ejemplo agentes que promueven la señal de Notch o que promueven la señal de Hedgehog, o que promueven la señal de Wnt o que promueven la señal de  $\beta$ -catenina, con receptores, tales como receptor de Frizzled, dando como resultado señalización celular para producir una respuesta, por ejemplo, aumento de la expresión de genes diana de  $\beta$ -catenina que dan como resultado el aumento de células madre/progenitoras hematopoyéticas *in vivo* en un sujeto mamífero.

“Endógeno” se refiere a una proteína, ácido nucleico, lípido u otro compuesto producido dentro del cuerpo o dentro de células u órganos del cuerpo de un sujeto mamífero o que se origina dentro de células u órganos del cuerpo de un sujeto mamífero.

“Exógeno” se refiere a una proteína, ácido nucleico, lípido u otro componente que se origina fuera del cuerpo de un sujeto mamífero.

“Compuesto de prueba” se refiere a un ácido nucleico, ADN, ARN, proteína, polipéptido o entidad química pequeña que se determina que efectúa un aumento o una disminución en la expresión de un gen como resultado de señalización a través de las rutas de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. El compuesto de prueba puede ser un ARN antisentido, ribozima, polipéptido o entidad química molecular pequeña. El “compuesto de prueba” puede ser cualquier compuesto químico pequeño, o una entidad biológica, tal como una proteína, azúcar, ácido nucleico o lípido. Normalmente, los compuestos de prueba serán moléculas químicas pequeñas y polipéptidos. Se determina que un “compuesto de prueba específico para la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog” es un modulador de la señalización de Notch o señalización de Hedgehog o señalización de Wnt o señalización de  $\beta$ -catenina, por ejemplo, si da como resultado la unión de Wnt al receptor de Frizzled, o la acumulación intracelular de  $\beta$ -catenina.

“Ensayos basados en células” incluyen ensayos de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, por ejemplo, ensayos de unión de ligando fluorescente o radioligando para Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog a células, membranas plasmáticas, proteínas de membranas plasmáticas solubilizadas con detergente, colágeno inmovilizado (Alberdi, J Biol Chem. 274: 31605-12, 1999; Meyer *et al.*, 2002); cromatografía en columna de afinidad de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog (Alberdi, J Biol Chem. 274:31605-12, 1999; Aymerich *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci. 42:3287-93, 2001); transferencia de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog usando un radioligando o ligando fluorescente (Aymerich *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci. 42:3287-93, 2001; Meyer *et al.*, 2002); ultrafiltración de exclusión molecular (Alberdi *et al.*, 1998, Biochem.; Meyer *et al.*, 2002); o ELISA. El ensayo celular para medir el aumento de células madre/progenitoras hematopoyéticas *in vivo* en un sujeto mamífero o el aumento de células progenitoras neurales, células madre o células progenitoras musculares *in vivo* en un sujeto mamífero, tal como se describe en el presente documento, incluye, pero no se limita a, ensayo de repoblación de HSC *in vivo* o ensayos de unidades formadoras de colonias (CFU) hematopoyéticas. Se examinó la reconstitución de HSC de donante de múltiples linajes mediante citometría de flujo para detectar marcadores de superficie que representan linajes primitivo (c-Kit+ Sca-1+), mieloides (CD45+ CD11b+), eritroide (CD45- Ter119+), de células B (CD45+ B220+) y de células T (CD45+ CD3+) que indican la reconstitución de HSC de donante de múltiples linajes. Ensayos de la actividad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog de la presente invención son: ensayos para el gen diana regulado por Wnt Axin2 cuantificado mediante PCR en tiempo real; Yan *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 98:14973-8, 2001; Jho *et al.*, Mol Cell Biol 22:1172-83, 2002. Gen diana regulado por Wnt, CyclinD1, cuantificado mediante PCR en tiempo real; Issack y Ziff, Cell Growth Differ 9:837-45, 1998. Gen diana regulado por Notch, Hes1, cuantificado mediante PCR en tiempo real; Jarriault *et al.*, Nature 377:355-8, 1995. Genes diana regulados por Hedgehog, Gli3 y Patched1 (Ptc1), cuantificados mediante PCR en tiempo real. Marigo *et al.*, 180 1:1996; Marigo y Tabin, Proc Natl Acad Sci USA 93: 9346-9351, 1996. Los ensayos a base de células adicionales incluyen pero no se limitan a, exámenes indicadores de luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP) o  $\beta$ -galactosidasa para genes sensibles a  $\beta$ -catenina, por ejemplo usando el indicador TOPFLASH. Véase, por ejemplo, Veeman M. *et al.*, Current Biology, 13: 680-685, 2003; Veeman M. *et al.*, Dev Cell. 5: 367-377, 2003.

En un aspecto, se proporciona un método de selección de candidatos a fármaco para agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog y comprende, por ejemplo, un ensayo indicador de gen sensible a  $\beta$ -catenina en el que un constructo de ADN indicador consiste en sitios de unión a TCF o LEF en el sentido de 5' de un promotor mínimo, y dirige la expresión de luciferasa, GFP o  $\beta$ -galactosidasa. Se usa luciferasa, GFP o  $\beta$ -galactosidasa como sustituto para demostrar el aumento de actividad de señalización de  $\beta$ -catenina, tal como se mide mediante los medios enzimáticos o de fluorescencia de proteína indicadora. Métodos adicionales de selección de candidatos a fármaco para agentes que promueven la señal de Wnt o señal de  $\beta$ -catenina implican un ensayo para medir la unión de Wnt al receptor de Frizzled, o la acumulación intracelular de  $\beta$ -catenina. La unión de Wnt al receptor de Frizzled o la acumulación intracelular de  $\beta$ -catenina puede someterse a ensayo inmovilizando o bien el ligando o bien el receptor. Por ejemplo, el ensayo puede incluir inmovilizar el receptor de Frizzled fusionado a una cola de His sobre perlas de resina NTA activadas con Ni. Puede añadirse Wnt en un tampón apropiado e incubarse las perlas durante un periodo de tiempo a una temperatura dada. Tras lavados para eliminar el material no unido, la proteína unida puede liberarse con, por ejemplo, SDS, tampones con un pH alto y similares y analizarse. Por ejemplo, el agente que promueve la señal de Wnt o señal de  $\beta$ -catenina promueve la unión de Wnt al receptor de Frizzled o la acumulación intracelular de  $\beta$ -catenina.

“Hacer interaccionar” se refiere a mezclar un compuesto de prueba, por ejemplo, uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, en una forma soluble, en un sistema de ensayo, por ejemplo, un sistema de ensayo a base de células, de manera que pueda medirse un efecto sobre la señalización mediada por receptor o la señalización intracelular. Por ejemplo, la etapa de “hacer interaccionar” puede producirse directamente poniendo en contacto la célula madre/progenitora hematopoyética, célula madre, células progenitoras musculares o célula progenitora neural y el uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog para inducir señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog dentro de la célula madre o célula progenitora. Alternativamente, la etapa de “hacer interaccionar” puede producirse indirectamente entre una célula madre/progenitora hematopoyética, célula madre, célula progenitora muscular o célula progenitora neural y los agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o

señal de Hedgehog, por ejemplo, a través de una molécula de señalización, receptor, ligando, factor de crecimiento o tipo celular intermediario, que afecta, o se ve afectado por, la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog.

5 “Receptividad a la señalización” o “eficaz para activar la señalización” o “estimulación de un sistema de ensayo a base de células” se refiere a la capacidad del agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog para potenciar una respuesta inmunitaria, para aumentar células madre/progenitoras hematopoyéticas, células madre, células madre/progenitoras mesenquimatosas, células madre/progenitoras mesodérmicas, células progenitoras musculares o células progenitoras neurales *in vivo* en un sujeto mamífero, o  
10 tratar una enfermedad inmunitaria o una enfermedad muscular degenerativa o enfermedad neurodegenerativa en un sujeto mamífero.

“Detectar un efecto” se refiere a un efecto medido en un sistema de ensayo a base de células. Por ejemplo, el efecto detectado puede ser señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog en un sistema de ensayo, por ejemplo, ensayo celular de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, ensayo de unión al receptor de Frizzled, ensayo de Axin2 o ensayo de CyclinD1, o ensayo indicador de gen sensible a  $\beta$ -catenina. Véase, por ejemplo, Veeman M. *et al.*, Current Biology, 13: 680-685, 2003; Veeman M. *et al.*, Dev Cell. 5: 367-377, 2003.

15 “Ensayo que es indicativo de modulación” se refiere a resultados de un sistema de ensayo a base de células que indican que la activación celular mediante agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog está indicada para tratar una enfermedad inmunitaria en un sujeto mamífero aumentando células madre/progenitoras hematopoyéticas, células madre, células progenitoras musculares o células progenitoras neurales *in vivo* en un sujeto mamífero o tratar una enfermedad muscular degenerativa o enfermedad neurodegenerativa en un sujeto mamífero aumentando células madre/progenitoras, células progenitoras musculares o células progenitoras neurales.  
20  
25

“Actividad biológica” y “biológicamente activo” con respecto a agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog de la presente invención se refieren a la capacidad de la molécula de ligando para unirse específicamente a y señalar a través de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog nativo o recombinante, o  
30 para bloquear la capacidad de un inhibidor de polipéptidos de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog nativos o recombinantes para participar en la transducción de señales. Por tanto, los agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog (nativos y variantes) de la presente invención incluyen agonistas de polipéptidos de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog nativos o recombinantes y receptores o ligandos de los mismos. Las actividades biológicas preferidas de los agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina,  
35 señal de Notch o señal de Hedgehog de la presente invención incluyen la capacidad para inducir o inhibir, por ejemplo, potenciar una respuesta inmunitaria, o aumentar células madre/progenitoras hematopoyéticas, células madre, células progenitoras musculares o células progenitoras neurales *in vivo* en un sujeto mamífero o tratar una enfermedad muscular degenerativa o enfermedad neurodegenerativa en un sujeto mamífero. Por consiguiente, la administración de los compuestos o agentes de la presente invención puede prevenir o retrasar, para aliviar, o  
40 detener o inhibir el desarrollo de los síntomas o estados asociados con una enfermedad inmunitaria, una enfermedad muscular degenerativa o una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto mamífero.

“Ruta de transducción de señales” o “acontecimiento de transducción de señales” se refiere a al menos una reacción bioquímica, aunque más comúnmente una serie de reacciones bioquímicas, que resultan de la interacción de una  
45 célula con un agente o compuesto estimulador. Por tanto, la interacción de un compuesto estimulador con una célula genera una “señal” que se transmite a través de la ruta de transducción de señales, dando como resultado en última instancia una respuesta celular, por ejemplo, una respuesta inmunitaria descrita anteriormente.

“Alta afinidad” por un ligando se refiere a una constante de asociación en equilibrio ( $K_a$ ) de al menos aproximadamente  $10^3 M^{-1}$ , al menos aproximadamente  $10^4 M^{-1}$ , al menos aproximadamente  $10^5 M^{-1}$  al menos aproximadamente  $10^6 M^{-1}$ , al menos aproximadamente  $10^7 M^{-1}$ , al menos aproximadamente  $10^8 M^{-1}$ , al menos aproximadamente  $10^9 M^{-1}$ , al menos aproximadamente  $10^{10} M^{-1}$ , al menos aproximadamente  $10^{11} M^{-1}$  o al menos aproximadamente  $10^{12} M^{-1}$  o mayor, por ejemplo, hasta  $10^{13} M^{-1}$  o  $10^{14} M^{-1}$  o mayor. Sin embargo, la unión de “alta afinidad” puede variar para otros ligandos.  
50  
55

“ $K_a$ ”, tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de asociación en equilibrio de una interacción ligando-receptor particular, por ejemplo, interacción anticuerpo-antígeno. Esta constante tiene unidades de 1/M.

60 “ $K_d$ ”, tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación en equilibrio de una interacción ligando-receptor particular. Esta constante tiene unidades de M.

“ $k_a$ ”, tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de asociación cinética de una interacción ligando-receptor particular. Esta constante tiene unidades de 1/Ms.

65

" $k_d$ ", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación cinética de una interacción ligando-receptor particular. Esta constante tiene unidades de 1/s.

5 "Interacciones ligando-receptor particulares" se refiere a las condiciones experimentales en las que se miden las constantes cinéticas y de equilibrio.

10 "Isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo que está codificado por genes de regiones constantes de cadena pesada. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Variaciones estructurales adicionales caracterizan distintos subtipos de de IgG (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> y IgG<sub>4</sub>) e IgA (por ejemplo, IgA<sub>1</sub> y IgA<sub>2</sub>)

15 La capacidad de una molécula para unirse a Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog puede determinarse, por ejemplo, mediante la capacidad del supuesto ligando para modular la unión de Wnt al receptor de Frizzled, midiendo la acumulación intracelular de  $\beta$ -catenina, ensayo de Axin2 o ensayo de CyclinD1. La especificidad de unión puede determinarse comparando la unión en presencia o ausencia del supuesto ligando.

20 "Secuencias de control" o "secuencias reguladoras" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente unida en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, un sitio de unión al ribosoma y posiblemente otras secuencias aún escasamente entendidas. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

25 "Vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores pueden replicarse de manera autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped, y de ese modo se replican junto con el genoma del huésped. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, virus adenoasociados, adenovirus y retrovirus de replicación defectuosa), que sirven para funciones equivalentes.

40 Un "marcador" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen <sup>32</sup>P, colorantes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (por ejemplo, tal como se usan comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas para los que están disponibles antiseros o anticuerpos monoclonales (por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden hacerse detectables, por ejemplo, incorporando un radiomarcador en el péptido, y pueden usarse para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido).

45 "Clasificación" (sorting) en el contexto de células tal como se usa en el presente documento se refiere tanto a la clasificación física de las células, tal como puede lograrse usando, por ejemplo, un clasificador celular activado por fluorescencia, así como al análisis de células basándose en la expresión de marcadores de superficie celular, por ejemplo, análisis de FACS en ausencia de clasificación.

50 "Célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de manera intercambiable y todas las designaciones de este tipo incluyen la progenie. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados de la misma independientemente del número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en el contenido en ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la que se seleccionó en la célula originalmente transformada. Cuando se pretenden designaciones distintas, quedará claro a partir del contexto.

60 "Receptor" indica una proteína asociada a células, por ejemplo receptor de Frizzled, que se une a una molécula bioactiva denominada "ligando". Esta interacción media el efecto del ligando sobre la célula. Los receptores pueden estar unidos a la membrana, ser citosólicos o nucleares; monoméricos (por ejemplo, receptor de Frizzled, receptor de hormonas estimulantes del tiroides, receptor beta-adrenérgico) o multiméricos (por ejemplo, receptor de PDGF, receptor de hormona del crecimiento, receptor de IL-3, receptor de GM-CSF, receptor de G-CSF, receptor de eritropoyetina y receptor de IL-6). Los receptores unidos a la membrana, por ejemplo el receptor de Frizzled, se caracterizan por una estructura de múltiples dominios que comprende un dominio de unión a ligando extracelular y un dominio efector intracelular que normalmente está implicado en la transducción de señales. En determinados

receptores unidos a la membrana, el dominio de unión a ligando extracelular y el dominio efector intracelular están ubicados en polipéptidos separados que comprenden el receptor funcional completo.

En general, la unión del ligando al receptor da como resultado un cambio conformacional en el receptor que provoca una interacción entre el dominio efector y otra(s) molécula(s) en la célula, lo que a su vez conduce a una alteración en el metabolismo de la célula. Los acontecimientos metabólicos que a menudo están vinculados a interacciones receptor-ligando incluyen transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, aumentos en la producción de AMP cíclico, movilización de calcio celular, movilización de lípidos de la membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos.

“Tratamiento” o “tratar” se refiere a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o la mejora de una lesión, patología o estado, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como supresión; remisión; disminución de síntomas o hacer que la lesión, patología o estado sea más tolerable para el paciente; ralentización de la velocidad de degeneración o deterioro; hacer que el punto final de degeneración sea menos debilitante; o mejora del bienestar físico o mental de un sujeto. El tratamiento o mejora de los síntomas puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen físico. Por consiguiente, “tratamiento” o “tratar” incluye la administración de los compuestos o agentes de la presente invención para inhibir o potenciar una respuesta inmunitaria, o tratar una enfermedad inmunitaria, diabetes, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de inmunodeficiencia, tumor maligno hematopoyético, insuficiencia hematopoyética, trasplante de células madre/progenitoras hematopoyéticas o una enfermedad degenerativa muscular. También incluye la administración de los compuestos de la presente invención para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto frente a la infección con un patógeno. Por consiguiente, “tratamiento” o “tratar” incluye la administración de los compuestos o agentes de la presente invención para prevenir o retrasar, para aliviar, o para detener o inhibir el desarrollo de los síntomas o estados asociados con una enfermedad inmunitaria, diabetes, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de inmunodeficiencia, tumor maligno hematopoyético, insuficiencia hematopoyética, trasplante de células madre/progenitoras hematopoyéticas, una enfermedad degenerativa muscular u otros trastornos. “Efecto terapéutico” se refiere a la reducción, eliminación o prevención de la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o efectos secundarios de la enfermedad en el sujeto.

“Administración concomitante” de un fármaco conocido con un compuesto de la presente invención significa la administración del fármaco y el compuesto en un tiempo tal que tanto el fármaco conocido como el compuesto tendrán un efecto terapéutico o efecto diagnóstico. Tal administración concomitante puede implicar administración concurrente (es decir, al mismo tiempo), previa o posterior del fármaco con respecto a la administración de un compuesto de la presente invención. Un experto habitual en la técnica no tendría ninguna dificultad en determinar el momento, la secuencia y las dosificaciones de administración apropiados para fármacos y compuestos particulares de la presente invención.

“Sujeto”, “sujeto mamífero” o “paciente” se refiere a cualquier sujeto o paciente mamífero al que pueden administrarse las composiciones de la invención. “Mamífero” se refiere a pacientes humanos y primates no humanos, así como a animales experimentales tales como conejos, ratas y ratones, y otros animales. En una realización a modo de ejemplo de la presente invención, para identificar pacientes objeto para el tratamiento según los métodos de la invención, se emplean métodos de examen aceptados para determinar factores de riesgo asociados con una enfermedad o estado sospechoso o seleccionado como diana o para determinar la situación de un estado o enfermedad existente en un sujeto. Estos métodos de examen incluyen, por ejemplo, pruebas convencionales para determinar factores de riesgo que pueden estar asociados con la enfermedad o estado sospechoso o seleccionado como diana. Estos y otros métodos de rutina permiten al médico seleccionar pacientes que necesitan terapia usando los métodos y las formulaciones de la invención.

Por “fase sólida” quiere decirse una matriz no acuosa a la que puede adherirse un reactivo de interés (por ejemplo, Wnt,  $\beta$ -catenina o receptor de Frizzled, o un anticuerpo frente a los mismos). Los ejemplos de fases sólidas abarcadas en el presente documento incluyen las formadas parcial o totalmente por vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poli(acrilamidas, poliestireno, poli(alcohol vinílico) y siliconas. En determinadas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas diferenciadas, tal como las descritas en la patente estadounidense n.º 4.275.149.

“Se une específicamente (o selectivamente)” a un anticuerpo se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. Por tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína particular al menos dos veces el fondo y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra.

“Se une(n) específicamente” cuando se hace referencia a un péptido se refiere a una molécula peptídica que tiene afinidad de unión intermedia o alta, exclusiva o predominantemente, a una molécula diana. La expresión “se une específicamente a” se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de una proteína diana en

presencia de una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. Por tanto, en condiciones de ensayo designadas, los restos de unión especificados se unen preferentemente a una proteína diana particular y no se unen en una cantidad significativa a otros componentes presentes en una muestra de prueba. La unión específica de una proteína diana en tales condiciones puede requerir un resto de unión que se selecciona por su especificidad por un antígeno diana particular. Puede usarse una variedad de formatos de ensayo para seleccionar ligandos que son específicamente reactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan inmunoensayos ELISA en fase sólida, inmunoprecipitación, Biacore e inmunotransferencia de tipo Western para identificar péptidos que afectan específicamente a la señalización de Wnt, señalización de  $\beta$ -catenina o proteínas de receptor de Frizzled. Normalmente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal o ruido de fondo y más normalmente más de 10 veces el fondo. La unión específica entre un péptido monovalente y la señalización de Wnt, señalización de  $\beta$ -catenina o proteínas de receptor de Frizzled significa una afinidad de unión de al menos  $10^3 \text{ M}^{-1}$ , y preferiblemente  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  o  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ . La afinidad de unión de Wnt al receptor de Frizzled es de entre aproximadamente  $10^6 \text{ M}^{-1}$  y aproximadamente  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ .

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la administración *in vivo* de uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, por ejemplo, el inhibidor de GSK-3, aumenta la función de repoblación de HSC de ratón silvestre trasplantadas, y aumenta la capacidad de HSC de neonato y de adulto *in vivo*. En la presente invención, se ha investigado el papel de inhibidores de GSK-3 competitivos con ATP en la regulación de HSC humanas y de ratón. Los hallazgos demuestran que los inhibidores de GSK-3 aumentan la función de HSC *in vivo* y modulan dianas de Wnt, Hedgehog y Notch específicamente en HSC, proporcionando de ese modo un enfoque potente y único para potenciar directamente la función de HSC *in vivo*.

Esta invención se basa en técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que dan a conocer los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed., 1989; Kriegler, Gene Transfer y Expression: A Laboratory Manual, 1990; y Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols in Molecular Biology, 1994.

Pueden aislarse ácidos nucleicos, variantes polimórficas, ortólogos y alelos de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog que son sustancialmente idénticos a secuencias proporcionadas en el presente documento usando oligonucleótidos y sondas de ácido nucleico de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog en condiciones de hibridación rigurosas, examinando bibliotecas. Alternativamente, pueden usarse bibliotecas de expresión para clonar proteínas de receptor, variantes polimórficas, ortólogos y alelos de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog detectando homólogos expresados de manera inmunológica con antisueros o anticuerpos purificados generados contra Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog humanos o partes de los mismos.

Identificación de compuestos para el tratamiento y la profilaxis de enfermedades

(A) Identificación de agentes bioactivos

Identificando agentes bioactivos que modulan la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, la información se usa de una amplia variedad de maneras. En un método, puede usarse uno de varios ensayos celulares, por ejemplo, ensayo de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, junto con técnicas de selección de alto rendimiento, para permitir monitorizar para detectar antagonistas o agonistas de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog tras el tratamiento con un agente candidato, Zlokarnik, *et al.*, Science 279:84-8, 1998; y Heid *et al.*, Genome Res. 6:986, 1996;.

En un método, se añaden los agentes candidatos a células.

“Agente bioactivo candidato” o “candidato a fármaco” o equivalentes gramaticales tal como se usan en el presente documento describen cualquier molécula, por ejemplo, proteína, oligopéptido, molécula orgánica pequeña, polisacárido, polinucleótido, que van a someterse a prueba para detectar agentes bioactivos que pueden alterar directa o indirectamente la actividad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. En un método, los agentes bioactivos modulan la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. En una realización adicional del método, los agentes candidatos inducen un efecto antagonista o agonista en un ensayo de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, tal como se describe adicionalmente a continuación. Generalmente se ejecuta una pluralidad de mezclas de ensayo en paralelo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Normalmente, una de esas concentraciones sirve como control negativo, es decir, a una concentración nula o inferior al nivel de detección.

Los agentes candidatos abarcan diversas clases químicas, aunque normalmente son moléculas orgánicas, por ejemplo, compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 100 y menos de aproximadamente 2.500 Dalton. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la

interacción estructural con proteínas, particularmente formación de puentes de hidrógeno, y normalmente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, por ejemplo, al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos comprenden con frecuencia estructuras heterocíclicas o de carbono cíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. También se encuentran agentes candidatos entre biomoléculas incluyendo péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos. En una realización adicional, los agentes candidatos son péptidos.

Se obtienen agentes candidatos de una amplia variedad de fuentes incluyendo bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la síntesis al azar y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo expresión de oligonucleótidos modificados al azar. Alternativamente, están disponibles o se producen fácilmente bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, de plantas y de animales. Adicionalmente, se modifican fácilmente compuestos y bibliotecas naturales o producidas sintéticamente mediante medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales. Pueden someterse agentes farmacológicos conocidos a modificaciones químicas dirigidas o al azar, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación para producir análogos estructurales.

En algunas realizaciones, los agentes candidatos bioactivos son proteínas. Por "proteína" en el presente documento quiere decirse al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, lo que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. La proteína puede estar constituida por aminoácidos que se producen de manera natural y enlaces peptídicos, o estructuras peptidomiméticas sintéticas. Por tanto "aminoácido" o "residuo peptídico", tal como se usa en el presente documento, significa aminoácidos tanto que se producen de manera natural como sintéticos. Por ejemplo, homofenilalanina, citrulina y noreleucina se consideran aminoácidos para los fines de los métodos en el presente documento. "Aminoácido" también incluye residuos de aminoácido tales como prolina e hidroxiprolina. Las cadenas laterales pueden estar en la configuración o bien (R) o bien (S). En realizaciones adicionales, los aminoácidos están en la configuración (S) o (L). Si se usan cadenas laterales que no se producen de manera natural, pueden usarse sustituyentes distintos de aminoácido, por ejemplo para impedir o retrasar degradaciones *in vivo*.

En un método, los agentes candidatos bioactivos son proteínas que se producen de manera natural o fragmentos de proteínas que se producen de manera natural. Por tanto, por ejemplo, pueden usarse extractos celulares que contienen proteínas, o digestos al azar o dirigidos de extractos celulares proteínicos. De esta manera pueden prepararse bibliotecas de proteínas procariotas y eucariotas para la selección usando los métodos en el presente documento. Las bibliotecas pueden ser de proteínas bacterianas, fúngicas, virales y de mamífero, y proteínas humanas.

En algunos métodos, los agentes candidatos bioactivos son péptidos de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 30 aminoácidos, normalmente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 20 aminoácidos, y normalmente desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 15. Los péptidos pueden ser digestos de proteínas que se producen de manera natural tal como se expuso anteriormente, péptidos al azar, o péptidos al azar "sesgados". Por "modificado al azar" o equivalentes gramaticales en el presente documento quiere decirse que cada ácido nucleico y péptido consiste esencialmente en nucleótidos y aminoácidos al azar, respectivamente. Dado que generalmente estos péptidos al azar (o ácidos nucleicos, comentados a continuación) se sintetizan químicamente, pueden incorporar cualquier nucleótido o aminoácido en cualquier posición. El proceso sintético puede diseñarse para generar proteínas o ácidos nucleicos modificados al azar, para permitir la formación de todas o la mayoría de las combinaciones posibles a lo largo de la longitud de la secuencia, formando así una biblioteca de agentes proteínicos bioactivos candidatos modificados al azar.

En algunos métodos, la biblioteca puede modificarse al azar completamente, sin preferencias de secuencia ni constantes en ninguna posición. En otros métodos, la biblioteca puede estar sesgada. Algunas posiciones dentro de la secuencia o bien se mantienen constantes, o bien se seleccionan de un número limitado de posibilidades. Por ejemplo, en algunos métodos, los nucleótidos o residuos de aminoácido se modifican al azar dentro de una clase definida, por ejemplo, de aminoácidos hidrófobos, residuos hidrófilos, residuos sesgados estéricamente (o bien pequeños o bien grandes), hacia la creación de dominios de unión a ácido nucleico, la creación de cisteínas, para reticulación, prolinas para dominios SH-3, serinas, treoninas, tirosinas o histidinas para sitios de fosforilación, o hacia purinas. En otros métodos, los agentes candidatos bioactivos son ácidos nucleicos, tal como se definió anteriormente.

Tal como se definió anteriormente de manera general para proteínas, los agentes candidatos bioactivos de ácido nucleico pueden ser ácidos nucleicos que se producen de manera natural, ácidos nucleicos al azar o ácidos nucleicos al azar "sesgados". Por ejemplo, pueden usarse digestos de genomas procariotas o eucariotas tal como se expuso anteriormente para proteínas.

En algunos métodos, los agentes candidatos bioactivos son restos químicos orgánicos.

(B) Métodos de selección de fármacos

Pueden lograrse diversos métodos de selección de fármacos diferentes para identificar fármacos o agentes bioactivos que actúan como agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog. Un método de este tipo es la selección de agentes candidatos que pueden actuar como agonistas de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, generando así el fenotipo asociado. De manera similar, se espera que agentes candidatos que pueden actuar como agonista frente a la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, tal como se muestra en el presente documento, den como resultado el fenotipo inmunoestimulante, tras la exposición con un patógeno. Por tanto, en algunos métodos, puede determinarse que los agentes candidatos imitan o alteran la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog.

En otros métodos, puede realizarse la selección para alterar la función biológica de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. De nuevo, habiendo identificado la importancia de una unión de Wnt al receptor Frizzled, o la acumulación intracelular de  $\beta$ -catenina, puede realizarse la exploración para seleccionar agentes que se unen y/o modulan la actividad biológica de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog tal como se expone a continuación.

Por tanto, puede lograrse la selección de agentes candidatos que modulan la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog o bien a nivel de expresión génica o bien a nivel de proteína.

En algunos métodos, puede administrarse un agente candidato en uno cualquiera de varios ensayos celulares, por ejemplo, ensayo de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. Mediante "administración" o "poner en contacto" en el presente documento quiere decirse que el agente candidato se añade a las células de tal manera que se permite que el agente actúe sobre la célula, o bien mediante captación y acción intracelular, o bien mediante acción en la superficie celular. En algunas realizaciones, puede ponerse ácido nucleico que codifica para un agente candidato proteínico (es decir, un péptido) en un constructo viral tal como un constructo retroviral y añadirse a la célula, de tal manera que se logra la expresión del agente peptídico; véase el documento PCT US97/01019.

Una vez que se ha administrado el agente candidato a las células, pueden lavarse las células si se desea y se permite que se incuben en condiciones fisiológicas durante algún periodo de tiempo. Entonces se recogen las células y se genera un nuevo perfil de expresión génica, tal como se expone en el presente documento.

Por ejemplo, pueden examinarse agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog para seleccionar agentes que producen un fenotipo inmunoestimulante. Un cambio en un ensayo de unión o ensayo celular indica que el agente tiene un efecto sobre la actividad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. En un método, se induce o se mantiene un perfil inmunosupresor o inmunoestimulante, antes, durante y/o después de la estimulación con ligando. Definiendo una firma de este tipo para inhibir o potenciar una respuesta inmunitaria, o tratar una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad neoplásica, lupus eritematoso sistémico, o rechazo de tejido alogénico, pueden idearse exámenes para seleccionar nuevos fármacos que imitan un fenotipo inmunosupresor o inmunoestimulante. Con este enfoque, no se necesita conocer la diana farmacológica y no se necesita que esté representada en la plataforma de selección de expresión original, tampoco se necesita cambiar el nivel de transcritos para la proteína diana. En algunos métodos, el agente actúa como agonista o antagonista en uno de varios ensayos celulares o de unión, por ejemplo, ensayo de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog.

En algunos métodos, pueden realizarse exámenes en productos génicos y genes individuales. Tras haber identificado que un ensayo celular o de unión es indicativo de inhibición o potenciación de una respuesta inmunitaria, o tratamiento de enfermedad autoinmunitaria, enfermedad neoplásica, lupus eritematoso sistémico, o rechazo de tejido alogénico, puede completarse la selección de moduladores de ensayo celular o de unión.

Por tanto, en algunos métodos, pueden completarse exámenes para seleccionar moduladores de ensayo celular o de unión. Esto se realizará tal como se expuso anteriormente, pero en general se evalúan algunos ensayos celulares o de unión. En algunos métodos, se diseñan exámenes para encontrar en primer lugar agentes candidatos que pueden afectar a un ensayo de actividad celular o de unión, y después pueden usarse esos agentes en otros ensayos que evalúan la capacidad del agente candidato para modular la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog.

En general, puede usarse un producto génico purificado o aislado para ensayos de unión; es decir, se preparan los productos génicos de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. Usando los ácidos nucleicos de los métodos y las composiciones en el presente documento que codifican para polipéptidos de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, o compuestos de señalización de Wnt o  $\beta$ -catenina, puede prepararse una variedad de vectores de expresión. Los vectores de expresión pueden ser o bien vectores extracromosómicos auto-replicantes o bien vectores que se integran en un genoma huésped. Generalmente, estos vectores de expresión incluyen ácido nucleico regulador transcripcional y traduccional unido operativamente al ácido nucleico que codifica

para una proteína de  $\beta$ -catenina o señalización de Wnt. "Secuencias control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente unida en un organismo huésped particular. Las secuencias control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas usan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

Un ácido nucleico está "operativamente unido" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para un líder de secreción o presecuencia está operativamente unido a ADN para un polipéptido si se expresa como preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está colocado de manera que facilita la traducción. Generalmente, "operativamente unido" significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas, y, en el caso de un líder de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no necesitan ser contiguos. La unión se logra mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, se usan los ligadores o adaptadores oligonucleotídicos sintéticos según la práctica convencional. El ácido nucleico regulador transcripcional y traduccional será generalmente apropiado para la célula huésped usada para expresar una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog; por ejemplo, se usan secuencias de ácido nucleico reguladoras transcripcionales y traduccionales de *Bacillus* para expresar la proteína en *Bacillus*. En la técnica se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados, y secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células huésped.

En general, las secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias de promotor, sitios de unión al ribosoma, secuencias de inicio y de terminación de la transcripción, secuencias de inicio y de terminación de la traducción, y secuencias de potenciador o activador. En un método, las secuencias reguladoras incluyen un promotor y secuencias de inicio y de terminación de la transcripción.

Las secuencias de promotor codifican para promotores o bien constitutivos o bien inducibles. Los promotores pueden ser o bien promotores que se producen de manera natural o bien promotores híbridos. Los promotores híbridos, que combinan elementos de más de un promotor, también se conocen en la técnica, y son útiles en los métodos en el presente documento.

Además, el vector de expresión puede comprender elementos adicionales. Por ejemplo, el vector de expresión puede tener dos sistemas de replicación, permitiendo así que se mantenga en dos organismos, por ejemplo en células de mamífero o de insecto para la expresión y en un huésped procarionte para la clonación y amplificación. Además, para vectores de expresión de integración, el vector de expresión contiene al menos una secuencia homóloga al genoma de la célula huésped, y normalmente dos secuencias homólogas que flanquean al constructo de expresión. El vector de integración puede dirigirse a un locus específico en la célula huésped seleccionando la secuencia homóloga apropiada para su inclusión en el vector. En la técnica se conocen bien constructos para vectores de integración. Se describen métodos para realizar la recombinación homóloga en los documentos PCT US93/03868 y PCT US98/05223.

En algunos métodos, el vector de expresión contiene un gen de marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. En la técnica se conocen bien genes de selección y variarán con la célula huésped usada.

Un sistema de vector de expresión es un sistema de vector retroviral tal como se describe de manera general en los documentos PCT/US97/01019 y PCT/US97/01048.

Las proteínas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog de los presentes métodos y composiciones se producen cultivando una célula huésped transformada con un vector de expresión que contiene ácido nucleico que codifica para un polipéptido que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, en las condiciones apropiadas para inducir o provocar la expresión de la proteína. Las condiciones apropiadas para la expresión del polipéptido que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog variarán con la elección del vector de expresión y la célula huésped, y se determinarán fácilmente por un experto en la técnica mediante experimentación de rutina. Por ejemplo, el uso de promotores constitutivos en el vector de expresión requerirá optimizar el crecimiento y la proliferación de la célula huésped, mientras que el uso de un promotor inducible requiere las condiciones de crecimiento apropiadas para la inducción. En algunos métodos, el momento de la recogida es importante. Por ejemplo, los sistemas baculovirales usados en la expresión en células de insecto son virus líticos, y por tanto la selección del momento de recogida puede ser crucial para el rendimiento del producto.

Las células huésped apropiadas incluyen levadura, bacterias, arqueobacterias, hongos, y células de insectos y de animales, incluyendo células de mamífero. Son de interés particular las células *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, células SF9, células C129, células 293, *Neurospora*, BHK, CHO, COS y células HeLa. En algunos métodos, células madre/progenitoras hematopoyéticas o

células progenitoras neurales, células progenitoras musculares son células huésped tal como se proporciona en el presente documento, que por ejemplo, incluyen líneas celulares no recombinantes, tales como líneas celulares primarias. Además, también pueden usarse células madre hematopoyéticas o células progenitoras neurales primarias purificadas, células progenitoras musculares para ensayo de TNF derivadas de cepas o bien transgénicas o bien no transgénicas. La célula huésped puede ser alternativamente un tipo de célula que se sabe que tiene un trastorno de inmunodeficiencia.

En un método, las proteínas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog se expresan en células de mamífero. Los sistemas de expresión en mamíferos pueden incluir sistemas retrovirales. Un promotor de mamífero es cualquier secuencia de ADN que puede unirse a ARN polimerasa de mamífero e iniciar la transcripción en el sentido 3' de una secuencia codificante para la proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog para dar ARNm. Un promotor tendrá una región de iniciación de la transcripción, que está situada habitualmente proximal al extremo 5' de la secuencia codificante, y una caja TATA, habitualmente situada 25-30 pares de bases en el sentido 5' del sitio de iniciación de la transcripción. Se piensa que la caja TATA dirige la ARN polimerasa II para comenzar la síntesis de ARN en el sitio correcto. Un promotor de mamífero también contendrá un elemento promotor en el sentido 5' (elemento potenciador), normalmente situado dentro de 100 a 200 pares de bases en el sentido 5' de la caja TATA. Un elemento promotor en el sentido 5' determina la velocidad a la que se inicia la transcripción y puede actuar en cualquier orientación. Son de uso particular como promotores de mamífero los promotores de genes virales de mamífero, ya que los genes virales con frecuencia se expresan altamente y tienen una amplia gama de huéspedes. Los ejemplos incluyen el promotor temprano de SV40, promotor de LTR de virus de tumor de mama de ratón, promotor tardío principal de adenovirus, promotor del virus del herpes simple y el promotor de CMV.

Normalmente, las secuencias de terminación de la transcripción y de poliadenilación reconocidas por células de mamífero son regiones reguladoras situadas en el sentido 3' con respecto al codón de terminación de la traducción y por tanto, junto con los elementos promotores, flanquean a la secuencia codificante. El extremo terminal en 3' del ARNm maduro se forma mediante poliadenilación y escisión postraduccional específica de sitio. Los ejemplos de señales de poliadenilación y terminación de la transcripción incluyen las derivadas de SV40.

Los métodos de introducción de ácido nucleico en huéspedes mamíferos, así como otros huéspedes, se conocen bien en la técnica, y variarán con la célula huésped usada. Las técnicas incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, infección viral, encapsulación del/de los polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa del ADN en núcleos.

En algunos métodos, se expresan proteínas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog en sistemas bacterianos que se conocen bien en la técnica.

En otros métodos, pueden producirse proteínas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog en células de insecto. En la técnica se conocen bien los vectores de expresión para la transformación de células de insecto, y en particular, vectores de expresión basados en baculovirus.

En algunos métodos, se producen proteínas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog en células de levadura. En la técnica se conocen bien los sistemas de expresión de levadura, e incluyen vectores de expresión para *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* y *C. maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis* y *K. lactis*, *Pichia guilliermondii* y *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*.

También puede prepararse una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog como una proteína de fusión, usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, para la creación de anticuerpos monoclonales, si el epítipo deseado es pequeño, la proteína puede fusionarse a una proteína portadora para formar un inmunógeno. Alternativamente, puede prepararse una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog como una proteína de fusión para aumentar la expresión. Por ejemplo, cuando una proteína es un péptido más corto, el ácido nucleico que codifica para el péptido puede unirse a otro ácido nucleico para fines de expresión. De manera similar, pueden unirse proteínas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog de los métodos y composiciones en el presente documento a marcadores proteínicos, tales como proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), proteína amarilla fluorescente (YFP) y proteína azul fluorescente (BFP).

En una realización, las proteínas son recombinantes. Una "proteína recombinante" es una proteína preparada usando técnicas recombinantes, es decir, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante tal como se describió anteriormente. Una proteína recombinante se distingue de una proteína que se produce de manera natural en al menos una o más características. Por ejemplo, la proteína puede aislarse o purificarse separada de algunas o todas las proteínas y los compuestos con los que está normalmente asociada en su huésped silvestre, y por tanto puede ser sustancialmente pura. Por ejemplo, una proteína aislada no está acompañada por al menos parte del material con el que está normalmente asociada en su estado natural, que constituye normalmente al menos

aproximadamente el 0,5%, normalmente al menos aproximadamente el 5% en peso de la proteína total en una muestra dada. Una proteína sustancialmente pura comprende al menos aproximadamente el 75% en peso de la proteína total, al menos aproximadamente el 80% y normalmente al menos aproximadamente el 90%. La definición incluye la producción de proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog a partir de un organismo en una célula huésped u organismo diferente. Alternativamente, la proteína puede prepararse a una concentración significativamente superior a la que se observa normalmente, mediante el uso de un promotor inducible o promotor de alta expresión, de tal manera que la proteína se prepara a niveles de concentración aumentados. Alternativamente, la proteína puede estar en una forma que no se encuentra normalmente en la naturaleza, como en la adición de una etiqueta de epítipo o sustituciones, inserciones y deleciones de aminoácidos, tal como se comenta a continuación.

En algunos métodos, cuando la proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog va a usarse para generar anticuerpos, la proteína debe compartir al menos un epítipo o determinante con el producto de transcripción de longitud completa de los ácidos nucleicos. Por "epítipo" o "determinante" en el presente documento quiere decirse una parte de una proteína que se unirá a un anticuerpo. Por tanto, en la mayoría de los casos, anticuerpos preparados frente a una proteína más pequeña deben poder unirse a la proteína de longitud completa. En una realización, el epítipo es único; es decir, anticuerpos generados frente a un epítipo único muestran poca o ninguna reactividad cruzada.

En algunos métodos, los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden ser capaces de reducir o eliminar la función biológica de una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, tal como se describe a continuación. La adición de anticuerpos (o bien policlonales o bien monoclonales) a la proteína (o células que contienen la proteína) puede reducir o eliminar la actividad de la proteína. Generalmente, se observa una disminución de la actividad de al menos el 25%, normalmente de al menos aproximadamente el 50% y observándose normalmente una disminución de aproximadamente el 95-100%.

Además, las proteínas pueden ser proteínas variantes, que comprenden una sustitución, inserción y deleción de aminoácido más.

En un método, se purifica o se aísla una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog tras la expresión. Las proteínas pueden aislarse o purificarse de una variedad de maneras. Los métodos de purificación convencionales incluyen técnicas electroforéticas, moleculares, inmunológicas y cromatográficas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, hidrófoba, de afinidad y HPLC en fase inversa, y cromatoenfoco. Por ejemplo, puede purificarse una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog usando una columna convencional de anticuerpo anti-proteína de Wnt, anti-proteína de  $\beta$ -catenina, anti-proteína de Notch o anti-proteína de Hedgehog. También son útiles técnicas de ultrafiltración y diafiltración, junto con concentración de proteína. Para directrices generales sobre técnicas de purificación adecuadas, véase Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, NY, 1982. El grado de purificación necesario variará dependiendo del uso de la proteína. En algunos casos, no se necesitará ninguna purificación.

Una vez preparado el producto génico del gen que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, pueden realizarse ensayos de unión. Estos métodos comprenden combinar una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog y un agente bioactivo candidato, y determinar la unión del agente candidato a la proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog. Los métodos usan una proteína humana que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, aunque también pueden usarse proteínas de otros mamíferos, incluyendo roedores (ratones, ratas, hámsters, cobayas), animales de granja (vacas, ovejas, cerdos, caballos) y primates. Estos últimos métodos pueden usarse para el desarrollo de modelos de animales de enfermedades humanas. En algunos métodos, pueden usarse proteínas variantes o derivadas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, incluyendo proteínas de deleción que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog tal como se expuso anteriormente.

Los ensayos en el presente documento usan proteínas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog tal como se define en el presente documento. En algunos ensayos, pueden usarse partes de proteínas. En otros ensayos, pueden usarse partes que tienen actividades diferentes. Además, los ensayos descritos en el presente documento pueden usar o bien proteínas aisladas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog o bien células que comprenden las proteínas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog. En algunos métodos, la proteína o el agente candidato está unido de manera no difundible a un soporte insoluble que tiene zonas de recepción de muestra aisladas (por ejemplo, una placa de microtitulación o un alineamiento). Los soportes insolubles pueden fabricarse de cualquier composición a la que pueden unirse las composiciones, se separa fácilmente de material soluble, y es por lo demás compatible con el método global de selección. La superficie de tales soportes puede ser sólida o porosa y de cualquier forma conveniente. Los ejemplos de soportes insolubles adecuados incluyen placas de microtitulación, alineamientos, membranas y perlas. Estos se fabrican normalmente de vidrio, plástico (por ejemplo, poliestireno), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa y Teflon™. Los alineamientos y las placas de microtitulación son especialmente convenientes

porque pueden llevarse a cabo un gran número de ensayos simultáneamente, usando pequeñas cantidades de reactivos y muestras. En algunos casos se incluyen perlas magnéticas y similares. La manera particular de unión de la composición no es crucial siempre que sea compatible con los reactivos y métodos globales descritos en el presente documento, mantenga la actividad de la composición y no sea difundible. Los métodos de unión incluyen el uso de anticuerpos (que no bloquean estéricamente o bien el sitio de unión a ligando o bien la secuencia de activación cuando la proteína se une al soporte), unión directa a soportes iónicos, reticulación química o mediante la síntesis de la proteína o el agente sobre la superficie. Tras la unión de la proteína o el agente, se elimina el material no unido en exceso mediante lavado. Entonces pueden bloquearse las zonas de recepción de muestra mediante incubación con albúmina sérica bovina (BSA), caseína u otra proteína inocua u otro resto. También se incluyen en los métodos y las composiciones en el presente documento ensayos de selección en los que no se usan soportes sólidos.

En otros métodos, se une la proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog al soporte, y se añade un agente bioactivo candidato al ensayo. Alternativamente, se une el agente candidato al soporte y se añade la proteína. Los agentes de unión novedosos incluyen anticuerpos específicos, agentes de unión no naturales identificados en exámenes de bibliotecas químicas, y análogos peptídicos. Son de interés particular ensayos de selección para determinar agentes que tienen una baja toxicidad para células humanas. Puede usarse una amplia variedad de ensayos para este fin, incluyendo ensayos de unión de proteína-proteína *in vitro* marcados, ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética, inmunoensayos para determinar la unión a proteína, ensayos funcionales (tales como ensayos de fosforilación) y similares.

La determinación de la unión del agente bioactivo candidato a una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog puede realizarse de varias maneras. En algunos métodos, se marca el agente bioactivo candidato, y se determina la unión directamente. Por ejemplo, esto puede realizarse fijando la totalidad o una parte de una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog a un soporte sólido, añadiendo un agente candidato marcado (por ejemplo un marcador fluorescente), eliminando mediante lavado el reactivo en exceso y determinando si el marcador está presente en el soporte sólido. Pueden usarse diversas etapas de bloqueo y lavado.

Mediante "marcado" en el presente documento quiere decirse que el compuesto está marcado o bien directa o bien indirectamente con un marcador que proporciona una señal detectable, por ejemplo, radioisótopo, agentes que fluorescen, enzima, anticuerpos, partículas tales como partículas magnéticas, agentes quimioluminiscentes o moléculas de unión específica. Las moléculas de unión específica incluyen pares, tales como biotina y estreptavidina, digoxina y antidigoxina. Para los elementos de unión específica, el elemento complementario estará normalmente marcado con una molécula que proporciona la detección, según procedimientos conocidos, tal como se expuso anteriormente. El marcador puede proporcionar directa o indirectamente una señal detectable.

En algunos métodos, sólo se marca uno de los componentes. Por ejemplo, las proteínas (o agentes candidatos proteínicos) pueden marcarse en posiciones de tirosina usando  $^{125}\text{I}$ , o con fluoróforos. Alternativamente, puede marcarse más de un componente con diferentes marcadores; usando  $^{125}\text{I}$  para las proteínas, por ejemplo, y un fluoróforo para los agentes candidatos.

En otros métodos, la unión del agente bioactivo candidato se determina mediante el uso de ensayos de unión competitiva. En este método, el competidor es un resto de unión que se sabe que se une a la molécula diana tal como un anticuerpo, péptido, pareja de unión o ligando. En determinadas circunstancias, puede haber unión competitiva entre el agente bioactivo y el resto de unión, desplazando el resto de unión al agente bioactivo. Este ensayo puede usarse para determinar agentes candidatos que interfieren con la unión entre proteínas y el competidor.

En algunos métodos, el agente bioactivo candidato está marcado. En primer lugar se añade o bien el agente bioactivo candidato, o bien el competidor, o bien ambos, a la proteína durante un tiempo suficiente para permitir la unión, si está presente. Pueden realizarse incubaciones a cualquier temperatura que facilite la actividad óptima, normalmente de entre aproximadamente 4°C y 40°C. Se seleccionan periodos de incubación para una actividad óptima, pero también pueden optimizarse para facilitar una selección de alto rendimiento rápida. Normalmente entre 0,1 y 1 hora será suficiente. Generalmente se elimina o se lava el reactivo en exceso. Entonces se añade el segundo componente, y se realiza el seguimiento de la presencia o ausencia del componente marcado, para indicar la unión.

En otros métodos, en primer lugar se añade el competidor, seguido por el agente bioactivo candidato. El desplazamiento del competidor es una indicación de que el agente bioactivo candidato está uniéndose a la proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog y por tanto puede unirse a, y potencialmente modular, la actividad de la proteína. En este método, cualquier componente puede estar marcado. Por ejemplo, si el competidor está marcado, la presencia de marcador en la disolución de lavado indica el desplazamiento por el agente. Alternativamente, si el agente bioactivo candidato está marcado, la presencia del marcador en el soporte indica el desplazamiento.

En otros métodos, en primer lugar se añade el agente bioactivo candidato, con incubación y lavado, seguido por el

competidor. La ausencia de unión por parte del competidor puede indicar que el agente bioactivo está unido a la proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog con una afinidad superior. Por tanto, si el agente bioactivo candidato está marcado, la presencia del marcador en el soporte, junto con una falta de unión de competidor, puede indicar que el agente candidato puede unirse a la proteína.

5 También pueden ejecutarse métodos de unión competitiva como selecciones diferenciales. Estos métodos pueden comprender una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog y un competidor en una primera muestra. Una segunda muestra comprende un agente bioactivo candidato, una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog y un competidor. Se determina la  
10 unión del competidor para ambas muestras, y un cambio, o diferencia, en la unión entre las dos muestras indica la presencia de un agente que puede unirse a la proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog y potencialmente modular su actividad. Si la unión del competidor es diferente en la segunda muestra con respecto a la primera muestra, el agente puede unirse a la proteína.

15 Otros métodos usan la selección diferencial para identificar candidatos a fármaco que se unen a la proteína nativa que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, pero no pueden unirse a proteínas modificadas. Puede modelarse la estructura de la proteína, y usarse en el diseño razonado de fármacos para sintetizar agentes que interaccionan con ese sitio. También se identifican candidatos a fármaco que afectan a la bioactividad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog mediante  
20 examen de fármacos para seleccionar la capacidad o bien para potenciar o bien para reducir la actividad de la proteína.

En algunos métodos, se realiza el examen para seleccionar agentes que modulan la actividad de proteínas. En general, esto se realizará basándose en la actividad biológica conocida de la proteína que promueve la señal de  
25 Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog. En estos métodos, se añade un agente bioactivo candidato a una muestra de la proteína, tal como anteriormente, y se determina una alteración en la actividad biológica de la proteína. "Modular la actividad" incluye un aumento de actividad, una disminución de actividad, o un cambio en el tipo o la clase de actividad presente. Por tanto, en estos métodos, el agente candidato debe tanto unirse a un polipéptido que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog (aunque esto puede no  
30 ser necesario), como alterar su actividad biológica o bioquímica tal como se define en el presente documento. Los métodos incluyen tanto métodos de selección *in vitro*, tal como se expusieron de manera general anteriormente, como examen *in vivo* de células para seleccionar alteraciones en la presencia, distribución, actividad o cantidad de la proteína.

35 Algunos métodos comprenden combinar una muestra de polipéptido que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog y un agente bioactivo candidato, después evaluar el efecto sobre la actividad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog para inhibir o potenciar una respuesta inmunitaria. Mediante "actividad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog" o equivalentes gramaticales en el presente documento quiere decirse una de actividades biológicas  
40 de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, incluyendo, pero sin limitarse a, su capacidad para afectar a una activación o inhibición inmunitaria. Una actividad en el presente documento es la capacidad de unirse a un gen diana, o modular la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, por ejemplo, en la que se induce o se mantiene la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog.

45 En otros métodos, se aumenta la actividad de la proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog; en otros métodos, se disminuye la actividad de la proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog. Por tanto, agentes bioactivos que son antagonistas son útiles en algunos métodos, y agentes bioactivos que son agonistas son útiles en otros métodos.

50 Se proporcionan métodos de examen para seleccionar agentes bioactivos que pueden modular la actividad de una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog. Estos métodos comprenden añadir un agente bioactivo candidato, tal como se definió anteriormente, a una célula que comprende proteínas. Los tipos de célula incluyen casi cualquier célula. Las células contienen un ácido nucleico recombinante  
55 que codifica para una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog. En un método, se somete a prueba una biblioteca de agentes candidatos en una pluralidad de células. Entonces se evalúa el efecto del agente candidato sobre la actividad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog.

60 Pueden usarse controles positivos y controles negativos en los ensayos. Todas las muestras de control y de prueba se realizan al menos por triplicado para obtener resultados estadísticamente significativos. La incubación de todas las muestras es durante un tiempo suficiente para la unión del agente a la proteína. Tras la incubación, todas las muestras se lavan para quedar libres de material no unido de manera específica y se determina la cantidad de agente unido, generalmente marcado. Por ejemplo, cuando se emplea un radiomarcador, pueden contarse las  
65 muestras en un contador de centelleo para determinar la cantidad de compuesto unido.

Puede incluirse una variedad de otros reactivos en los ensayos de selección. Estos incluyen reactivos tales como sales, proteínas neutras (por ejemplo, albúmina y detergentes) que pueden usarse para facilitar una unión proteína-proteína óptima y/o reducir interacciones no específicas o de fondo. También pueden usarse reactivos que mejoran de otro modo la eficacia del ensayo (tales como inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa, agentes antimicrobianos). La mezcla de componentes puede añadirse en cualquier orden que proporciona la unión requerida.

Los componentes proporcionados en el presente documento para los ensayos proporcionados en el presente documento también pueden combinarse para formar kits. Los kits pueden basarse en el uso de la proteína y/o el ácido nucleico que codifica para las proteínas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog. A continuación se describen adicionalmente ensayos referentes al uso de ácidos nucleicos.

#### (C) Modelos de animales

En un método, también pueden usarse ácidos nucleicos que codifican para proteínas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog o sus formas modificadas para generar animales transgénicos, incluyendo animales con inserción génica y deficientes que, a su vez, son útiles en el desarrollo y la selección de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico no humano (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, transgén que se introduce en el animal o un ancestro del animal en una fase prenatal, por ejemplo, embrionaria. Un transgén es un ADN que se integra en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico, y puede incluir tanto la adición de la totalidad o parte de un gen como la delección de la totalidad o parte de un gen. En algunos métodos, puede usarse ADNc que codifica para una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog para clonar ADN genómico que codifica para una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog según técnicas establecidas y usarse las secuencias genómicas para generar animales transgénicos que contienen células que o bien expresan (o sobreexpresan) o bien suprimen el ADN deseado. Los métodos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han vuelto convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 4.736.866 y 4.870.009,. Normalmente, se seleccionarán células particulares como diana para la incorporación de un transgén de proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog con potenciadores específicos del tejido. Pueden usarse animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica para una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog introducida en la línea germinal del animal en una fase embrionaria para examinar el efecto de la expresión aumentada del ácido nucleico deseado. Tales animales pueden usarse como animales de prueba para reactivos que se piensa que confieren protección frente a, por ejemplo, estados patológicos asociados con su sobreexpresión. Según esta faceta, se trata un animal con el reactivo y una incidencia reducida del estado patológico, en comparación con animales no tratados que llevan el transgén, indicará una posible intervención terapéutica para el estado patológico. De manera similar, pueden usarse homólogos no humanos de una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog para construir un animal transgénico que comprende un animal deficiente para la proteína que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica para una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog como resultado de recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica para una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog y ADN genómico alterado que codifica para la proteína introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, puede usarse ADNc que codifica para una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog para clonar ADN genómico que codifica para la proteína según técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica para una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog puede delecionarse o sustituirse por otro gen, tal como un gen que codifica para un marcador seleccionable que puede usarse para monitorizar la integración. Normalmente, se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante no alterado (en los extremos tanto 5' como 3') en el vector (véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell 51:503, 1987 para una descripción de vectores de recombinación homóloga). El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan células en las que el ADN introducido se ha recombinado de manera homóloga con el ADN endógeno (véase, por ejemplo, Li *et al.*, Cell 69: 915, 1992). Entonces se inyectan las células seleccionadas en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación (véase, por ejemplo, Bradley, en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), págs. 113-152). Entonces puede implantarse un embrión quimérico en un animal hembra sustituto pseudoembarazado adecuado y se lleva el embrión a término para crear un animal deficiente. Puede identificarse la progenie que alberga el ADN recombinado de manera homóloga en sus células germinales mediante técnicas convencionales y usarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de manera homóloga. Pueden caracterizarse animales deficientes, por ejemplo, por su capacidad para defenderse frente a determinados estados patológicos y por su desarrollo de estados patológicos debido a la ausencia de un polipéptido que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog.

Los modelos de animales para trastornos relacionados con la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, o que tienen un estado particular de actividad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina,

señalización de Notch o señalización de Hedgehog pueden incluir, por ejemplo, modelos genéticos. Por ejemplo, tales modelos de animales para enfermedad inmunitaria pueden incluir ratón GFP/FVB, (Tsirigotis *et al.*, Biotechniques 31:120-126, 128, 130, 2001); ratón C57BL/6, ratón Tg(Fos-lacZ)<sup>34Efu</sup> (TOP-gal), (DasGupta y Fuchs, Development 126:4557-4568, 1999); ratón Ptc-1<sup>+/-lacZ</sup> (Goodrich *et al.*, Science 277:1109-1113, 1997); y ratón NOD/LtSz-scid/scid (NOD/SCID)..

Otros modelos pueden incluir estudios que suponen rechazo de trasplante.

Pueden diseñarse por ingeniería modelos de animales que muestran síntomas de tipo trastorno relacionado con la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog usando, por ejemplo, secuencias de polipéptido que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog junto con técnicas para producir animales transgénicos que conocen bien los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden introducirse secuencias génicas, y sobreexpresarse, en el genoma del animal de interés, o, si están presentes secuencias génicas diana endógenas, pueden o bien sobreexpresarse o bien, alternativamente, pueden alterarse con el fin de infraexpresar o inactivar la expresión del gen diana.

Con el fin de sobreexpresar una secuencia génica diana, puede ligarse la parte codificante de la secuencia génica diana con una secuencia reguladora que puede accionar la expresión génica en el animal y el tipo de célula de interés. Tales regiones reguladoras las conocerán bien los expertos en la técnica, y pueden usarse en ausencia de experimentación excesiva.

Para la infraexpresión de una secuencia génica diana endógena, puede aislarse una secuencia de este tipo y modificarse por ingeniería de tal manera que cuando vuelve a introducirse en el genoma del animal de interés, se inactivarán los alelos del gen diana endógeno. La secuencia génica diana modificada por ingeniería se introduce mediante direccionamiento génico de tal manera que la secuencia diana endógena se altera tras la integración de la secuencia diana modificada por ingeniería en el genoma del animal.

Pueden usarse animales de cualquier especie, incluyendo, pero sin limitarse a, ratones, ratas, conejos, cobayas, cerdos, microcerdos, cabras y primates no humanos, por ejemplo, babuinos, monos y chimpancés, para generar modelos de animales de trastornos relacionados con la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog o que están en un estado perpetuamente deseado de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog.

(D) Agentes terapéuticos a base de ácido nucleico

También pueden usarse ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos, antagonistas o agonistas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog en terapia génica. De manera general, un vector de terapia génica es un polinucleótido exógeno que produce un efecto fenotípico médicamente útil en la(s) célula(s) de mamífero en la(s) que se transfiere. Un vector puede tener un origen de replicación o no. Por ejemplo, es útil incluir un origen de replicación en un vector para la propagación del vector antes de la administración a un paciente. Sin embargo, el origen de replicación puede eliminarse con frecuencia antes de la administración si el vector está diseñado para integrarse en ADN cromosómico del huésped o unirse a ADN o ARNm del huésped. Los vectores usados en la terapia génica pueden ser virales o no virales. Los vectores virales se introducen habitualmente en un paciente como componentes de un virus. Los vectores no virales, normalmente ADNbc, pueden transferirse como ADN desnudo o asociados con un vehículo potenciador de la transferencia, tal como una proteína de reconocimiento de receptor, lipoamina o lípido catiónico.

Los vectores virales, tales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y virus del herpes, con frecuencia están constituidos por dos componentes, un genoma viral modificado y una estructura de cubierta que lo rodea (véase de manera general Smith *et al.*, Ann. Rev. Microbiol. 49:807-838, 1995), aunque algunas veces se introducen vectores virales en forma desnuda o recubiertos con proteínas distintas de proteínas virales. La mayoría de los vectores actuales tienen estructuras de cubierta similares a un virus silvestre. Esta estructura empaqueta y protege al ácido nucleico viral y proporciona los medios para unirse y entrar en células diana. Sin embargo, el ácido nucleico viral en un vector diseñado para terapia génica cambia de muchas maneras. Los objetivos de estos cambios son desactivar el crecimiento del virus en células diana al tiempo que se mantiene su capacidad para crecer en forma de vector en células auxiliares o de empaquetamiento disponibles, para proporcionar espacio dentro del genoma viral para la inserción de secuencias de ADN exógenas, y para incorporar nuevas secuencias que codifican para el, y permiten la expresión apropiada del, gen de interés. Por tanto, los ácidos nucleicos de vector comprenden generalmente dos componentes: secuencias virales que actúan en cis esenciales para la replicación y el empaquetamiento en una línea auxiliar y la unidad de transcripción para el gen exógeno. Otras funciones virales se expresan en trans en una línea celular auxiliar o de empaquetamiento específica.

Los vectores de ácido nucleico no virales usados en terapia génica incluyen plásmidos, ARN, oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, metilfosfonato o fosforotiolato), ácidos nucleicos de poliamida, ARN de interferencia (iARN), ARN en horquilla y cromosomas artificiales de levadura (YAC). Tales vectores incluyen normalmente un casete de

expresión para expresar una proteína o ARN. El promotor en un casete de expresión de este tipo puede ser constitutivo, específico del tipo de célula, específico de la fase y/o modulable (por ejemplo, mediante hormonas tales como glucocorticoides; promotor de MMTV). La transcripción puede aumentarse insertando una secuencia de potenciador en el vector. Los potenciadores son secuencias que actúan en cis de entre 10 y 300 pb que aumentan la transcripción por un promotor. Los potenciadores pueden aumentar eficazmente la transcripción cuando están o bien en 5' o bien en 3' con respecto a la unidad de transcripción. También son eficaces si se sitúan dentro de un intrón o dentro de la propia secuencia codificante. Normalmente, se usan potenciadores virales, incluyendo potenciadores de SV40, potenciadores de citomegalovirus, potenciadores de poliovirus y potenciadores de adenovirus. También se usan comúnmente secuencias de potenciador de sistemas de mamífero, tales como el potenciador de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón.

Pueden administrarse vectores de terapia génica *in vivo* mediante administración a un paciente individual, normalmente mediante administración sistémica (por ejemplo, infusión intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica o intracraneal) o aplicación tópica. Alternativamente, pueden administrarse vectores a células *ex vivo*, tales como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia tisular) o células madre hematopoyéticas de donante universal, seguido por una reimplantación de las células en un paciente, habitualmente tras la selección de células que han incorporado el vector.

Modular la señalización en la ruta de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog

(A) Ensayos para determinar moduladores de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog

En numerosas realizaciones de esta invención, el nivel de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog se modulará en una célula mediante administración a la célula, *in vivo* o *in vitro*, de cualquiera de un gran número de moléculas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, por ejemplo, polipéptidos, anticuerpos, aminoácidos, nucleótidos, lípidos, hidratos de carbono o cualquier molécula orgánica o inorgánica.

Para identificar moléculas que pueden modular la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, se realizarán ensayos para detectar el efecto de diversos compuestos sobre la actividad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog en una célula. Puede evaluarse la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog usando una variedad de ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar efectos funcionales, químicos y físicos, por ejemplo, medir la unión de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog a otras moléculas (por ejemplo, unión radioactiva a Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog), medir los niveles de proteína y/o ARN de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog que proporcionan una respuesta inmunosupresora o inmunoestimulante, o medir otros aspectos de la señalización de la ruta, por ejemplo, niveles de fosforilación, niveles de transcripción, actividad de receptor, unión a ligando y similares. Tales ensayos pueden usarse para someter a prueba para detectar tanto activadores como inhibidores de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. Los moduladores así identificados son útiles, por ejemplo, para muchas aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

La señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog en el ensayo será normalmente un polipéptido recombinante o que se produce de manera natural o una variante modificada de manera conservativa del mismo. Alternativamente, la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog en el ensayo se derivará de una eucariota e incluirá una subsecuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog que se produce de manera natural. Generalmente, la identidad de secuencia de aminoácidos será de al menos el 70%, opcionalmente al menos el 75%, 85%, o 86%, 87%, 88%, 89%, 90 %, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o superior. Opcionalmente, el polipéptido de los ensayos comprenderá un dominio de un polipéptido que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog. En determinadas realizaciones, se une un dominio de proteína de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog a un sustrato sólido y se usa, por ejemplo, para aislar cualquier molécula que puede unirse a y/o modular su actividad. En determinadas realizaciones, se fusiona un dominio de un polipéptido que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, por ejemplo, un dominio N-terminal, un dominio C-terminal, con un polipéptido heterólogo, formando así un polipéptido quimérico. Tales polipéptidos quiméricos son útiles, por ejemplo, en ensayos para identificar moduladores de una señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog.

"Idéntico" o "identidad" en porcentaje, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptido, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácido o nucleótidos que son iguales (es decir, identidad de aproximadamente el 60%, preferiblemente del 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o identidad superior a lo largo

de una región especificada (por ejemplo, secuencia de nucleótidos que codifica para una colectina descrita en el presente documento o secuencia de aminoácidos de una colectina descrita en el presente documento), cuando se comparan y se alinean para obtener su máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación o región designada) según se mide usando un algoritmo de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con parámetros por defecto descritos a continuación, o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, el sitio web del NCBI). Entonces se dice que tales secuencias son “sustancialmente idénticas”. Este término también se refiere, o puede aplicarse, al complemento de una secuencia de prueba. El término también incluye secuencias que tienen deleciones y/o adiciones, así como las que tienen sustituciones. Tal como se describe a continuación, los algoritmos preferidos pueden tener en cuenta huecos y similares. Preferiblemente, existe identidad a lo largo de una región que tiene al menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o más preferiblemente a lo largo de una región que tiene 50-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen las secuencias de prueba y de referencia en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros de programa del algoritmo de secuencia. Preferiblemente, pueden usarse los parámetros de programa por defecto, o pueden designarse parámetros alternativos. Entonces el algoritmo de comparación de secuencias calcula las identidades de secuencias en porcentaje para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una “ventana de comparación”, tal como se usa en el presente documento, incluye referencia a un segmento de una cualquiera de las diversas posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en desde 20 hasta 600, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en las que puede compararse una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas tras alinearse de manera óptima las dos secuencias. En la técnica se conocen bien métodos de alineación de secuencias para comparación. Puede realizarse la alineación óptima de secuencias para su comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv Appl. Math.*, 1981, 2:482, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 1970, 48:443, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1988, 85:2444, mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds. 1995 suplemento)).

Un ejemplo preferido de algoritmo que es adecuado para determinar la identidad de secuencia en porcentaje y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 1977, 25: 3389-3402 y Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1990, 215:403-410, respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se usan, con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar la identidad de secuencia en porcentaje para los ácidos nucleicos y las proteínas de la invención. El software para realizar análisis de BLAST está disponible para el público a través del Centro Nacional de Información en Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que o bien corresponden o bien satisfacen alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se denomina umbral de puntuación de palabra próxima (Altschul *et al.*, citado anteriormente). Estos resultados positivos de palabra próxima iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas de HSP más largos que las contienen. Los resultados positivos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como puede aumentarse la puntuación de alineación acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos de coincidencia errónea; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los resultados positivos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulativa se aleja en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la tasa de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como defecto una longitud de palabra de 3 y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas.

“Polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácido son un agente mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente que se produce de manera natural, así como a polímeros de aminoácidos que se producen de manera natural y polímero de aminoácidos que no se producen de manera natural.

“Aminoácido” se refiere a aminoácidos que se producen de manera natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y agentes miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos que se producen de manera natural. Los aminoácidos que se producen de manera natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural, es decir, un carbono  $\alpha$  que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural. Los agentes miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido que se produce de manera natural.

Puede hacerse referencia a los aminoácidos en el presente documento o bien mediante sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o bien mediante los símbolos de una letra recomendados por la comisión de nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB. Asimismo, puede hacerse referencia a los nucleótidos mediante sus códigos de una única letra comúnmente aceptados.

“Variantes modificadas de manera conservativa” se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, las variantes modificadas de manera conservativa se refieren a los ácidos nucleicos que codifican para secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica para una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican para cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican para el aminoácido alanina. Por tanto, en cualquier posición en la que se especifica una alanina por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácidos nucleicos son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas de manera conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica para un polipéptido también describe todas las posibles variaciones silenciosas del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para metionina, y TGG, que es habitualmente el único codón para triptófano) puede modificarse para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a secuencias sonda reales.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que sustituciones, deleciones o adiciones individuales en una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que alteran, añaden o eliminan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada son una “variante modificada de manera conservativa” cuando la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. En la técnica se conocen bien tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Tales variantes modificadas de manera conservativa son además de, y no excluyen, variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos de la invención.

Los ocho grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas unos de otros: 1) alanina (A), glicina (G); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); 7) serina (S), treonina (T); y 8) cisteína (C), metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

Pueden describirse estructuras macromoleculares tales como estructuras polipeptídicas en cuanto a diversos niveles de organización. Para una valoración general de esta organización, véase, por ejemplo, Alberts *et al.*, Molecular Biology of the Cell (3ª ed., 1994) y Cantor y Schimmel, Biophysical Chemistry Part I: The Conformation of Biological Macromolecules (1980). “Estructura primaria” se refiere a la secuencia de aminoácidos de un péptido particular. “Estructura secundaria” se refiere a estructuras tridimensionales, localmente ordenadas, dentro de un polipéptido. Estas estructuras se conocen comúnmente como dominios, por ejemplo, dominios enzimáticos, dominios extracelulares, dominios transmembrana, dominios de poros y dominios de cola citoplasmática. Los dominios son partes de un polipéptido que forman una unidad compacta del polipéptido y tienen normalmente de 15 a 350 aminoácidos de longitud. Los dominios a modo de ejemplo incluyen dominios con actividad enzimática, por ejemplo, un dominio de cinasa. Los dominios típicos están constituidos por secciones de menor organización tales como tramos de lámina  $\beta$  y hélices  $\alpha$ . “Estructura terciaria” se refiere a la estructura tridimensional completa de un monómero polipeptídico. “Estructura cuaternaria” se refiere a la estructura tridimensional formada por la asociación no covalente de unidades terciarias independientes. Los términos anisotrópicos también se conocen como términos de energía.

Una secuencia de ácido nucleico particular también abarca de manera implícita “variantes de corte y empalme”. De manera similar, una proteína particular codificada por un ácido nucleico abarca de manera implícita cualquier proteína codificada por una variante de corte y empalme de ese ácido nucleico. “Variantes de corte y empalme”, tal

como sugiere el nombre, son productos de corte y empalme alternativo de un gen. Tras la transcripción, puede someterse un transcrito de ácido nucleico inicial a corte y empalme de tal manera que productos de corte y empalme de ácido nucleico diferentes (alternativos) codifican para polipéptidos diferentes. Los mecanismos para la producción de variantes de corte y empalme varían, pero incluyen corte y empalme alternativo de exones. Los polipéptidos alternativos derivados del mismo ácido nucleico mediante transcripción de ultralectura también quedan abarcados por esta definición. Cualquier producto de una reacción de corte y empalme, incluyendo formas recombinantes de los productos de corte y empalme, se incluyen en esta definición.

La frase "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones en las que una sonda se hibridará con su subsecuencia diana, normalmente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas superiores. Se encuentra una guía extensa sobre la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acids assays" (1993). Generalmente, se seleccionan condiciones rigurosas que son aproximadamente 5-10°C inferiores al punto de fusión térmica ( $T_f$ ) para la secuencia especificada a una concentración iónica definida, pH. La  $T_f$  es la temperatura (a la concentración iónica definida, pH, y concentración nucleica) a la que el 50% de las sondas complementarias para la diana se hibridan con la secuencia diana en el equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, a la  $T_f$ , el 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio). También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces el fondo, preferiblemente 10 veces la hibridación de fondo. Condiciones de hibridación rigurosa a modo de ejemplo pueden ser tal como sigue: formamida al 50%, 5x SSC, y SDS al 1%, incubar a 42°C, o, 5x SSC, SDS al 1%, incubar a 65°C, con lavado con 0,2x SSC, y SDS al 0,1% a 65°C.

Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones rigurosas todavía son sustancialmente idénticos si los polipéptidos para los que codifican son sustancialmente idénticos. Esto se produce, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la máxima degeneración de codón permitida por el código genético. En tales casos, los ácidos nucleicos se hibridan normalmente en condiciones de hibridación moderadamente rigurosas. Las "condiciones de hibridación moderadamente rigurosas" a modo de ejemplo incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 1X SSC a 45°C. Una hibridación positiva es al menos dos veces el fondo. Los expertos habituales reconocerán fácilmente que pueden usarse condiciones de hibridación y lavado alternativas para proporcionar condiciones de rigurosidad similar. Se proporcionan directrices adicionales para determinar los parámetros de hibridación en numerosas referencias, por ejemplo, Ausubel *et al*, citado anteriormente.

Para PCR, una temperatura de aproximadamente 36°C es típica para una amplificación de baja rigurosidad, aunque las temperaturas de apareamiento pueden variar entre aproximadamente 32°C y 48°C dependiendo de la longitud de los cebadores. Para la amplificación por PCR de alta rigurosidad, una temperatura de aproximadamente 62°C es típica, aunque las temperaturas de apareamiento de alta rigurosidad pueden oscilar entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 65°C, dependiendo de la especificidad y longitud de los cebadores. Las condiciones de ciclo típicas para amplificaciones tanto de alta como de baja rigurosidad incluyen una fase de desnaturalización de 90°C - 95°C durante 30 seg. - 2 min., una fase de apareamiento que dura 30 seg. - 2 min., y una fase de extensión de aproximadamente 72°C durante 1 - 2 min. Se proporcionan protocolos y directrices para reacciones de amplificación de baja y alta rigurosidad, por ejemplo, en Innis *et al*. *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990).

Se comparan muestras o ensayos que se tratan con un inhibidor o activador potencial de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog con muestras de control sin el compuesto de prueba, para examinar el grado de modulación. A las muestras de control (no tratadas con activadores o inhibidores) se les asigna un valor de actividad relativa de 100. Se logra la inhibición de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog cuando el valor de actividad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog con respecto al control es de aproximadamente el 90%, opcionalmente de aproximadamente el 50%, opcionalmente de aproximadamente el 25-0%. Se logra la activación de una señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog cuando el valor de actividad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog con respecto al control es de aproximadamente el 110%, opcionalmente de aproximadamente el 150%, el 200-500%, o de aproximadamente el 1000-2000%.

Los efectos de los compuestos de prueba sobre la función de los polipéptidos pueden medirse examinando cualquiera de los parámetros descritos anteriormente. Cualquier cambio fisiológico adecuado que afecta a la actividad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog puede usarse para evaluar la influencia de un compuesto de prueba sobre los polipéptidos de esta invención. Cuando se determinan las consecuencias funcionales usando células o animales intactos, también puede medirse una variedad de efectos tales como cambios en el crecimiento celular o cambios en interacciones célula-célula.

También pueden identificarse moduladores de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog que actúan modulando la expresión génica. Por ejemplo, se pone una célula huésped que contiene una proteína de interés de  $\beta$ -catenina o de señalización de Wnt en contacto con un compuesto de prueba durante un tiempo suficiente para efectuar cualquier interacción, y entonces se mide el nivel de expresión génica. La cantidad de tiempo para efectuar tales interacciones puede determinarse empíricamente, tal como realizando un transcurso de tiempo y midiendo el nivel de transcripción como función del tiempo. La cantidad de transcripción puede medirse usando cualquier método que los expertos en la técnica saben que es adecuado. Por ejemplo, puede detectarse la expresión de ARNm de la proteína de interés usando transferencias de tipo Northern o detectando sus productos polipeptídicos usando inmunoensayos.

(B) Ensayos para compuestos de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog

En determinadas realizaciones, se realizarán ensayos para identificar moléculas que interaccionan físicamente con Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog. Tales moléculas pueden ser cualquier tipo de molécula, incluyendo polipéptidos, polinucleótidos, aminoácidos, nucleótidos, hidratos de carbono, lípidos o cualquier otra molécula orgánica o inorgánica. Tales moléculas pueden representar moléculas que interaccionan normalmente con Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog o pueden ser moléculas sintéticas u otras que pueden interaccionar con Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog y que pueden usarse potencialmente como compuestos líder para identificar clases de moléculas que pueden interaccionar con y/o modular la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. Tales ensayos pueden representar ensayos de unión física, tales como cromatografía de afinidad, inmunoprecipitación, selecciones de dos híbridos u otros ensayos de unión, o pueden representar ensayos genéticos.

En cualquiera de los ensayos de unión o funcionales descritos en el presente documento, *in vivo* o *in vitro*, puede usarse señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, o cualquier derivado, variación, homólogo o fragmento de señalización de Wnt o  $\beta$ -catenina. Preferiblemente, la proteína de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog tiene al menos aproximadamente el 85% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la proteína de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog que se produce de manera natural. En numerosas realizaciones, se usa un fragmento de una proteína Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog. Tales fragmentos pueden usarse solos, en combinación con otros fragmentos de proteína de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, o en combinación con secuencias de proteínas heterólogas, por ejemplo, los fragmentos pueden fusionarse con un polipéptido heterólogo, formando de ese modo un polipéptido quimérico.

Pueden aislarse compuestos que interaccionan con la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog basándose en una capacidad para unirse específicamente a una Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog o fragmento de las mismas. En numerosas realizaciones, la Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog o fragmento de proteína se fijará a un soporte sólido. En una realización, se preparan columnas de afinidad usando el polipéptido de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, y se identifican moléculas que interaccionan físicamente. Resultará evidente para un experto que pueden realizarse técnica cromatográfica a cualquier escala y usando equipo de muchos fabricantes diferentes (por ejemplo, Pharmacia Biotechnology). Además, pueden identificarse moléculas que interaccionan con Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog *in vivo* mediante co-inmunoprecipitación u otros métodos, es decir, inmunoprecipitando Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog usando anticuerpos anti-Wnt o anti- $\beta$ -catenina procedentes de una célula o extracto celular, e identificando compuestos, por ejemplo, proteínas, que se precipitan junto con la Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog. Tales métodos los conocen bien los expertos en la técnica y se enseñan, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, 1994; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY., 1989; y Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY., 1989.

(C) Aumentar niveles de actividad de proteína Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog en células

En determinadas realizaciones, esta invención proporciona métodos de tratamiento de enfermedad neoplásica, rechazo de tejido alogénico o enfermedad de injerto contra huésped aumentando Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, o la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog o los niveles de proteína en una célula. Normalmente, tales métodos se usan para aumentar un nivel reducido de proteína Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, por ejemplo, un nivel reducido en una célula madre hematopoyética o una célula progenitora muscular, y puede realizarse de cualquiera de varias maneras, por ejemplo, aumentando el número de copias de genes Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog o aumentando el nivel de ARNm, proteína o actividad de proteína Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog en una célula. Preferiblemente, el nivel de actividad de proteína se aumenta hasta un nivel típico de una célula normal, pero el nivel puede aumentarse hasta cualquier nivel que sea suficiente para aumentar la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog en una célula madre hematopoyética o célula progenitora muscular, incluyendo los niveles superiores o inferiores a los típicos de células normales. Preferiblemente, tales métodos suponen el uso de activadores de la señalización de

Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, en los que un "activador de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog" es una molécula que actúa aumentando los niveles de polinucleótidos de genes, los niveles de polipéptidos y/o la actividad de proteína Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog. Tales activadores pueden incluir, pero no se limitan a, activadores de molécula pequeña de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog.

En realizaciones preferidas, se aumentarán los niveles de proteína Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog o la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog de manera que se aumentan las células madre hematopoyéticas, células madre, células progenitoras musculares o células progenitoras neurales *in vivo* en un sujeto mamífero o se trata una enfermedad inmunitaria, enfermedad muscular degenerativa o enfermedad neurodegenerativa en un sujeto mamífero como resultado de la disminución de los niveles de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. La proliferación de una célula se refiere a la tasa a la que se divide la célula o población de células, o al grado en el que se divide o aumenta en número la célula o población de células. La proliferación puede reflejar cualquiera de varios factores, incluyendo la tasa de crecimiento y división celular y la tasa de muerte celular. Sin limitarse a la siguiente teoría ofrecida, se sugiere que la amplificación y/o sobreexpresión de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog en células madre hematopoyéticas, células madre, células progenitoras musculares o células progenitoras neurales para tratar una enfermedad inmunitaria o una enfermedad muscular degenerativa o una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto mamífero. La inhibición o activación de la actividad inmunitaria a través de la proteína Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog puede actuar para tratar una enfermedad inmunitaria o una enfermedad muscular degenerativa o enfermedad neurodegenerativa en un sujeto mamífero. La capacidad de cualquiera de los presentes compuestos para afectar a la actividad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog puede determinarse basándose en cualquiera de varios factores, incluyendo, pero sin limitarse a, un nivel de polinucleótido de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, por ejemplo, ARNm o ADNg, el nivel de polipéptido de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, el grado de unión de un compuesto a un polinucleótido o polipéptido de Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, la ubicación intracelular de la proteína Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, o cualquier propiedad funcional de la proteína Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog, tal como la capacidad de la actividad de proteína Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog para potenciar una respuesta inmunitaria, o tratar una enfermedad inmunitaria o una enfermedad muscular degenerativa o enfermedad neurodegenerativa en un sujeto mamífero.

#### (D) Reguladores de polinucleótidos de Wnt, $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog

En determinadas realizaciones, se regula la actividad de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog mediante el uso de polinucleótido antisentido, es decir, un ácido nucleico complementario a, y que preferiblemente puede hibridarse específicamente con, una secuencia de ácido nucleico de ARNm codificante, por ejemplo, ARNm de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, o una subsecuencia de la misma. La unión del polinucleótido antisentido al ARNm reduce la traducción y/o la estabilidad del ARNm de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog.

En el contexto de esta invención, los polinucleótidos antisentido pueden comprender nucleótidos que se producen de manera natural, o especies sintéticas formadas a partir de subunidades que se producen de manera natural o sus homólogos cercanos. Los polinucleótidos antisentido también pueden tener enlaces entre azúcares o restos de azúcar alterados. Ejemplos de éstos son el fosforotioato y otras especies que contienen azufre que se conocen para su uso en la técnica. Todos de tales análogos quedan abarcados por esta invención siempre que funcionen de manera eficaz para hibridarse con ARNm de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog.

Tales polinucleótidos antisentido pueden sintetizarse fácilmente usando medios recombinantes, o pueden sintetizarse *in vitro*. Se vende equipo para tales síntesis por varios proveedores, incluyendo Applied Biosystems. La preparación de otros oligonucleótidos tales como fosforotioatos y derivados alquilados también la conocen los expertos en la técnica.

Además de polinucleótidos antisentido, pueden usarse ribozimas para seleccionar como diana e inhibir la transcripción de proteína de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. Una ribozima es una molécula de ARN que escinde catalíticamente otras moléculas de ARN. Se han descrito diferentes clases de ribozimas, incluyendo ribozimas de grupo I, ribozimas de cabeza de martillo, ribozimas en horquilla, ARNasa P, y ribozimas de cabeza de hacha (véase, por ejemplo, Castanotto *et al.*, Adv. En Pharmacology 25: 289-317, 1994 para una revisión general de las propiedades de diferentes ribozimas).

Las características generales de las ribozimas en horquilla se describen, por ejemplo, en Hampel *et al.*, Nucl. Acids Res., 18: 299-304, 1990; Hampel *et al.*, publicación de patente europea n.º 0 360 257, 1990; patente estadounidense n.º 5.254.678. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos de preparación (véase, por ejemplo, Wong-Staal *et al.*, documento WO 94/26877; Ojwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6340-6344, 1993; Yamada *et al.*,

Human Gene Therapy 1: 39-45,1994; Leavitt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 699-703, 1995; Leavitt *et al.*, Human Gene Therapy 5: 1151-120,1994; y Yamada *et al.*, Virology 205: 121-126, 1994).

5 También puede aumentarse la actividad de proteína de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o  
 10 señalización de Hedgehog mediante la adición de un activador o inhibidor de la proteína Wnt,  $\beta$ -catenina, Notch o  
 Hedgehog. Esto puede lograrse de cualquiera de varias maneras, incluyendo proporcionar un polipéptido dominante  
 negativo de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, por ejemplo, una  
 forma de proteína de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog que por sí  
 misma no tiene actividad y que, cuando está presente en la misma célula como proteína funcional de señalización  
 15 de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, reduce o elimina la actividad de proteína de  
 señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog de la proteína funcional de  
 señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. Los expertos en la técnica  
 conocen bien el diseño de formas dominantes negativas y se describe, por ejemplo, en Herskowitz, Nature 329:219-  
 22, 1987. Además, pueden usarse variantes de polipéptido inactivas (muteínas), por ejemplo, examinando la  
 capacidad para inhibir la actividad de proteína de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o  
 20 señalización de Hedgehog. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos de preparación de muteínas  
 (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.486.463; 5.422.260; 5.116.943; 4.752.585 y 4.518.504).  
 Además, puede examinarse cualquier molécula pequeña, por ejemplo, cualquier péptido, aminoácido, nucleótido,  
 lípido, hidrato de carbono o cualquier otra molécula orgánica o inorgánica, para determinar la capacidad para unirse  
 a, o inhibir, la actividad de proteína de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de  
 Hedgehog, tal como se describe a continuación.

#### (E) Moduladores y compuestos de unión

25 Los compuestos sometidos a prueba como moduladores de una proteína de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina,  
 señalización de Notch o señalización de Hedgehog pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una  
 entidad biológica, tal como una proteína, azúcar, ácido nucleico o lípido. Normalmente, los compuestos de prueba  
 serán péptidos y moléculas químicas pequeños. Esencialmente puede usarse cualquier compuesto químico como  
 30 modulador o compuesto de unión potencial en los ensayos de la invención, aunque lo más a menudo los  
 compuestos pueden disolverse en disoluciones acuosas u orgánicas (especialmente a base de DMSO). Los ensayos  
 se diseñan para examinar grandes bibliotecas químicas automatizando las etapas del ensayo y proporcionando los  
 compuestos a partir de cualquier fuente conveniente para los ensayos, que normalmente se realizan en paralelo (por  
 ejemplo, en formatos de microtitulación en placas de microtitulación en ensayos robóticos). Se apreciará que existen  
 muchos proveedores de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-  
 35 Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Suiza) y similares.

En una realización preferida, los métodos de examen de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca  
 peptídica o química combinatoria que contiene un gran número de compuestos terapéuticos potenciales  
 40 (moduladores o compuestos de unión potenciales). Tales "bibliotecas químicas combinatorias" se examinan  
 entonces en uno o más ensayos, tal como se describe en el presente documento, para identificar aquellos miembros  
 de la biblioteca (subclases o especies químicas particulares) que muestran una actividad característica deseada. Los  
 compuestos así identificados pueden servir como "compuestos principales" convencionales o pueden usarse por sí  
 mismos como agentes terapéuticos potenciales o reales.

45 Una biblioteca química combinatoria es un conjunto de diversos compuestos químicos generados mediante o bien  
 síntesis química o bien síntesis biológica, combinando varios "elementos estructurales" químicos tales como  
 reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal tal como una biblioteca polipeptídica se forma  
 combinando un conjunto de elementos estructurales químicos (aminoácidos) en cada forma posible para una  
 longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Pueden  
 50 sintetizarse millones de compuestos químicos a través de una mezcla combinatoria de este tipo de elementos  
 estructurales químicos.

La preparación y el examen de bibliotecas químicas combinatorias se conocen bien por los expertos en la técnica.  
 Tales bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas peptídicas (véase, por ejemplo,  
 55 la patente estadounidense n.º 5.010.175; Furka, Int. J. Pept. Prot. Res. 37:487-493, 1991; y Houghton *et al.*, Nature  
 354: 84-88, 1991). También puede usarse otros compuestos químicos para generar bibliotecas de diversidad  
 químicas. Tales compuestos químicos incluyen, pero no se limitan a: peptoides (por ejemplo, publicación PCT n.º  
 WO 91/19735), péptidos codificados (por ejemplo, publicación PCT n.º WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (por  
 ejemplo, publicación PCT n.º WO 92/00091), benzodiazepinas (por ejemplo, patente estadounidense n.º 5.288.514),  
 60 diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA  
 90:6909-6913, 1993), polipéptidos vinílogos (Hagihara *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 114:6568, 1992),  
 peptidomiméticos no peptídicos con estructura principal de glucosa (Hirschmann *et al.*, J. Amer. Chem. Soc.  
 114:9217-9218, 1992), síntesis orgánica análoga de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen *et al.*, J. Amer.  
 Chem. Soc. 116:2661, 1994), oligocarbamatos (Cho *et al.*, Science 261:1303, 1993), y/o fosfonatos de peptidilo  
 65 (Campbell *et al.*, J. Org. Chem. 59:658, 1994), bibliotecas de ácidos nucleicos (véase Ausubel, Berger y Sambrook,

5 todos citados anteriormente), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn *et al.*, Nature Biotechnology 14:309-314, 1996; y PCT/US96/10287), bibliotecas de hidratos de carbono (véase, por ejemplo, Liang *et al.*, Science, 274:1520-1522, 1996; y la patente estadounidense n.º 5.593.853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum, C&EN, página 33, 18 de enero de 1993; isoprenoides, patente estadounidense 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, patente estadounidense n.º 5.549.974; pirrolidinas, patentes estadounidenses n.ºs 5.525.735 y 5.519.134; compuestos de morfolino, patente estadounidense n.º 5.506.337; benzodiazepinas, patente estadounidense n.º 5.288.514 y similares).

10 Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias están comercialmente disponibles (véase, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA). Además, numerosas bibliotecas combinatorias están comercialmente disponibles por sí mismas (véanse, por ejemplo, ComGenex, Princeton, N.J.; Tripos, Inc., St. Louis, MO; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences, Columbia, MD, etc.).

15 (F) Ensayos de alto rendimiento solubles y en estado sólido

En una realización, la invención proporciona ensayos solubles usando moléculas tales como un dominio N-terminal o C-terminal o bien solo o bien unido covalentemente a una proteína heteróloga para crear una molécula quimérica. En otra realización, la invención proporciona ensayos *in vitro* basados en fase sólida en un formato de alto rendimiento, en los que un dominio, molécula quimérica, proteína de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, o célula o tejido que expresan una proteína de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog se une a un sustrato en fase sólida.

25 En los ensayos de alto rendimiento de la invención, es posible examinar hasta varios miles de moduladores diferentes en un único día. En particular, cada pocillo de una placa de microtitulación puede usarse para realizar un ensayo separado frente a un modulador potencial seleccionado, o si tienen que observarse efectos de concentración o tiempo de incubación, cada 5-10 pocillos pueden someter a prueba un único modulador. Por tanto, una única placa de microtitulación convencional puede someter a prueba aproximadamente 100 (por ejemplo, 96) moduladores. Si se usan placas de 1536 pocillos, entonces una única placa puede someter a ensayo fácilmente desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1500 compuestos diferentes. Es posible someter a ensayo varias placas diferentes por día; es posible que el ensayo examine hasta aproximadamente 6.000-20.000 compuestos diferentes usando los sistemas integrados de la invención. Más recientemente, se han desarrollado enfoques microfluídicos para la manipulación de reactivos.

35 La molécula de interés puede unirse al componente en estado sólido, directa o indirectamente, a través de enlace covalente o no covalente, por ejemplo, mediante una etiqueta. La etiqueta puede ser cualquiera de una variedad de componentes. En general, una molécula que se une a la etiqueta (un elemento de unión de etiqueta) se fija a un soporte sólido, y la molécula de interés etiquetada se une al soporte sólido mediante la interacción de la etiqueta y el elemento de unión de etiqueta.

Pueden usarse varias etiquetas y elementos de unión de etiqueta, basándose en interacciones moleculares conocidas bien descritas en la bibliografía. Por ejemplo, cuando una etiqueta tiene un elemento de unión natural, por ejemplo, biotina, proteína A o proteína G, puede usarse conjuntamente con elementos de unión de etiqueta apropiados (avidina, estreptavidina, neutravidina, la región Fc de una inmunoglobulina, etc.). También se dispone ampliamente de anticuerpos frente a moléculas con elementos de unión naturales tales como biotina y elementos de unión de etiqueta apropiados; véase, SIGMA Immunochemicals 1998 catálogo SIGMA, St. Louis MO).

50 De manera similar, puede usarse cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo apropiado para formar un par de etiqueta/elemento de unión de etiqueta. Miles de anticuerpos específicos están comercialmente disponibles y en la bibliografía se describen muchos anticuerpos adicionales. Por ejemplo, en una configuración común, la etiqueta es un primer anticuerpo y el elemento de unión de etiqueta es un segundo anticuerpo que reconoce al primer anticuerpo.

55 Polímeros sintéticos, tales como poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietilenimidas, sulfuros de poliarileno, polisiloxanos, poliimidias y poliacetatos también pueden formar una etiqueta o elemento de unión de etiqueta apropiados. Muchos otros pares de etiqueta/elemento de unión de etiqueta también son útiles en sistemas de ensayo tal como se describe en el presente documento, tal como sería evidente para un experto que revisara esta descripción.

60 Ligadores comunes tales como péptidos, poliéteres y similares también pueden servir como etiquetas, e incluyen secuencias polipeptídicas, tales como secuencias de poli-Gly de entre aproximadamente 5 y 200 aminoácidos. Tales ligadores flexibles son conocidos por expertos en la técnica. Por ejemplo, los ligadores de polietilenglicol están disponibles de Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Alabama. Estos ligadores tienen opcionalmente enlaces amida, enlaces sulfhidrilo o enlaces heterofuncionales.

65

Los elementos de unión de etiqueta se fijan a sustratos sólidos usando cualquiera de una variedad de métodos disponibles actualmente. Los sustratos sólidos se derivatizan o funcionalizan comúnmente exponiendo todo o una parte del sustrato a un reactivo químico que fija un grupo químico a la superficie que es reactiva con una parte del elemento de unión de etiqueta. Por ejemplo, grupos que son adecuados para su unión a una parte de cadena más

5 larga incluirían aminas, grupos hidroxilo, tiol y carboxilo. Pueden usarse aminoalquilsilanos e hidroxialquilsilanos para funcionalizar una variedad de superficies, tales como superficies de vidrio. La construcción de tales matrices de biopolímero en fase sólida está bien descrita en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1993 (que describe la síntesis en fase sólida de, por ejemplo, péptidos); Geysen *et al.*, J. Immun. Meth. 102: 259-274, 1987 (que describen la síntesis de componentes en fase sólida en varillas); Frank & Doring,

10 Tetrahedron 44:6031-6040, 1988 (que describen la síntesis de diversas secuencias peptídicas en discos de celulosa); Fodor *et al.*, Science 251: 767-777, 1991; Sheldon *et al.*, Clinical Chemistry 39:718-719, 1993; y Kozal *et al.*, Nature Medicine 2:753-759, 1996 (que describen todos ellos matrices de biopolímeros fijas a sustratos sólidos). Los enfoques no químicos para fijar elementos de unión de etiqueta a sustratos incluyen otros métodos comunes, tales como calor, reticulación mediante radiación UV y similares.

#### 15 (G) Ensayos de diseño de fármacos racionales

Todavía otro ensayo para compuestos que modulan la actividad de la proteína de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog implica un diseño de fármacos asistido por ordenador, en el que se usa un sistema informático para generar una estructura tridimensional de una proteína de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog basándose en la información estructural codificada por su secuencia de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de entrada interacciona directa y activamente con un algoritmo establecido previamente en un programa informático para dar modelos estructurales secundarios, terciarios y cuaternarios de la proteína. Los modelos de la estructura de la proteína se examinan entonces para

20 identificar regiones de la estructura que tienen capacidad de unión. Estas regiones se usan entonces para identificar compuestos que se unen a la proteína.

El modelo estructural tridimensional de la proteína se genera introduciendo secuencias de aminoácidos de proteína de al menos 10 residuos de aminoácido o secuencias de ácido nucleico correspondientes que codifican para un polipéptido de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog en el sistema informático. La secuencia de nucleótidos que codifican para el polipéptido, o la secuencia de aminoácidos del mismo, y versiones modificadas de manera conservativa de la misma, de la secuencia génica que se produce de manera natural. La secuencia de aminoácidos representa la secuencia o subsecuencia primaria de la proteína, que codifica para la información estructural de la proteína. Al menos se introducen 10 residuos de la secuencia de

30 aminoácidos (o una secuencia de nucleótidos que codifica para 10 aminoácidos) en el sistema informático a partir de teclados de ordenador, sustratos legibles por ordenador que incluyen, pero no se limitan a, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, disquetes magnéticos, cintas, cartuchos y chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), información distribuida en sitios de Internet, y mediante RAM. El modelo estructural tridimensional de la proteína se genera entonces mediante la interacción de la secuencia de aminoácidos y el

40 sistema informático, usando software conocido por los expertos en la técnica.

La secuencia de aminoácidos representa una estructura primaria que codifica la información necesaria para formar la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína de interés. El software considera ciertos parámetros codificados por la secuencia primaria para generar el modelo estructural. Estos parámetros se denominan "términos de energía" e incluyen principalmente potenciales electrostáticos, potenciales hidrófobos, superficies accesibles al disolvente y puentes de hidrógeno. Los términos de energía secundarios incluyen potenciales de van der Waals. Las moléculas biológicas forman las estructuras que minimizan los términos de energía de forma acumulativa. El programa informático usa por tanto estos términos codificados por la estructura primaria o la secuencia de aminoácidos para crear el modelo estructural secundario.

La estructura terciaria de la proteína codificada por la estructura secundaria se forma entonces partiendo de la base de los términos de energía de la estructura secundaria. El usuario en este punto puede introducir variables adicionales tales como si la proteína se une a la membrana o es soluble, su ubicación en el organismo y su ubicación celular, por ejemplo, citoplasmática, de superficie o nuclear. Estas variables, junto con los términos de

55 energía de la estructura secundaria se usan para formar el modelo de la estructura terciaria. En el modelado de la estructura terciaria, el programa informático hace corresponder caras hidrófobas de estructura secundaria con iguales y caras hidrófilas de estructura secundaria con iguales.

Una vez que se ha generado la estructura, el sistema informático identifica regiones de unión a modulador potenciales. Se generan estructuras tridimensionales para moduladores potenciales introduciendo secuencias de aminoácidos o nucleótidos o fórmulas químicas de compuestos, tal como se describió anteriormente. La estructura tridimensional del modulador potencial se compara entonces con la de la proteína de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog para identificar compuestos que se unen a la proteína. La afinidad de unión entre la proteína y el compuesto se determina usando términos de energía para determinar qué

60 compuestos tienen una probabilidad potenciada de unirse a la proteína.

Los sistemas informáticos también se usan para examinar mutaciones, variantes polimórficas, alelos y homólogos entre especies de genes de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. Tales mutaciones pueden asociarse con estados patológicos o rasgos genéticos. También puede usarse GeneChip™ y tecnología relacionada para examinar mutaciones, variantes polimórficas, alelos y homólogos entre especies. Una vez identificadas las variantes, pueden usarse ensayos de diagnóstico para identificar pacientes que tienen tales genes mutados. La identificación de los genes mutados de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog implica recibir la entrada de una primera secuencia de aminoácidos o ácido nucleico del gen inducido de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog que se produce de manera natural, respectivamente, y versiones modificadas de manera conservativa del mismo. La secuencia se introduce en el sistema informático tal como se describió anteriormente. La primera secuencia de aminoácidos o ácido nucleico se compara entonces con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico que tiene una identidad sustancial con la primera secuencia. La segunda secuencia se introduce en el sistema informático de la manera descrita anteriormente. Una vez que se comparan las secuencias primera y segunda, se identifican diferencias de nucleótidos o aminoácidos entre las secuencias. Tales secuencias pueden representar diferencias alélicas en diversos genes de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, y mutaciones asociadas con estados patológicos y rasgos genéticos.

#### Métodos de diagnóstico

Además de los ensayos, la creación de modelos animales, y agentes terapéuticos a base de ácidos nucleicos, la identificación de genes importantes permite el uso de estos genes en diagnóstico (por ejemplo, diagnóstico de estados celulares y condiciones celulares anómalas). Pueden determinarse trastornos basados en genes mutantes o variantes de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. Se proporcionan métodos para identificar células que contienen genes variantes de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog que comprenden determinar toda o parte de la secuencia de al menos un gen endógeno en una célula. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, esto puede realizarse usando varias técnicas de secuenciación. También se proporcionan métodos de identificación del genotipo de un individuo que comprende determinar toda o parte de la secuencia de al menos un gen de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog del individuo. Esto se realiza generalmente en al menos un tejido del individuo, y puede incluir la evaluación de diversos tejidos o diferentes muestras del mismo tejido. El método puede incluir comparar la secuencia del gen de  $\beta$ -catenina o gen de Wnt mutante secuenciado con un gen de  $\beta$ -catenina o gen de Wnt conocido, es decir, un gen silvestre.

La secuencia de todo o parte del gen de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog puede compararse entonces con la secuencia de un gen de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog para determinar si existe alguna diferencia. Esto puede realizarse usando cualquier número de programas de identidad de secuencia conocidos, tales como Bestfit, y otros expuestos en el presente documento. En algunos métodos, la presencia de una diferencia en la secuencia entre el gen de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog del paciente y el gen de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog conocido es indicativa de un estado patológico o una propensión a padecer un estado patológico, tal como se expone en el presente documento.

De manera similar, puede realizarse el diagnóstico de estados de células madre hematopoyéticas o células progenitoras musculares usando los métodos y las composiciones del presente documento. Mediante la evaluación del perfil de expresión génica de células madre hematopoyéticas o células progenitoras neurales, células progenitoras musculares de un paciente, puede determinarse el estado de la célula madre hematopoyética o célula progenitora muscular. Esto es particularmente útil para verificar la acción de un fármaco, por ejemplo un fármaco inmunosupresor. Otros métodos comprenden administrar el fármaco a un paciente y extraer una muestra de células, particularmente de células madre hematopoyéticas o células progenitoras neurales, células progenitoras musculares, del paciente. Entonces se evalúa el perfil de expresión génica de la célula, tal como se expone en el presente documento, por ejemplo comparándolo con el perfil de expresión de una muestra equivalente de un individuo sano. De esta manera, pueden verificarse tanto la eficacia (es decir, si se está generando el perfil de expresión correcto a partir del fármaco) como la dosis (si es la dosis correcta para dar como resultado el perfil de expresión correcto).

El presente descubrimiento se refiere al papel de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog en potenciar una respuesta inmunitaria, o por ejemplo, para tratar una enfermedad inmunitaria, una enfermedad muscular degenerativa o una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto mamífero. En un método, las proteínas de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, y particularmente fragmentos de proteína de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, son útiles en el estudio o el tratamiento de estados que están mediados por diversos estados patológicos, es decir, para diagnosticar, tratar o prevenir trastornos relacionados por sistema inmunitario. Por tanto, los "trastornos mediados por el sistema inmunitario" o "estados patológicos" pueden incluir estados que implican, por ejemplo, inhibición o potenciación de una respuesta inmunitaria, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad neoplásica, lupus eritematoso sistémico o rechazo de tejido alogénico.

Se proporcionan métodos de modulación de estados reguladores del sistema inmunitario en células u organismos. Algunos métodos comprenden administrar a una célula un anticuerpo anti-proteína que promueve la señalización de Wnt o un anticuerpo anti-proteína que promueve la señal de  $\beta$ -catenina u otro agente identificado en el presente documento o mediante los métodos proporcionados en el presente documento, que reduce o elimina la actividad biológica de la proteína endógena de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog. Alternativamente, los métodos comprenden administrar a una célula u organismo un ácido nucleico recombinante que codifica para una proteína o modulador que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, incluyendo ácidos nucleico antisentido. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, esto puede llevarse a cabo de varias maneras. En algunos métodos, la actividad de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog aumenta al aumentar la cantidad o actividad de proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog en la célula, por ejemplo mediante la sobreexpresión de la proteína endógena que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog o mediante la administración de un gen que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, usando técnicas de terapia génica conocidas, por ejemplo. En un método, las técnicas de terapia génica incluyen la incorporación del gen exógeno usando recombinación homóloga potenciada (EHR), por ejemplo tal como se describe en el documento PCT/US93/03868.

Se proporcionan métodos para diagnosticar un estado relacionado con la actividad de células madre hematopoyéticas o células progenitoras musculares en un individuo. Los métodos comprenden medir la actividad de la proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog en un tejido del individuo o paciente, que puede incluir una medición de la cantidad o actividad específica de la proteína. Esta actividad se compara con la actividad de la proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog o bien de un segundo individuo no afectado o bien o de un tejido no afectado del primer individuo. Cuando estas actividades son diferentes, el primer individuo puede estar en riesgo de padecer un trastorno mediado por la actividad de células madre hematopoyéticas o células progenitoras musculares.

Además, también pueden usarse secuencias de nucleótidos que codifican para una proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog para construir sondas de hibridación para mapear el gen que codifica para esa proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en el presente documento pueden mapearse con respecto a un cromosoma y regiones específicas de un cromosoma usando técnicas conocidas, tales como hibridación *in situ*, análisis de unión frente a marcadores cromosómicos conocidos y examen de hibridación con bibliotecas.

#### Anticuerpos

“Anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y específicamente cubre anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, y moléculas monocatenarias, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv), siempre que muestren la actividad biológica deseada. Los anticuerpos pueden marcarse/conjugarse con restos tóxicos o no tóxicos. Los restos tóxicos incluyen, por ejemplo, toxinas bacterianas, toxinas virales, radioisótopos y similares. Los anticuerpos pueden marcarse para su uso en ensayos biológicos (por ejemplo, marcadores de radioisótopos, marcadores fluorescentes) para ayudar en la detección del anticuerpo. Los anticuerpos también pueden marcarse/conjugarse para fines de terapéuticos o de diagnóstico, por ejemplo, con isótopos radiactivos que suministran radiación directamente a un sitio deseado para aplicaciones tales como radioinmunoterapia (Garmestani. *et al.*, Nucl Med Biol, 28:409, 2001), técnicas de obtención de imágenes y cirugía radioinmunoguiada o marcadores que permiten la detección u obtención de imágenes *in vivo* de complejos específicos de anticuerpo/antígeno. Los anticuerpos también pueden conjugarse con toxinas para proporcionar una inmunotoxina (véase, Kreitman, RJ Adv Drug Del Rev, 31:53, 1998).

“Anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen de manera natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan por el cultivo de hibridoma, sin contaminarse por otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden obtenerse mediante el método de hibridomas descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495, 1975, o pueden obtenerse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.816.567, Cabilly *et al.*). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de

fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, 624-628, 1991, y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597, 1991, por ejemplo.

5 Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es/son idéntica(s) u homóloga(s) a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada. (Cabilly *et al.*,  
10 citado anteriormente; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984).

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se sustituyen residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se sustituyen residuos de la región de entramado de Fv (FR) de la inmunoglobulina humana por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de entramado o CDR importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima al menos una parte de una región constante de inmunoglobulinas (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones *et al.*, Nature 321:522-525, 1986; Reichmann *et al.*, Nature 332:323-329, 1988; y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992. El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo Primatized™ en el que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido inmunizando monos macacos con el antígeno de interés.

Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera maduras de inmunoglobulina se denominan Hx y Lx respectivamente, donde x es un número que designa la posición de un aminoácido según el esquema de Kabat *et al.*, 1987 y 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Kabat *et al.* enumeran muchas secuencias de aminoácidos para anticuerpos para cada subclase, y enumeran el aminoácido que se produce más comúnmente para cada posición de residuo en esa subclase. Kabat *et al.* usan un método para asignar un número de residuo a cada aminoácido en una secuencia enumerada y este método para asignar números de residuo se ha vuelto convencional en el campo. El esquema de Kabat *et al.* puede extenderse a otros anticuerpos no incluidos en el compendio mediante la alineación del anticuerpo en cuestión con una de las secuencias consenso en Kabat *et al.* El uso del sistema de numeración de Kabat *et al.* identifica fácilmente aminoácidos en posiciones equivalentes en anticuerpos diferentes. Por ejemplo, un aminoácido en la posición L50 de un anticuerpo humano ocupa la posición de equivalencia con respecto a la posición L50 de aminoácido de un anticuerpo de ratón.

45 "No inmunogénico en un ser humano" significa que al poner el contacto el polipéptido de interés en un portador fisiológicamente aceptable y en una cantidad terapéuticamente eficaz con el tejido apropiado de un ser humano, no se puede demostrar estado de sensibilidad o resistencia al polipéptido de interés con la segunda administración del polipéptido de interés tras un periodo latente apropiado (por ejemplo, de 8 a 14 días).

50 "Anticuerpo neutralizante" se refiere a un anticuerpo que puede bloquear o reducir significativamente una función efectora del agente silvestre o mutante que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog. Por ejemplo, un anticuerpo neutralizante puede inhibir o reducir la activación de Wnt/ $\beta$ -catenina, Notch o Hedgehog mediante un anticuerpo agonista, tal como se determina, por ejemplo, en un ensayo de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, señalización de Notch o señalización de Hedgehog, u otros ensayos enseñados en el presente documento o conocidos en la técnica.

En algunos métodos, pueden usarse las proteínas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog para generar anticuerpos policlonales y monoclonales frente a proteínas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, que son útiles tal como se describe en el presente documento. Se usan varios inmunógenos para producir anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog. Los polipéptidos de longitud completa que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog son inmunógenos adecuados. Normalmente, el inmunógeno de interés es un péptido de al menos aproximadamente 3 aminoácidos, más normalmente el péptido tiene al menos 5 aminoácidos de longitud, el fragmento tiene al menos 10 aminoácidos de longitud y normalmente el fragmento tiene al menos 15 aminoácidos de longitud. Los péptidos pueden acoplarse a

una proteína portadora (por ejemplo, como una proteína de fusión), o se expresan de manera recombinante en un vector de inmunización. Los determinantes antigénicos en péptidos a los que se unen anticuerpos tienen normalmente de 3 a 10 aminoácidos de longitud. También pueden usarse polipéptidos que se producen de manera natural en forma o bien pura o bien impura. Los polipéptidos recombinantes se expresan en células eucariotas o procariontes y se purifican usando técnicas convencionales. El polipéptido, o una versión sintética del mismo, se inyecta entonces en un animal que puede producir anticuerpos. Pueden generarse anticuerpos o bien monoclonales o bien policlonales para su uso posterior en inmunoensayos para medir la presencia y la cantidad del polipéptido.

Estos anticuerpos encuentran uso en varias aplicaciones. Por ejemplo, los anticuerpos que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog pueden acoplarse a columnas de cromatografía de afinidad convencionales y usarse para purificar proteínas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog tal como se describe adicionalmente más adelante. Los anticuerpos también pueden usarse como polipéptidos de bloqueo, tal como se expuso antes, puesto que se unirán específicamente a la proteína que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog.

Los anticuerpos anti-proteína Wnt o anti-proteína  $\beta$ -catenina pueden comprender anticuerpos policlonales. Los expertos en la técnica conocen métodos para producir anticuerpos policlonales. En resumen, un inmunógeno, por ejemplo, un polipéptido purificado, un polipéptido acoplado a un portador apropiado (por ejemplo, GST y hemocianina de lapa californiana), o un polipéptido incorporado en un vector de inmunización tal como un virus vaccinia recombinante (véase, la patente estadounidense n.º 4.722.848) se mezcla con un adyuvante y se inmunizan animales con la mezcla. Se monitoriza la respuesta inmunitaria del animal a la preparación de inmunógeno mediante extracciones de sangre y determinando el título de reactividad al polipéptido de interés. Cuando se obtienen títulos de anticuerpo apropiadamente altos al inmunógeno, se recoge sangre del animal y se preparan antisueros. Se realiza el fraccionamiento adicional de los antisueros para que se enriquezcan en anticuerpos reactivos al polipéptido cuando se desee. Véanse, por ejemplo, Coligan, *Current Protocols in Immunology*, Wiley/Greene, NY, 1991; y Harlow y Lane, citado anteriormente.

Se producen anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión y versiones recombinantes monocatenarias de los mismos, frente a fragmentos predeterminados de proteínas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog inmunizando animales, por ejemplo, con conjugados de los fragmentos con proteínas portadoras tal como se describió anteriormente.

El término "respuesta de células inmunitarias" se refiere a la respuesta de las células del sistema inmunitario a estímulos externos o internos (por ejemplo, antígeno, citocinas, quimiocinas y otras células) que producen cambios bioquímicos en las células inmunitarias que dan como resultado migración de células inmunitarias, destrucción de células diana, fagocitosis, producción de anticuerpos, otros efectores solubles de la respuesta inmunitaria y similares.

"Respuesta inmunitaria" se refiere a la acción concertada de linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas y complemento) que da como resultado el daño selectivo para, la destrucción de o la eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas, rechazo de tejido alogénico, o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Otras técnicas adecuadas implican la selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en vectores de fagos o similares, por ejemplo, bibliotecas de Fv (scFv) monocatenarios. Véase, Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281, 1989; y Ward, *et al.*, *Nature* 341:544-546, 1989.

El protocolo descrito por Huse se vuelve más eficaz en combinación con la tecnología de presentación en fago. Véanse, por ejemplo, Dower *et al.*, documento WO 91/17271; McCafferty *et al.*, documento WO 92/01047; y las patentes estadounidenses n.ºs 5.871.907; 5.858.657; 5.837.242; 5.733.743; y 5.565.332.

En estos métodos, se producen bibliotecas de fagos en las que los miembros (paquetes de presentación) muestran diferentes anticuerpos sobre sus superficies externas. Los anticuerpos se presentan habitualmente como fragmentos Fv o Fab. Los fagos que presentan anticuerpos con una especificidad deseada pueden seleccionarse mediante enriquecimiento por afinidad del antígeno o fragmento del mismo. La presentación en fago combinada con animales no humanos transgénicos inmunizados que expresan genes de inmunoglobulinas humanas puede usarse para obtener anticuerpos específicos de antígeno incluso cuando la respuesta inmunitaria al antígeno es débil.

Además, pueden producirse inmunoglobulinas recombinantes. Véanse, la patente estadounidense n.º 4.816.567; y Queen *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86:10029-10033, 1989.

Brevemente, se insertan ácidos nucleicos que codifican para regiones variables de cadenas ligeras y pesadas, unidas opcionalmente a regiones constantes, en vectores de expresión. Las cadenas ligeras y pesadas pueden

clonarse en vectores de expresión iguales o diferentes. Los segmentos de ADN que codifican para cadenas de anticuerpo están operativamente unidos a secuencias de control en el/los vector(es) de expresión lo que garantiza la expresión de las cadenas de anticuerpo. Tales secuencias de control incluyen una secuencia señal, un promotor y un potenciador, y una secuencia de terminación de la transcripción. Los vectores de expresión normalmente pueden replicarse en los organismos huésped o bien como episomas o bien como una parte integral del cromosoma del huésped.

*E. coli* es un huésped procariota útil para expresar anticuerpos. Otros huéspedes microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia*, y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procariotas, también pueden obtenerse vectores de expresión, que normalmente contienen secuencias de control de la expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación) y secuencias reguladoras tales como un sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor del fago lambda.

También pueden usarse para la expresión otros microbios, tales como levaduras. *Saccharomyces* es un huésped, con vectores adecuados que tiene secuencias de control de la expresión, tales como promotores, que incluye la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee.

También puede usarse un cultivo celular de tejido de mamífero para expresar y producir los anticuerpos (véase Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., 1987). Las células eucariotas son útiles porque se han desarrollado varias líneas de células huésped adecuadas que pueden secretar anticuerpos intactos. Las células huésped adecuadas para expresar ácidos nucleicos que codifican para las inmunoglobulinas incluyen: la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293) (Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36:59, 1977); células de riñón de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:4216, 1980); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251, 1980); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón del mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL 1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); y, células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-46, 1982); células de baculovirus.

Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (por ejemplo, las secuencias que codifican para la cadena pesada y ligera y secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula huésped. Normalmente se utiliza la transfección con cloruro de calcio para células procariotas, mientras que puede usarse la electroporación o tratamiento con fosfato de calcio para otros huéspedes celulares. Véase generalmente Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 2ª ed., 1989.

Una vez expresados, pueden purificarse los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas de inmunoglobulina según procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares. Véase generalmente Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y., 1982. Las inmunoglobulinas sustancialmente puras tienen al menos una homogeneidad aproximadamente del 90 al 95%, y normalmente una homogeneidad del 98 al 99% o más.

Con frecuencia, los polipéptidos y anticuerpos se marcarán mediante unión, o bien covalente o bien no covalente, a una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conocen una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación y se notifican extensamente tanto en la bibliografía científica como en la de patentes. Por tanto, un anticuerpo usado para detectar un analito puede marcarse directamente con un resto detectable, o puede marcarse indirectamente, por ejemplo, uniendo al anticuerpo un anticuerpo secundario, es decir, marcado por sí mismo directa o indirectamente.

También se usan anticuerpos para cromatografía de afinidad en el aislamiento de proteínas que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog. Se preparan columnas, por ejemplo, con los anticuerpos unidos a un soporte sólido, por ejemplo, partículas, tales como agarosa, Sephadex o similares, en el que un lisado celular se hace pasar a través de la columna, se lava y se trata con concentraciones crecientes de un agente desnaturalizante suave, con lo que se liberan polipéptidos purificados que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog.

Dosificaciones eficaces

Las dosis eficaces de una composición de agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog para el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad inmunitaria, una enfermedad muscular degenerativa o una enfermedad neurodegenerativa, descrita en el presente documento varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo los medios de administración, el sitio diana, el estado

fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Es necesario valorar las dosificaciones de tratamiento para optimizar la seguridad y la eficacia.

5 Para la administración con un agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, la dosificación oscila entre aproximadamente 0,0001 y 100 mg/kg, y más habitualmente entre 0,01 y 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal, 10 mg/kg de peso corporal o 30 mg/kg de peso corporal, o pueden estar dentro del intervalo de 1-30 mg/kg de peso corporal. Una dosificación de tratamiento a modo de ejemplo con un inhibidor de GSK-3 es 30 mg/kg de peso corporal. Un régimen de tratamiento a modo de ejemplo implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada de 3 a 6 meses. En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, en cuyo caso la dosificación de cada agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog administrado se encuentra en los intervalos indicados. Pueden producirse múltiples administraciones de agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares tal como se indica midiendo los niveles en sangre del agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr un agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog enriquecido en plasma de 1-1000  $\mu$ g/ml y en algunos métodos de 25-300  $\mu$ /ml. Alternativamente, puede administrarse un agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la semivida del agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog en el paciente. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de su vida. En aplicaciones terapéuticas, en ocasiones se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina el avance de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.

#### Vías de administración

35 Las composiciones de un agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog para el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad inmunitaria, una enfermedad muscular degenerativa o una enfermedad neurodegenerativa, pueden administrarse por medios intraventriculares, intratecales, parenterales, tópicos, intravenosos, orales, inhalantes, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares. Como agente profiláctico/adyuvante o para el tratamiento de enfermedades, los agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog seleccionan como diana una enfermedad inmunitaria, diabetes, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de inmunodeficiencia, tumor maligno hematopoyético, insuficiencia hematopoyética, trasplante de células madre hematopoyéticas, o una enfermedad degenerativa muscular y/o tratamiento terapéutico. La vía de administración más típica de un agente inmunogénico es subcutánea o intravenosa aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces. La siguiente vía más común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza normalmente en músculos del brazo o la pierna. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde se han acumulado depósitos, por ejemplo inyección en la médula ósea. La inyección intramuscular o la infusión intravenosa se prefieren para la administración de un agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog.

50 Los agentes de la invención pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de diversas enfermedades incluyendo enfermedad inmunitaria, enfermedad muscular degenerativa o enfermedad neurodegenerativa.

#### 55 Formulación

Las composiciones de un agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog para el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad inmunitaria, una enfermedad muscular degenerativa o una enfermedad neurodegenerativa.

60 Las composiciones de un agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog para el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad inmunitaria, una enfermedad muscular degenerativa o una enfermedad neurodegenerativa, a menudo se administran como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo, y una variedad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase, por ejemplo, Alfonso R Gennaro (ed), Remington: The Science y Practice of Pharmacy, (anteriormente

Remington's Pharmaceutical Sciences) 20<sup>a</sup> ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2003. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica deseada. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, portadores o diluyentes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículo comúnmente usados para formular composiciones farmacéuticas para su administración a un animal o un ser humano. El diluyente se selecciona para que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Los ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la formulación o composición farmacéutica también puede incluir otros portadores, adyuvantes o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos) y copolímeros (tales como Sepharose™ funcionalizada con látex, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Adicionalmente, estos portadores pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes (es decir, adyuvantes).

Para la administración parenteral, las composiciones de la invención pueden administrarse como dosificaciones inyectables de una disolución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un portador farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceites, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en las composiciones sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias de tamponamiento del pH y similares. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles tales como el propilenglicol o el polietilenglicol son portadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Un agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog puede administrarse en forma de una inyección para liberación lenta o preparación de implante que puede formularse de tal manera que se permita una liberación sostenida del principio activo. Una composición a modo de ejemplo comprende un agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog a 5 mg/ml, formulado en tampón acuoso que consiste en L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado a pH 6,0 con HCl.

Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, o bien como suspensiones o bien como disoluciones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida, o copolímero para un efecto adyuvante potenciado, tal como se trató anteriormente. Langer, *Science*, 249:1527, 1990; Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28: 97-119, 1997. Los agentes de esta invención pueden administrarse en forma de una inyección para liberación lenta o preparación de implante que puede formularse de tal manera que se permita una liberación sostenida o pulsátil del principio activo.

Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas.

Para los supositorios, los elementos de unión y los portadores incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo del 0,5% al 10%, preferiblemente el 1%-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones adoptan la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen un 10%-95% de principio activo, preferiblemente un 25%-70%.

La aplicación tópica puede dar como resultado la administración transdérmica o intradérmica. La administración tópica puede facilitarse mediante la coadministración del agente con toxina colérica o derivados detoxificados o subunidades de los mismos u otras toxinas bacterianas similares. Glenn, *et al.*, *Nature*, 391: 851, 1998. La coadministración puede lograrse usando los componentes como mezcla o como moléculas unidas obtenidas mediante reticulación química o expresión como una proteína de fusión.

Alternativamente, la administración transdérmica puede lograrse usando un parche cutáneo o usando transferosomas. Paul, *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 25: 3521-24, 1995; Cevc, *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1368: 201-15, 1998.

Las composiciones farmacéuticas comprenden generalmente una composición del agente enriquecido que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog en una forma adecuada para la administración a un paciente. Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente como estériles, sustancialmente isotónicas y cumpliendo completamente con todos los reglamentos de las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) de la Food y Drug Administration de los Estados Unidos.

## Toxicidad

Preferiblemente, una dosis terapéuticamente eficaz de una composición del agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog descrita en el presente documento proporcionará un beneficio terapéutico sin producir toxicidad sustancial.

La toxicidad del agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog descrita en el presente documento puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población) o la DL<sub>100</sub> (la dosis letal para el 100% de la población). La razón de dosis entre el efecto tóxico y el terapéutico es el índice terapéutico. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivo celular y estudios con animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación que no sea tóxico para su uso en seres humanos. La dosificación del agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog descrita en el presente documento se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la dosis eficaz con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. El médico individual puede escoger la formulación, vía de administración y dosificación exactas en vista del estado del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl, *et al.*, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ch. 1, 1975).

## Kits

También dentro del alcance de la invención están los kits que comprenden las composiciones (por ejemplo, un agente que promueve la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog) de la invención e instrucciones para su uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional, o uno o más anticuerpos humanos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno distinto del primer anticuerpo humano). Los kits normalmente incluyen una etiqueta que indica el uso pretendido del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o grabado suministrado sobre o con el kit, o que se adjunta de otro modo al kit.

Otras realizaciones y usos resultarán evidentes para un experto en la técnica a la luz de la presente descripción.

## Realizaciones a modo de ejemplo

## EJEMPLO 1

La administración de inhibidor de GSK-3 a receptores sometidos a trasplante con HSC aumenta la función de HSC de donante *in vivo*

Las HSC poseen capacidad de repoblación hematopoyética de múltiples linajes *in vivo* tras el trasplante intravenoso en ratones receptores. Morrison y Weissman, *Immunity* 1:661-73, 1994. Tal como se ilustra en la figura 1a, se aislaron HSC de ratones GFP/FVB silvestres y se trasplantaron en ratones receptores tratados con o sin inhibidor de GSK-3. Se evaluó la actividad de HSC *in vivo* mediante la repoblación de múltiples linajes (GFP+) de donante en receptores. Sólo la subpoblación Lin-Kit+Sca-1+ de células de médula ósea pudo injertarse en ratones NOD-SCID sometidos a irradiación subletal (figuras 1i, 1j y 1k), lo que indica que el trasplante en receptores NOD-SCID detecta exclusivamente células hematopoyéticas primitivas. Dado que se ha demostrado que la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 (CHIR-911) potencia la eliminación de glucosa en modelos de roedor de diabetes tipo 2, se identificó que una dosis optimizada de 30 mg/kg de inhibidor de GSK-3 permitía la distribución tisular periférica del inhibidor, mientras que se mantenía un estado normoglicémico en los receptores sometidos a trasplante (figura 1b). Ring *et al.*, *Diabetes* 52:588-595, 2003; Cline *et al.*, *Diabetes* 51:2903-2910, 2002.

La capacidad funcional de repoblación de HSC de donante aumentó en más del 22,5% en ratones tratados con inhibidor de GSK-3 (figura 1c). El número total de células GFP+ de donante en los ratones receptores también fue mayor tras la administración de inhibidor de GSK-3 *in vivo* (figura 1c, inserto), lo que indica la potenciación robusta de la reconstitución proliferativa de HSC. Se examinaron células GFP+ derivadas de donante que resultaron de las HSC trasplantadas (figura 1d, separadas R1) mediante citometría de flujo para detectar marcadores de superficie que representan los linajes primitivo (c-Kit+ Sca-1+), mieloide (CD45+ CD11b+), eritroide (CD45- Ter119+), de células B (CD45+ B220+) y de células T (CD45+ CD3+) lo que indica la reconstitución de HSC de donante de múltiples linajes. Los receptores tratados con o sin inhibidor de GSK-3 contenían células derivadas de donante de múltiples linajes similares, indicativo de la función de HSC (figura 1d, representativa). El programa de desarrollo de HSC no resultó afectado por el inhibidor de GSK-3, tal como se observa por la frecuencia similar de tipos celulares reconstituyentes en los ratones tratados con inhibidor de GSK-3 en comparación con receptores tratados con control (figura 1c). Estos resultados demuestran que la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 a receptores sometidos a trasplante con HSC puede aumentar de manera robusta la función de las HSC trasplantadas.

Para examinar adicionalmente la utilidad potencial de la administración del inhibidor de GSK-3 sobre las propiedades de reconstitución de HSC trasplantadas, se analizó la recuperación de recuentos en sangre periférica. En ratones

sometidos a trasplante que recibieron tratamiento con inhibidor de GSK-3, los números de neutrófilos en sangre GFP+ (CD13<sup>+</sup>) (figura 1f) y megacariocitos (CD41<sup>+</sup>) (figura 1g) de donante aumentaron de manera notable a las 2 y 4 semanas tras el trasplante, lo que sugiere que la administración de inhibidor de GSK-3 potencia la recuperación citopénica. Para evaluar los efectos del inhibidor de GSK-3 sobre la actividad sostenida a largo plazo de HSC, se evaluó la cinética de reconstitución de HSC de donante a las 6, 8 y 11 semanas tras el trasplante. El tratamiento con inhibidor de GSK-3 pudo sostener la repoblación hematopoyética de múltiples linajes potenciada durante hasta 11 semanas tras el trasplante con tan solo 25.000 y hasta 250.000 células Lin<sup>-</sup> (figura 1h). La composición de células maduras en el injerto hematopoyético permaneció sin cambios. Estas observaciones indican que la administración de un inhibidor de GSK-3 puede mejorar la recuperación de neutrófilos y megacariocitos a corto plazo, y potenciar la capacidad de repoblación hematopoyética a largo plazo sostenida *in vivo*, independientemente del número de HSC trasplantadas.

La figura 1 muestra que la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 aumenta la capacidad de despoblación de HSC silvestre. (a) Ilustración esquemática del diseño experimental para someter a prueba los efectos de la administración *in vivo* del inhibidor de GSK-3, CHIR-911, sobre la capacidad de repoblación de múltiples linajes de HSC GFP/FVB en ratones receptores. (b) Niveles de glucosa en sangre periférica de los ratones receptores tras la administración *in vivo* en 5 semanas de inhibidor de GSK-3 30 mg/kg o control con vehículo. Las barras de error representan EEM (n=6). (c) Porcentaje de células derivadas de donante GFP+ en la médula ósea de ratones receptores tratados *in vivo* con inhibidor de GSK-3 o control con vehículo. Cada símbolo ( ) representa el porcentaje de células derivadas de donante en un único ratón sometido a trasplante. Las líneas horizontales representan el nivel promedio de repoblación de HSC para cada tratamiento (n=7) \*p<0,05. (d) Análisis representativo de diferenciación de múltiples linajes de HSC GFP+. Se separaron (R1) células GFP+ derivadas de donante de repoblación y se analizaron para determinar la presencia de marcadores de superficie que representan los linajes primitivo (c-kit+sca-1+), mielóide (CD45+CD11b+), eritroide (CD45-Ter119+), de células B (CD45+B220+) y de células T (CD45+CD3+). (e) Frecuencia promedio de células GFP+ derivadas de donante primitivas, mieloides, eritroides, células B y células T en ratones receptores tras la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 o control con vehículo. Las barras de error representan EEM (n=6). Figura 1(f). Neutrófilos GFP+ derivados de donante totales en sangre periférica de ratones receptores a las 2 y 4 semanas tras el trasplante. Las barras de error representan EEM (n=4) \*P<0,05. (g) Megacariocitos GFP+ derivados de donante totales en sangre periférica de ratones receptores a las 2 y 4 semanas tras el trasplante. Las barras de error representan EEM (n=4) \*P<0,05. (h) Número total de células derivadas de donante GFP+ en la médula ósea de ratones receptores sometidos a trasplante con 25.000 ó 250.000 células BM Lin<sup>-</sup>, tratadas con inhibidor de GSK-3 o control con vehículo durante 6-11 semanas tras el trasplante. Cada círculo representa un único ratón sometido a trasplante. Figura 1i. Capacidad progenitora (CFU) y actividad de repoblación de NOD/SCID de subconjuntos primitivos de médula ósea de ratón. Se clasificaron células de médula ósea de linaje reducido (Lin<sup>-</sup>) procedentes de ratones GFP/FVB mediante FACS basándose en la expresión de c-Kit y Sca-1, aislando la población Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> más primitiva y las "restantes" distintas de c-Kit+Sca-1+ de las células Lin<sup>-</sup>. (j) Capacidad progenitora total (CFU) de 2.500 ó 100.000 de las células "restantes" Lin<sup>-</sup>, o 2.500 células Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>. Las barras de error representan EEM (n=6). (k) Frecuencia de células derivadas de donante GFP+ en la médula ósea de ratones receptores NOD/SCID sometidos a irradiación subletal sometidos a trasplante con 2.500-3.000 o >100.000 células "restantes" Lin<sup>-</sup>, o 2.500-3.000 células Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>. Las barras de error representan EEM (n=13).

## EJEMPLO 2

La administración de inhibidor de GSK-3 aumenta la capacidad de las HSC de adulto y de neonato humanas *in vivo*

Se examinaron los efectos del inhibidor de GSK-3 sobre HSC humanas utilizando un modelo *in vivo* preclínico establecido de la función de HSC humanas. Se ha demostrado que el trasplante intravenoso de un único subconjunto de células hematopoyéticas humanas primitivas repuebla y sostiene la reconstitución hematopoyética humana en la médula ósea de ratones receptores NOD/SCID con sistema inmunitario deficiente. Esta población de reconstitución de células hematopoyéticas humanas se define operativamente como células repobladoras de ratones Scid (SRC), y por consiguiente representa HSC humanas candidatas. Larochelle *et al.*, Nat Med 2:1329-37, 1996; Bhatia *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 94:5320-5325, 1997; Bhatia *et al.*, Nat Med 4:1038-45, 1998.

Se trasplantaron células de neonato de sangre de cordón umbilical (CB) de linaje reducido (Lin<sup>-</sup>) primitivas, o células mononucleares de adulto de sangre periférica movilizada (M-PB), en receptores sometidos a irradiación subletal a los que se les habían administrado inhibidor de GSK-3 30 mg/kg o vehículo (figura 2a). Se examinó la capacidad de repoblación de múltiples linajes humana de las HSC trasplantadas mediante citometría de flujo para determinar marcadores de superficie que representan los subconjuntos hematopoyéticos humanos linfóide (CD19, CD20), mielóide (CD15, CD33) y primitivo (CD34, CD38). Se encontró que todos los receptores reconstituidos contenían células derivadas de donante humanas de múltiples linajes indicativas de la función de HSC humanas (figura 2b).

La administración del inhibidor de GSK-3 aumentó la frecuencia (figura 2c) y el número total (figura 2d) de células hematopoyéticas humanas primitivas (CD45+CD34+) a partir de CB-HSC en comparación con los receptores tratados con control, lo que indica que la capacidad de las HSC humanas *in vivo* estaba aumentada por el inhibidor de GSK-3. Para caracterizar adicionalmente el efecto de GSK-3 sobre la capacidad de las HSC humanas primitivas,

se determinó el potencial progenitor usando ensayos clonogénicos funcionales o unidades formadoras de colonias (CFU) hematopoyéticas humanas derivadas de HSC (HSC-CFU). Murdoch *et al.*, PNAS 100:3422-3427, 2003. Usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), se aislaron células hematopoyéticas CD45+ humanas de ratones NOD/SCID receptores reconstituidos con células humanas tratados con o sin inhibidor de GSK-3 para cuantificar el potencial de HSC-CFU. Tanto las células derivadas de donante humanas CB-HSC como las MPB-HSC aisladas de receptores tratados con inhibidor de GSK-3 dieron lugar a mayores números de HSC-CFU (figura 2e). El potencial de desarrollo de progenitores de HSC-CFU (basándose en el análisis de subtipo de colonias eritroides, de granulocitos, macrófagos, granulocitos-macrófagos) no se alteró por el tratamiento con inhibidor de GSK-3. En combinación con los efectos del inhibidor de GSK-3 sobre las HSC de ratón reconstituyentes (figura 1), estos datos indican que GSK-3 es un potente regulador de HSC de mamífero sometido a trasplante.

La figura 2 muestra que la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 aumenta la capacidad de HSC humanas de adulto y de neonato. (a) Ilustración esquemática del diseño experimental para someter a prueba los efectos de la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 sobre la frecuencia de células progenitoras hematopoyéticas humanas y la función progenitora tras la repoblación de HSC humanas de neonato de sangre de cordón umbilical (CB) o de adulto de sangre periférica movilizada (MPB) en ratones receptores. (b) Análisis representativo de la repoblación de células hematopoyéticas humanas derivadas de CB de múltiples linajes en ratones receptores. Se separaron células CD45+ humanas de repoblación (R1) y se analizaron para determinar la presencia de los linajes de células B (CD19, CD20), mieloide (CD15, CD33) y primitivo (CD34, CD38). (c) Análisis representativo de la frecuencia de células CD34+ dentro del injerto derivado de donante CB CD45+ humano. (d) Número promedio de progenitores derivados de CB humanos (CD34+) en ratones receptores tras la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 o control con vehículo. \* $p < 0,05$ . Las barras de error representan EEM ( $n=4$ ). (e) Progenitores humanos totales (CFU) aislados de HSC reconstituyentes derivadas de CB o derivadas de MPB (inserto) tras el tratamiento *in vivo* con inhibidor de GSK-3 o control con vehículo. Cada símbolo ( ) representa capacidad de CFU de las células humanas aisladas de un único ratón sometido a trasplante. Las líneas horizontales representan el nivel promedio de injerto para cada receptor. \* $p < 0,05$ ,  $n=7$ .

### EJEMPLO 3

El inhibidor de GSK-3 expande los progenitores pero retiene HSC

Dados los efectos del tratamiento con inhibidor de GSK-3 sobre HSC de ratón y humanas sometidas a ensayo en el modelo de reconstitución de NOD-SCID (figuras 1, 2), se caracterizó la base de la repoblación potenciada. Se evaluaron los efectos de la inhibición de GSK-3 sobre el compartimento hematopoyético primitivo en ratones sometidos a trasplante primario analizando la frecuencia de células hematopoyéticas fenotípicamente primitivas ( $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^+$ ) y progenitores hematopoyéticos funcionales (CFU) (figura 3a). Se evaluó la frecuencia de células primitivas  $\text{Linc-Kit}^+ \text{Sca-1}^+$  en ratones tratados con inhibidor de GSK-3 o control con vehículo mediante citometría de flujo a las 6 (figura 3b), 8 y 11 semanas tras el trasplante. Los ratones receptores tratados con inhibidor de GSK-3 mostraron mayores números de células GFP+ de donante primitivas hasta 11 semanas tras el trasplante (figura 3c). Las células GFP+ de donante aisladas de ratones tratados con inhibidor de GSK-3 dieron lugar a números significativamente mayores ( $P < 0,05$ ) de HSC-CFU (figura 3d), lo que indica que el tratamiento con inhibidor de GSK-3 aumenta la capacidad progenitora.

Los resultados indican que el efecto regulador del tratamiento con inhibidor de GSK-3 afecta preferiblemente al compartimento hematopoyético primitivo. Puesto que la recuperación de las células en sangre circulante normalmente se retrasa tras el trasplante de HSC altamente purificadas en ausencia de células accesorias cotrasplantadas, se evaluó el beneficio biológico de la administración de inhibidor de GSK-3 durante este proceso. El tratamiento con inhibidor de GSK-3 aumentó la supervivencia de ratones receptores sometidos a trasplante con 1.000 células  $\text{Linc-Kit}^+ \text{Sca-1}^+$  (figura 3e) y redujo el número de días necesarios para lograr niveles normales de neutrófilos y megacariocitos circulantes (figura 3e, insertos). En ausencia de HSC de ratón sometido a trasplante, los ratones irradiados que recibieron inhibidor de GSK-3 mostraron supervivencia potenciada en comparación con los ratones tratados con control (figura 3i), lo que apoya la idea de que la administración del inhibidor puede tener un efecto protector frente a la mortalidad inducida por radiación actuando también sobre las células progenitoras o madre endógenas que resisten al ataque con irradiación. Juntos, estos resultados establecen que el tratamiento con inhibidor de GSK-3 potencia la supervivencia y reduce el número de días de citopenia, lo que sugiere fuertemente que la administración de inhibidor de GSK-3 puede ser clínicamente útil en acelerar la recuperación a corto plazo durante el trasplante de HSC.

Para examinar los efectos del tratamiento con inhibidor de GSK-3 sobre la capacidad de repoblación de HSC en ausencia de tratamiento continuado, se trasplantaron células GFP+ de donante aisladas de animales tratados con inhibidor de GSK-3 o control en receptores secundarios no tratados. La capacidad de repoblación en receptores secundarios no resultó afectada por el tratamiento de los receptores primarios con inhibidor de GSK-3 (figura 3f, 3g). Las HSC que se injertaron en receptores secundarios tuvieron capacidad de reconstitución de múltiples linajes y no se observó diferencia en los números de células  $\text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^+$  primitivas generadas (figura 3h). Puesto que la capacidad de repoblación secundaria fue comparable, se sugiere que la reconstitución aumentada depende de la administración continuada de inhibidor de GSK-3 y no induce la expansión de HSC, sino que más bien potencia la

producción de progenitores mientras mantiene el conjunto de HSC.

La figura 3 muestra que la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 expande un subconjunto de células Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> con capacidad progenitora, pero no el potencial de reconstitución secundaria. (a) Diseño experimental para someter a prueba los efectos de la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 en ratones sometidos a trasplante primario sobre la frecuencia de células Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> primitivas, la función de las células progenitoras (CFU) y la capacidad de repoblación secundaria. (b) Análisis representativo de la expresión de c-Kit, Sca-1 en células derivadas de donante GFP+ a las 6 semanas tras el trasplante. (c) Número total de células Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> de donante primitivas en ratones receptores a las 6-11 semanas tras el tratamiento con inhibidor de GSK-3 o control con vehículo. Cada círculo representa un único ratón sometido a trasplante. (d) Progenitores hematopoyéticos totales (CFU) aislados de células reconstituyentes GFP+ de donante tras el tratamiento con inhibidor de GSK-3 o control con vehículo. Las barras de error indican EEM (n=7) \*P<0,05. (e) Curva de supervivencia que indica el porcentaje de ratones sometidos a trasplante que sobreviven totales que han recibido 1.000 células Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> purificadas y se han tratado con inhibidor de GSK-3 (-) o control con vehículo (-). Se evaluaron los números totales de neutrófilos y megacariocitos en sangre periférica en ratones sometidos a trasplante (inserto). n=13. Se establecieron recuentos de células periféricas normales en ratones NOD/SCID no tratados (n=3) y se calcularon los niveles citopéticos como el 20% de lo normal. (f) Porcentaje de células derivadas de donante GFP+ en ratones receptores secundarios, tratados en trasplantes primarios con inhibidor de GSK-3 o control con vehículo. Cada círculo representa un único ratón sometido a trasplante. Las líneas horizontales representan el nivel promedio de repoblación de donante para cada tratamiento (n=7). (g) Células derivadas de donante GFP+ totales en ratones receptores secundarios. Las barras de error representan EEM (n=7). (h) Composición de múltiples linajes de GFP+ de donante promedio en ratones receptores secundarios. Las barras de error representan EEM (n=7). Figura 3i. Administración de inhibidor de GSK-3 y supervivencia tras la irradiación subletal en ausencia de HSC de ratón sometido a trasplante. Se sometieron ratones NOD/SCID a irradiación subletal y se les administró inhibidor de GSK-3 30 mg/kg o control con vehículo (captisol) mediante inyección intraperitoneal dos veces por semana durante 6 semanas. Se monitorizó a los ratones diariamente y se calculó la supervivencia como la frecuencia de ratones irradiados totales (n=15 tratados con inhibidor de GSK-3, n=13 tratados con control).

#### EJEMPLO 4

El inhibidor de GSK-3 aumenta la frecuencia y la función de HSC, y modula específicamente las rutas de Wnt, Hedgehog y Notch de HSC *in vivo*

Se ha mostrado que GSK-3 está implicado en la ruta de señalización de Wnt y se ha mostrado que afecta a HSC humanas y de ratón. Behrens *et al.*, Science 280:596-599, 1998; Yost *et al.*, Genes Dev 10:1443-1454, 1996; Murdoch *et al.*, PNAS 100:3422-3427, 2003; Reya *et al.*, Nature 423:409-14, 2003. Usando ratones transgénicos con un promotor de LEF-1/TCF ("promotor óptimo de TCF") que dirige la expresión de β-galactosidasa (TOP-gal), se examinaron los efectos de la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 sobre la frecuencia y la función de HSC y se examinó el efecto sobre la ruta de Wnt. DasGupta y Fuchs, Development 126:4557-4568, 1999. Ratones transgénicos TOP-gal tratados 3 veces cada 12 horas con inhibidor de GSK-3 30 mg/kg demostraron un aumento en la frecuencia de HSC (Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>), en comparación con el tratamiento con control (figura 4b). Uchida y Weissman, J Exp Med 175:175-84, 1992. Además, células de médula ósea primitivas (Lin<sup>-</sup>) aisladas de ratones TOP-gal tratados con inhibidor de GSK-3 revelaron un aumento mayor del 50% en la capacidad progenitora clonogénica (CFU), en comparación con los animales tratados con control (figura 4c). Estas observaciones indican que el efecto de la administración de inhibidor de GSK-3 *in vivo* no se limita a las HSC trasplantadas, sino que también puede afectar directamente a la función de HSC en huéspedes no sometidos a ablación en los que las HSC permanecen en su entorno de médula ósea nativo.

Para aclarar la base celular para el efecto del inhibidor de GSK-3 sobre la función de repoblación potenciada, se comparó la frecuencia, capacidad progenitora y estado del ciclo de las células dentro del compartimento de Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> primitivas (figura 4a). Los ratones tratados 3 veces a lo largo de 36 h con inhibidor de GSK-3 30 mg/kg (CHIR-911) mostraron un aumento en la frecuencia (figura 4b) y el número total (figura 4c) de células Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>, y un aumento mayor del 50% en la capacidad de CFU (figura 4c), en comparación con los ratones tratados con control. El análisis de la apoptosis y el ciclo celular de las células Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> indicó que el tratamiento con inhibidor de GSK-3 no afectó a la frecuencia de células primitivas que experimentan apoptosis (figura 4i), pero aumentó significativamente el número de células primitivas que experimentan división mitótica, tal como se determinó mediante la incorporación de BrdU (células BrdU<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>) (figura 4j). Además, la frecuencia de ciclo (S o G2/M), en comparación con células primitivas que no entran en ciclo (G0 o G1) aumentó mediante el tratamiento *in vivo* de inhibidor de GSK-3 (figura 4k). Consecuente con la expansión observada de células Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> (figura 4c), estos datos sugieren que la administración de inhibidor de GSK-3 promueve directamente la proliferación y la expansión global de células primitivas para potenciar la actividad de repoblación hematopoyética *in vivo*.

Para determinar si la señalización de Wnt en HSC resultaba afectada por la administración del inhibidor de GSK-3, se usó el nivel de expresión de β-galactosidasa para evaluar la activación de Wnt en HSC tratadas aisladas de ratones TOP-gal usando citometría de flujo y tinción intracelular con di-β-D-galactopiranosido de fluoresceína (FDG).

Se muestran los controles de tinción negativos y positivos (figura 4d). Tras el tratamiento *in vivo* con inhibidor de GSK-3, aumentó la señalización de Wnt en HSC en hasta el 28% (figuras 4e, 4f). Por el contrario, la señalización de Wnt no resultó afectada significativamente en subconjuntos hematopoyéticos más maduros (Lin<sup>+</sup> Sca-1<sup>-</sup>) (figura 4f), el efecto específico de la administración de inhibidor de GSK-3 sobre la señalización de Wnt dentro de HSC. Para

5 caracterizar adicionalmente los efectos del inhibidor de GSK-3 sobre la ruta de Wnt, se examinaron los genes diana regulados por Wnt, Axin2 y CyclinD1, mediante PCR cuantitativa en tiempo real en aislados de HSC altamente purificados (figura 4g). Yan *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 98:14973-8, 2001; Jho *et al.*, Mol Cell Biol 22:1172-83, 2002; Issack y Ziff, Cell Growth Differ 9:837-45, 1998. Axin2 se reguló por disminución 1,5 veces, mientras que CyclinD1 se reguló por incremento 2,5 veces tras el tratamiento *in vivo* con inhibidor de GSK-3, en comparación con

10 las HSC purificadas tratadas con control (figura 4h), apoyando adicionalmente la acción *in vivo* del tratamiento con inhibidor de GSK-3 sobre dianas de la ruta de Wnt en HSC. Este perfil de regulación génica sugiere que la inhibición de GSK-3 activa la ruta de Notch en el compartimento hematopoyético primitivo, a diferencia de la represión aparente de la ruta de Hedgehog.

15 Además de modular la ruta de Wnt, GSK-3 se ha asociado con la señalización de Notch y de Hedgehog implicadas también ambas en la auto-renovación de HSC. Foltz *et al.*, Curr Biol 12:1006-1011, 2002; Espinosa *et al.*, J Biol Chem 278:32227-35, 2003; Bhardwaj *et al.*, Nat Immunol 2:172-80, 2001; Dyer *et al.*, Development 128:1717-30, 2001; Jia *et al.*, Nature 416:548-552, 2002; Karanu *et al.*, J Exp Med 192:1365-72, 2000; Karanu *et al.*, Blood 97:1960-7, 2001; Varnum-Finney *et al.*, Nat Med 6:1278-81, 2000. Para investigar más ampliamente los efectos

20 potenciales de la inhibición de GSK-3 sobre estas rutas, se examinaron cuantitativamente la expresión de la diana génica regulada por Notch, Hes1, y las dianas génicas de la ruta de Hedgehog, Gli3 y Patched1 (Ptc1), en HSC purificadas derivadas de ratones TOP-gal tratados con inhibidor de GSK-3. Jarriault *et al.*, Nature 377:355-8, 1995; Marigo *et al.*, 180 1:1996; Marigo y Tabin, Proc Natl Acad Sci USA 93: 9346-9351, 1996. La expresión de Hes1 aumentó, mientras que la de Gli3 aumentó 2,5 veces, y la expresión de Ptc1 se reguló por disminución 1,5 veces

25 tras el tratamiento con inhibidor de GSK-3 (figura 4h). Este perfil de regulación génica sugiere que la inhibición de GSK-3 activa la ruta de Notch, a diferencia con la represión aparente de la ruta de Hedgehog en HSC.

La figura 4 muestra que la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 a ratones TOP-gal potencia la actividad de HSC y regula las dianas de las rutas de Wnt, Notch y Hedgehog. (a) Ilustración esquemática del diseño experimental

30 que utiliza ratones transgénicos TOP-gal para someter a prueba los efectos de la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 sobre la frecuencia de HSC, la activación de la señalización de Wnt, y la función progenitora medidas en un ensayo de unidades formadoras de colonias hematopoyéticas (CFU) *in vitro*. (b) Frecuencia de HSC tras la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 o control con vehículo. \*p<0,05, ± representa EEM (n=3). (c) Capacidad progenitora hematopoyética de células hematopoyéticas primitivas (Lin<sup>-</sup>) tras la administración *in vivo* de inhibidor de

35 GSK-3 o control con vehículo. Las barras de error representan EEM (n=3). (d) Establecimiento de un ensayo de citometría de flujo para β-galactosidasa usando tinción con FDG intracelular. Histogramas que muestran intensidad de fluorescencia media (MFI) de FDG para células de médula ósea no teñidas y células de médula ósea ROSA26 teñidas. (e) Histogramas representativos que muestran la activación de Wnt en HSC tras la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 o control con vehículo, medida mediante MET de FDG. (f) Activación de la señalización de Wnt

40 en HSC y linajes hematopoyéticos maduros (Lin<sup>+</sup> Sca-1<sup>-</sup>), tras la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 o control con vehículo. \*p<0,05, las barras de error representan EEM (n=4). (g) Gráficos de amplificación por PCR en tiempo real para Axin2, CyclinD1, Hes1, Gli3, Ptc1, y GAPDH a partir de HSC de ratón silvestre, aisladas *de novo*. Gráficos representativos para el aislamiento de células Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>ca-1<sup>+</sup> tras el tratamiento a corto plazo con inhibidor de GSK-3. (h) Expresión relativa de Axin2, CyclinD1, Hes1, Gli3, y Ptc1 en HSC de TOP-gal tras la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3, con respecto a control con vehículo. Los duplicados se promediaron tras la normalización a niveles del gen de mantenimiento GAPDH. Las barras de error representan EEM (n=3). (i) La

45 administración a corto plazo *in vivo* de inhibidor de GSK-3 expande y aumenta el ciclo de las células Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> primitivas. Gráfico representativo y frecuencia promedio de células (anexina V) Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> vivas tras la administración de inhibidor de GSK-3 o control con vehículo. Las barras de error representan EEM (n=4). (j) Frecuencia promedio de células Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> que incorporan BrdU tras la administración de inhibidor de GSK-3 o control con vehículo. Las barras de error representan EEM (n=4) \*P<0,05. (k) Gráfico representativo y frecuencia promedio de células Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> en fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular tras la administración de inhibidor de GSK-3 o control con vehículo. Las barras de error representan EEM (n=4) \*P<0,05.

55 Debido a los efectos opuestos sobre las rutas de Notch y Wnt frente a la ruta de Hedgehog, se caracterizó adicionalmente la regulación de Hedgehog *in vivo* usando HSC de ratones transgénicos Ptc1<sup>+/-lacZ</sup> que tienen una copia de Patched1 (Ptc1) sustituida con una secuencia codificante de lacZ (figura 5a). Goodrich *et al.*, Science 277:1109-1113, 1997. De manera similar a los ratones TOP-gal, la administración de inhibidores de GSK-3 *in vivo* dio como resultado un aumento significativo en los progenitores hematopoyéticos en comparación con los ratones

60 Ptc1<sup>+/-lacZ</sup> tratados con control (figura 5b). La composición de los progenitores clonogénicos detectados (representados por tipos de colonia de linaje eritroide, de granulocitos-macrófagos bipotente y mixto pluripotente) no resultó afectada por el tratamiento con inhibidor de GSK-3, en comparación con el tratamiento con control (figura 5b), lo que indica que el potencial progenitor no resultó afectado por el inhibidor de GSK-3. La administración de inhibidor de GSK-3 *in vivo* dio como resultado un aumento del 16% en la frecuencia de HSC en comparación con los

65 ratones tratados con control (figura 5c). Sin embargo, la propia ruta de Hedgehog disminuyó significativamente en HSC expandidas derivadas de ratones tratados con inhibidor de GSK-3, pero no resultó afectada en células

hematopoyéticas más abundantes y maduras (Lin+Sca-1-) (figura 5d). La especificidad de la regulación por el inhibidor de GSK-3 de HSC Ptc1<sup>+/-lacZ</sup> es similar a la observada en ratones TOP-gal usados como indicadores de la señalización de Wnt (figura 4f). Tomados juntos, estos resultados sugieren que la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 modula las señales de Wnt, Hedgehog y Notch posteriores en HSC, y aumenta la frecuencia y la función de HSC en su entorno nativo.

La figura 5 muestra que la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 a ratones Ptc1<sup>+/-lacZ</sup> potencia la actividad de HSC y disminuye las dianas de señalización de Hedgehog. (a) Ilustración esquemática del diseño experimental para someter a prueba los efectos de la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 a ratones Ptc1<sup>+/-lacZ</sup> sobre la función progenitora (CFU), la frecuencia de HSC y la activación de la señalización de Hedgehog. (b) Capacidad progenitora hematopoyética de células hematopoyéticas primitivas (Lin-) tras la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 o control con vehículo. \*p<0,05, las barras de error representan EEM (n=3). Los subtipos de colonias hematopoyéticas (BFU-E, GM-CTC, GEMM-CFC) se presentan como un porcentaje de CFU totales. Las barras de error representan EEM (n=3). (c) Frecuencia de HSC tras la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 o control con vehículo. ± representa EEM (n=3). (d) Activación de Hedgehog en HSC y linajes hematopoyéticos maduros (Lin+ Sca-1-), tras la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 o control con vehículo. \*\*p<0,01, las barras de error representan EEM (n=3).

#### EJEMPLO 5

El aislamiento de HSC y el cultivo *in vitro* demuestra que el inhibidor de GSK-3 actúa directamente sobre las HSC y modula las dianas de las rutas de Wnt, Hedgehog y Notch

Estudios recientes han caracterizado el microentorno de HSC, indicando que la perturbación genética del nicho de HSC a través de sistemas transgénicos puede tener profundos efectos sobre la regulación de HSC. Calvi *et al.*, Nature 425:841-6, 2003. Puesto que la administración de inhibidor de GSK-3 afecta a las HSC *in vivo*, es posible que los inhibidores de GSK-3 actúen sobre el microentorno de HSC para provocar su efecto sobre la función de HSC indirectamente a través de las células en el nicho de HSC. Para abordar esta posibilidad, se aislaron HSC de ratones GFP/FVB y C57BL/6 y se trataron con inhibidor de GSK-3 *in vitro*, eliminando de ese modo cualquier posible efecto indirecto del microentorno de la médula ósea. El inhibidor de GSK-3 aumentó significativamente la proliferación celular total de HSC GFP/FVB purificadas en 1,5 veces y de HSC C57BL/6 en 3 veces (figura 6a), en comparación con las HSC tratadas con control. La frecuencia de células expandidas que mantienen el fenotipo de HSC (c-Kit+Sca-1+) resultó afectada de manera similar (figura 6a). Además, el tratamiento directo de HSC GFP/FVB y C57BL/6 con inhibidor de GSK-3 demostró aumentos significativos en la capacidad de CFU total (figura 6b), similar a los efectos en la administración *in vivo* de GSK-3 (figuras 1-4).

Para examinar si las rutas de Wnt, Notch y Hedgehog se modulaban por el tratamiento con inhibidor de GSK-3 en ausencia del microentorno de la médula ósea, se trataron células Lin<sup>-</sup>-Kit<sup>+</sup>-Sca-1<sup>+</sup> purificadas con inhibidor de GSK-3 (CHIR-911 o CHIR-837) durante 24 h o 9 d, y se examinaron cuantitativamente las dianas génicas de Wnt, Hedgehog y Notch en células Lin<sup>-</sup>-Kit<sup>+</sup>-Sca-1<sup>+</sup> purificadas de nuevo a partir de cultivos tratados y no tratados (figuras 6c, 6d). Tras 24 h de estimulación con inhibidor de GSK-3, se modularon los genes diana de Wnt, Notch y Hedgehog, lo que indica la regulación por incremento de las tres rutas de señalización en células Lin<sup>-</sup>-Kit<sup>+</sup>-Sca-1<sup>+</sup> (figura 6c). Tras el cultivo de 9 días con inhibidor de GSK-3 (figura 6d), los genes diana en células Lin<sup>-</sup>-Kit<sup>+</sup>-Sca-1<sup>+</sup> aisladas de nuevo mostraron una regulación por incremento similar de la señalización de Wnt y de Notch, pero una regulación por disminución de las dianas de Hedgehog (figura 6d). La regulación de las rutas tras 9 d de tratamiento con inhibidor de GSK-3 *in vitro* estuvo de acuerdo con el efecto *in vivo* de la administración de inhibidor de GSK-3 en células Lin<sup>-</sup>-Kit<sup>+</sup>-Sca-1<sup>+</sup> (figura 4h). Juntos, estos resultados indican la activación consecuente de la señalización de Wnt y de Notch a lo largo de la duración del tratamiento con inhibidor de GSK-3, tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, estos resultados sugieren un cambio desde la activación de la señalización de Hedgehog en puntos de tiempo iniciales de la exposición al inhibidor de GSK-3 (24 h *in vitro*) a una represión de la señalización de Hedgehog posteriormente (9 d *in vitro*). Estos resultados muestran que el tratamiento directo *in vitro* de células Lin<sup>-</sup>-Kit<sup>+</sup>-Sca-1<sup>+</sup> con inhibidor de GSK-3 aumenta la proliferación y la producción de CFU mientras que modula las rutas de Wnt, Hedgehog y Notch, de manera similar a la administración *in vivo*, lo que sugiere que los inhibidores de GSK-3 pueden modular directamente la función de HSC en ausencia de elementos distintos de HSC que comprenden el microentorno de la médula ósea.

La figura 6 muestra los efectos *in vitro* del inhibidor de GSK-3 sobre HSC purificadas. (a) Número de veces de expansión celular de HSC aisladas de ratones GFP/FVB y C57BL/6 tras 9 días de cultivo *in vitro* con inhibidor de GSK-3 o control con vehículo. La frecuencia tras el cultivo de células c-Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> se multiplicó por la expansión celular total (barras negras), y se usó para calcular el número de veces de expansión celular de la población c-Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> (barras blancas). \*p<0,05 frente a cultivo control, las barras de error representan EEM (n=3) (b) Número total de progenitores hematopoyéticos en la población expandida tras el cultivo *in vitro* de HSC GFP/FVB y C57BL/6 con inhibidor de GSK-3. \*p<0,05, las barras de error representan EEM (n=4) (c) Expresión relativa de Axin2, CyclinD1, Hes1, Gli3 y Ptc1 en HSC GFP/FVB tras la estimulación *in vitro* de 24 h con inhibidor de GSK-3. Tras el tratamiento con inhibidor de GSK-3, se reguló por disminución la expresión de Axin2 1,3 veces y se reguló por incremento CyclinD1 1,2 veces; Hes1 aumentó 1,4 veces; Gli3 se reguló por disminución 1,3 veces y Ptc1 se reguló por

incremento 2,3 veces. Los duplicados se promediaron tras la normalización a niveles del gen de mantenimiento GAPDH. Las barras de error representan EEM (n=2). (d) Efectos *in vitro* del inhibidor de GSK-3 sobre células Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> purificadas. Expresión relativa de Axin2, CyclinD1, Hes1, Gli3 y Ptc1 en células c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> GFP/FVB tras 9 d de cultivo con inhibidor de GSK-3. El gráfico muestra el aislamiento de nuevo de células c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> tras el periodo de cultivo, antes del análisis de la expresión génica. Las barras de error representan EEM (n=2).

#### EJEMPLO 6

La administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 aumenta la función de repoblación de HSC de ratón silvestre trasplantadas, y aumenta la capacidad de HSC humanas de neonato y de adulto *in vivo*

La presente invención demuestra que la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 aumenta la repoblación hematopoyética en receptores sometidos a trasplante con HSC de ratón o humanas. La administración de inhibidor de GSK-3 acortó el periodo de recuperación de neutrófilos y megacariocitos, mejoró la supervivencia de ratones sometidos a trasplante, y mantuvo una repoblación a largo plazo potenciada de HSC. Este efecto fue independiente de los números de células trasplantadas y los niveles de reconstitución generados, mostrando así el amplio beneficio de la inhibición de GSK-3 sobre el aumento de la capacidad de despoblación. El tratamiento con inhibidor de GSK-3 aumentó la producción de HSC de células Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> primitivas y progenitores sin alterar la repoblación secundaria, lo que sugiere que aunque las células despobladoras no se expanden, el conjunto de HSC se mantiene al tiempo que se aumenta la reconstitución hematopoyética global. De manera notable, los efectos *in vivo* del tratamiento con inhibidor de GSK-3 fueron específicos, aumentando el ciclo de células Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> primitivas y modulando exclusivamente dianas génicas de las rutas de Wnt, Hedgehog y Notch dentro de esas células. Basándose en estas observaciones, se propone un modelo de trabajo de la base celular y molecular de la inhibición de GSK-3 sobre el aumento de la repoblación de HSC trasplantadas *in vivo* (figuras 6e, 6f).

En ausencia de administración de inhibidor de GSK-3 (figura 6e), las HSC despobladoras de ratón y humanas establecen y mantienen hematopoyesis reconstituida proporcionando progenie al compartimento hematopoyético primitivo de CD34<sup>+</sup> humanas o c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> de ratón. Este compartimento está compuesto por el conjunto de HSC que contiene células con capacidad de despoblación secundaria, y un conjunto más grande de progenitores con fenotipos similares de c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> de ratón o CD34<sup>+</sup> humana que se mantuvieron mediante HSC originales trasplantadas. Tras la administración *in vivo* de inhibidor de GSK-3 (figura 6f), se modulan específicamente genes diana de las rutas de Wnt, Notch y Hedgehog en células dentro del compartimento hematopoyético primitivo, se induce la proliferación de HSC trasplantadas y estas HSC contribuyen normalmente al conjunto de HSC al tiempo que promueven la producción de progenitores. En última instancia, la administración de inhibidor de GSK-3 potencia la repoblación hematopoyética aumentando la producción de progenitores hematopoyéticos, mejorando de ese modo la recuperación de neutrófilos y megacariocitos, y manteniendo la función de HSC a largo plazo potenciada mediante retención de las HSC.

Los hallazgos enfatizan la implicación de las rutas de señalización múltiples en la regulación de decisiones del destino de HSC, y sugieren un papel más universal para GSK-3 en la regulación de células madre, un paradigma respaldado recientemente por las observaciones de que inhibidores de GSK-3 mantienen células madre embrionarias de ratón y humanas *in vitro*. Reya, T. Recent Prog Horm Res 58: 283-295, 2003; Sato, N., *et al.* Nat Med 10: 55-63, 2004. En HSC de mamífero, se ha propuesto independientemente que la activación de las rutas de Wnt, Notch y Hedgehog tiene un impacto sobre la capacidad de repoblación. Murdoch, B. *et al.* PNAS 100: 3422-7, 2003; Reya, T. *et al.* Nature 423: 409-14, 2003; Karanu, F.N. *et al.* J Exp Med 192: 1365-72, 2000; Varnum-Finney, B. *et al.* Nat Med 6: 1278-81, 2000; Bhardwaj, G. *et al.* Nat Immunol 2: 172-80, 2001. Se observa que el inhibidor de GSK-3 activa la señalización de Notch y Wnt en células Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> primitivas, aunque, de manera notable, regula por disminución uno de los genes diana de Wnt establecidos, *Axin2*. Aunque se ha propuesto que la activación mediada por ligando de las rutas de señalización de Notch y Wnt promueve la autorrenovación y expansión de HSC, la alteración genética de estas rutas en recientes estudios deficientes condicionales ha mostrado que no se requieren para la función de HSC. Reya, T. *et al.* Nature 423: 409-14, 2003; Varnum-Finney, B. *et al.* Nat Med 6: 1278-81, 2000; Mancini, S.J. *et al.* Blood 105: 2340-2, 2005; Cobas, M. *et al.* J Exp Med 199: 221-9, 2004. Por consiguiente, pueden ser necesarias categorías separadas para moduladores de HSC para definir rutas de señalización que son esenciales frente a las que aumentan la función de HSC. Bhatia, M. Blood 105: 2340, 2005. Se sugiere que la regulación de las rutas de señalización de Notch, Wnt y Hedgehog aumenta la capacidad de HSC aumentando la producción de progenitores de células repobladoras, a diferencia de promover la autorrenovación y expansión de HSC. Dado que informes previos que implican rutas de Wnt, Notch y Hedgehog en la regulación de HSC no han investigado los efectos específicos sobre la autorrenovación de HSC en experimentos de repoblación secundaria definitiva, es difícil establecer un modelo colectivo sobre cómo esas rutas regulan las HSC.

La administración *in vivo* de inhibidores de GSK-3 en un entorno clínico para potenciar la función de HSC a largo plazo y acortar la citopenia tras el trasplante ofrece un uso adicional para estos fármacos bien desarrollados que están optimizándose actualmente como tratamientos para la diabetes y la enfermedad de Alzheimer. Cohen, P. *et al.* Nat Rev Drug Dis 3: 479-87, 2004. En casos en los que el número de HSC autólogas recogidas es inferior al óptimo, o en receptores sometidos a trasplante que demuestran escaso injerto, la selección como diana *in vivo* directa de HSC del paciente proporciona un contexto más fisiológico para modular la capacidad de repoblación de HSC, como

alternativa a la recogida de HSC y la expansión *ex vivo*. Los efectos de la administración de inhibidor de GSK-3 sobre las HSC endógenas sugieren un impacto global sobre las HSC tanto endógenas como suministradas de manera exógena. Basándose en los resultados de este estudio, una aplicación específica prometedora es administrar inhibidor de GSK-3 a pacientes adultos sometidos a trasplante con números limitados de HSC derivadas de sangre del cordón umbilical, con el objetivo de proporcionar el aumento necesario de reconstitución para aumentar la utilidad del trasplante de sangre de cordón umbilical sin la necesidad de expansión *ex vivo* o combinación de muestras de CB de CMH dispar. Barker, J.N. *et al.* Blood 105: 1343-7, 2005; Gluckman, E. Exp Hematol 28: 1197-205, 2000.

10 EJEMPLO 7

Uso de agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog para inhibir la proliferación y/o inducir la diferenciación de células madre leucémicas y para tratar una enfermedad leucémica

15 Pueden usarse composiciones de agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, por ejemplo, inhibidores de GSK-3, para inhibir la proliferación de células madre, por ejemplo, células madre leucémicas, y para tratar una enfermedad leucémica. Composiciones de agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog en combinación con composiciones que incluyen péptidos y polipéptidos que son inhibidores de la proliferación de células madre, por ejemplo, polipéptidos de  $\alpha$ -hemoglobina en combinación con compuestos opiáceos. Las composiciones pueden usarse para tratar una enfermedad autoinmunitaria, cáncer, psoriasis, SIDA, anemia o dolor. Véase la patente estadounidense 6.784.155.

25 En pacientes humanos con leucemia linfoblástica aguda (ALL) temprana o leucemia mieloide aguda primitiva, se sabe que la enfermedad se origina y se mantiene por una célula madre hematopoyética (HSC) transformada. Esta HSC transformada o HSC leucémica que presenta un potencial de diferenciación y regulación del ciclo celular es distinta de su homólogo normal en los pacientes o de HSC trasplantadas en el paciente a partir de una fuente alogénica. Uno o más agentes que promueven la señal de Wnt/ $\beta$ -catenina, señal de Notch o señal de Hedgehog, por ejemplo, inhibidores de GSK-3, inhibirán la proliferación de la HSC transformada o HSC leucémica induciendo programas de senescencia o apoptóticos, y/o inducirán la diferenciación de células madre leucémicas para dar células sanguíneas maduras benignas que se diferenciarán de manera terminal y se perderán. Esto proporciona una estrategia de purga para erradicar las células madre leucémicas, y/o inducir HSC normales para reconstituir un sistema sanguíneo no canceroso mediante inhibición de GSK-3 dirigida.

35 EJEMPLO 8

Metodología

40 Ratonés. Se usaron ratones GFP/FVB, C57BL/6, Tg(Fos-lacZ)<sup>34Efu</sup> (TOP-gal), Ptc-1<sup>+/-lacZ</sup> (Stanford University School of Medicine) y NOD/LtSz-scid/scid (NOD/SCID) a las 8-12 semanas de edad. Tsigotis *et al.*, Biotechniques 31:120-126, 128, 130, 2001; DasGupta y Fuchs, Development 126:4557-4568, 1999; Goodrich *et al.*, Science 277:1109-1113, 1997. Se criaron los ratones y se mantuvieron en la instalación de barrera de animales en el Robarts Research Institute (Londres, Ontario, Canadá), con la excepción de Ptc-1<sup>+/-lacZ</sup>, criados y mantenidos en alojamiento convencional en la instalación para el cuidado de animales de la University of Western Ontario (Londres, Ontario, Canadá).

45 Inhibidores de GSK-3. Inhibidores de GSK-3 selectivos, competitivos con ATP, CHIR-911 y CHIR-837 (también denominados CT-99021 y CT-98023 respectivamente). Chiron Corporation (Emeryville, CA). Se purificaron estos inhibidores a >95% mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. Se formuló CHIR-911 en una disolución de captisol al 10% para su administración *in vivo* mediante inyección intraperitoneal, con una concentración eficaz semi-máxima [CE<sub>50</sub>] de 766 nM y una selectividad de >10.000 veces para GSK-3. Ring *et al.*, Diabetes 52:588-595, 2003. Se formuló CHIR-837 en DMSO para su uso *in vitro*, con una CE<sub>50</sub> de 375 nM y una selectividad de >5.000 veces para GSK-3 Cline *et al.*, Diabetes 51:2903-2910, 2002.

55 Aislamiento de HSC murinas. Se purificó una población de linaje reducido (Lin<sup>-</sup>) a partir de células de médula ósea usando el kit de enriquecimiento de progenitores hematopoyéticos murinos StemSep™ (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá). Se purificaron adicionalmente células que expresaban altos niveles de c-Kit y Sca-1 mediante clasificación celular usando un instrumento FACS Advantage SE (Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ).

60 Purificación de células hematopoyéticas humanas. Se aislaron células mononucleares (MNC) de sangre de cordón umbilical (CB) humanas y se enriquecieron para una población de linaje reducido (Lin<sup>-</sup>) tal como se describe. Bhatia *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 94: 5320-5325, 1997. Para la sangre periférica movilizada (M-PB), el régimen de movilización consistió en SCF 20  $\mu$ g/kg/d (Amgen, Mississauga, ON, Canadá) más Neupogen® 10  $\mu$ g/kg/d (G-CSF) administrado por vía subcutánea, desde el día 1 hasta la terminación de la aféresis (día 11). Se extrajo sangre completa a los 11 días, y se recogieron MNC mediante centrifugación en Ficoll-Paque (Pharmacia, Piscataway, NJ). El paciente había recibido una dosis de células total que superaba 2x10<sup>8</sup> células CD34<sup>+</sup> por l.

Ensayo de repoblación de HSC *in vivo*. Se trasplantaron poblaciones celulares purificadas mediante inyección en la vena de la cola en ratones NOD/SCID sometidos a irradiación inferior a la letal (350 rads, <sup>137</sup>cesio) según protocolos convencionales 26. Los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de CHIR-911 30 mg/kg de peso corporal (Chiron Corporation) o control con vehículo (captisol al 10%) dos veces por semana durante la duración del periodo de trasplante. Los ratones que recibieron células derivadas de BM GFP/FVB se sacrificaron 5 semanas tras el trasplante, y los sometidos a trasplante con células humanas se sacrificaron tras 5-6 semanas. Se evaluó el injerto mediante la presencia de células de ratón de donante GFP+, o células humanas de donante CDR45+, en combinación con el análisis de marcadores de superficie de células hematopoyéticas de múltiples linajes, maduras, en un instrumento FACSCalibur (BD).

Ensayos de unidades formadoras de colonias (CFU) hematopoyéticas. Se realizaron ensayos de progenitores hematopoyéticos clonogénicos de ratón sembrando en placa números iguales de células tratadas con inhibidor de GSK-3, o tratadas con control, en MethoCult™ GF M3434 (StemCell Technologies), y puntuando las colonias tras una incubación de 10-12 días a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Se realizaron ensayos de CFU sembrando en placa números iguales de células tratadas con inhibidor de GSK-3 o tratadas con control en MethoCult™ H4434 (StemCell Technologies) que contenían SCF humano 50 ng/ml (Amgen), GM-CSF 10 ng/ml, interleucina-3 10 ng/ml y eritropoyetina 3 U/ml (todos de R&D Systems, Minneapolis, MN). Se evaluaron los recuentos de colonias diferenciales tras la incubación durante 10-14 días a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% tal como se describió anteriormente. Bhatia *et al.*, Nat Med 4:1038-45, 1998.

Tinción con di-β-D-galactopiranosido de fluoresceína (FDG). Se incubaron células hematopoyéticas primitivas (Lin-) aisladas de ratones TOPgal o Ptc-1<sup>+/lacZ</sup> en PBS/FBS al 5% 2 min. a 37°C con un volumen igual de reactivo FDG 2 mM (Marker Gene Technologies Inc., Eugene, Oregón) en dH<sub>2</sub>O. Se terminó la carga de FDG mediante adición de PBS/FBS frío. Entonces se tiñeron las células con anticuerpos conjugados con compuesto fluorescente frente a c-Kit y Sca-1, el tinte de viabilidad 7-AAD (BD), y se analizaron en un instrumento FACSCalibur (BD).

Análisis de PCR en tiempo real. Se extrajo ARN total de un mínimo de 30.000 HSC aisladas *de novo*, o células aisladas otra vez tras el cultivo basándose en la expresión de altos niveles de c-Kit y Sca-1, usando el kit RNeasy (Qiagen, Mississauga, ON, Canadá). Se realizó la síntesis de ADNc de primera hebra (kit de síntesis de ADNc de primera hebra, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), y se analizó el ADNc resultante para detectar expresión génica diferencial mediante PCR en tiempo real usando tinte de unión a ADN bicatenario SYBRGREEN y el sistema de PCR cuantitativa múltiplex Mx4000™ (Stratagene, La Jolla, CA). Se evaluó la cuantificación comparativa de transcritos con respecto al gen de mantenimiento gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Todas las secuencias de cebadores se enumeran en la tabla 1. Se purificaron los productos amplificados en gel de agarosa y se secuenciaron para verificar la especificidad de la amplificación génica.

Tabla 1

	Cebador directo (de 5' a 3')	Cebador inverso (de 5' a 3')	SEQ ID NO:
GAPDH	TTCACCACCATGGAGAAGGC	GGCATGGACTGTGGTCATGA	1, 2
Axin2	AACCTATGCCCGTTTCTCT	CTGGTCACCCAACAAGGAGT	3, 4
CyclinD1	AGTGCGTGCAGAAGGAGATT	CACAACCTCTCGGCAGTCAA	5, 6
Hes1	CTACCCAGCCAGTGTCAAC	ATGCCGGGAGCTATCTTTCT	7, 8
Gli3	TGCCATCAGCTACTCAGTG	TTGTTGCAGAGTGAGGTTGC	9, 10
Ptc1	CTCAGGCAATACGAAGCACA	GACAAGGAQCCAGAGTCCAG	11, 12

Cultivo de HSC libre de suero. Se cultivaron células purificadas en BIT 9500 (StemCell Technologies), se diluyeron en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) y se complementaron con β-mercaptoetanol (55 mM), L-glutamina (2 mM, Gibco BRL, Gaithersburg, MD), IL-6 humana 100 ng/ml (R&D Systems), SCF de ratón 50 ng/ml (StemCell Technologies), IL-11 de ratón 100 ng/ml (StemCell Technologies) y ligando Flt-3 humano 100 n/ml (R&D Systems). Se cultivaron las células durante 9 días con CHIR-837 1 μM (Chiron Corporation) o vehículo (DMSO) a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%, y se repusieron con medios recientes cada 2 días.

Análisis estadísticos. Se analizaron los datos mediante pruebas de la t de Student bilaterales, para datos emparejados, y los resultados se consideraron significativos cuando P≤0,05. Las barras de error representan EEM.

Cuando se usan intervalos en el presente documento para propiedades físicas, tales como peso molecular, o propiedades químicas, tales como fórmulas químicas, se pretende incluir todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y realizaciones específicas en los mismos.

Los expertos en la técnica apreciarán que pueden realizarse numerosos cambios y modificaciones a las realizaciones de la invención.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición que comprende un inhibidor de glucógeno sintasa cinasa-3 para su uso en el aumento del injerto de células progenitoras o células madre hematopoyéticas en un sujeto mamífero, en la que el inhibidor de glucógeno sintasa cinasa-3 inhibe la expresión o actividad de glucógeno sintasa cinasa-3.
- 10 2. Composición que comprende un inhibidor de glucógeno sintasa cinasa-3 para su uso en el aumento de la reconstitución de células progenitoras o células madre hematopoyéticas en un sujeto mamífero, en el que el inhibidor de glucógeno sintasa cinasa-3 inhibe la expresión o actividad de glucógeno sintasa cinasa-3.
- 15 3. Uso de un inhibidor de glucógeno sintasa cinasa-3 en la preparación de un medicamento para aumentar el injerto de células progenitoras o células madre hematopoyéticas en un sujeto mamífero, en el que el inhibidor de glucógeno sintasa cinasa-3 inhibe la expresión o actividad de glucógeno sintasa cinasa-3.
- 20 4. Uso de un inhibidor de glucógeno sintasa cinasa-3 en la preparación de un medicamento para aumentar la reconstitución de células progenitoras o células madre hematopoyéticas en un sujeto mamífero, en el que el inhibidor de glucógeno sintasa cinasa-3 inhibe la expresión o actividad de glucógeno sintasa cinasa-3.
- 25 5. Composición para su uso o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la composición o el medicamento es para su administración a una dosis de 0,0001 a 100 mg/kg de peso corporal del sujeto.
- 30 6. Composición para su uso o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición o el medicamento es para administración intravesicular, intratecal, parenteral, tópica, intravenosa, oral, inhalante, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular.
- 35 7. Composición para su uso o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el aumento del injerto o la reconstitución de células progenitoras o células madre en el sujeto mamífero es un resultado de proliferación celular, migración celular, disminución de la apoptosis, autorrenovación o aumento de la supervivencia celular.
- 40 8. Composición para su uso o uso según la reivindicación 7, en la que las células progenitoras hematopoyéticas comprenden células eritroides, células de granulocitos, células de macrófagos, células de granulocitos-macrófagos, células B, células T y tipos de colonias de linaje mixto multipotentes.
9. Composición para su uso o uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para tratar una enfermedad de tipo inmune en el sujeto mamífero.
10. Composición para su uso o uso según la reivindicación 9, en la que la enfermedad de tipo inmune es diabetes, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de inmunodeficiencia, malignidad hematopoyética, insuficiencia hematopoyética o trasplante de células madre hematopoyéticas.

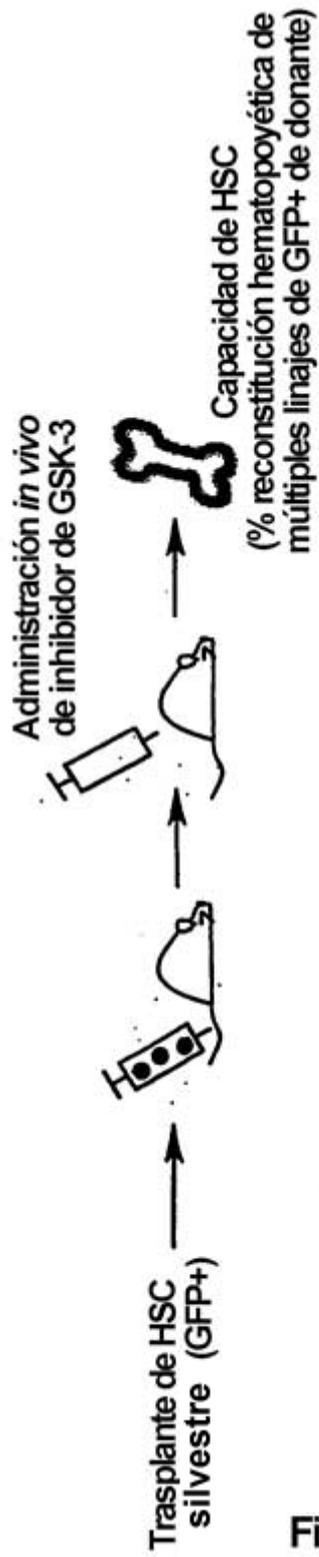


Figura 1a

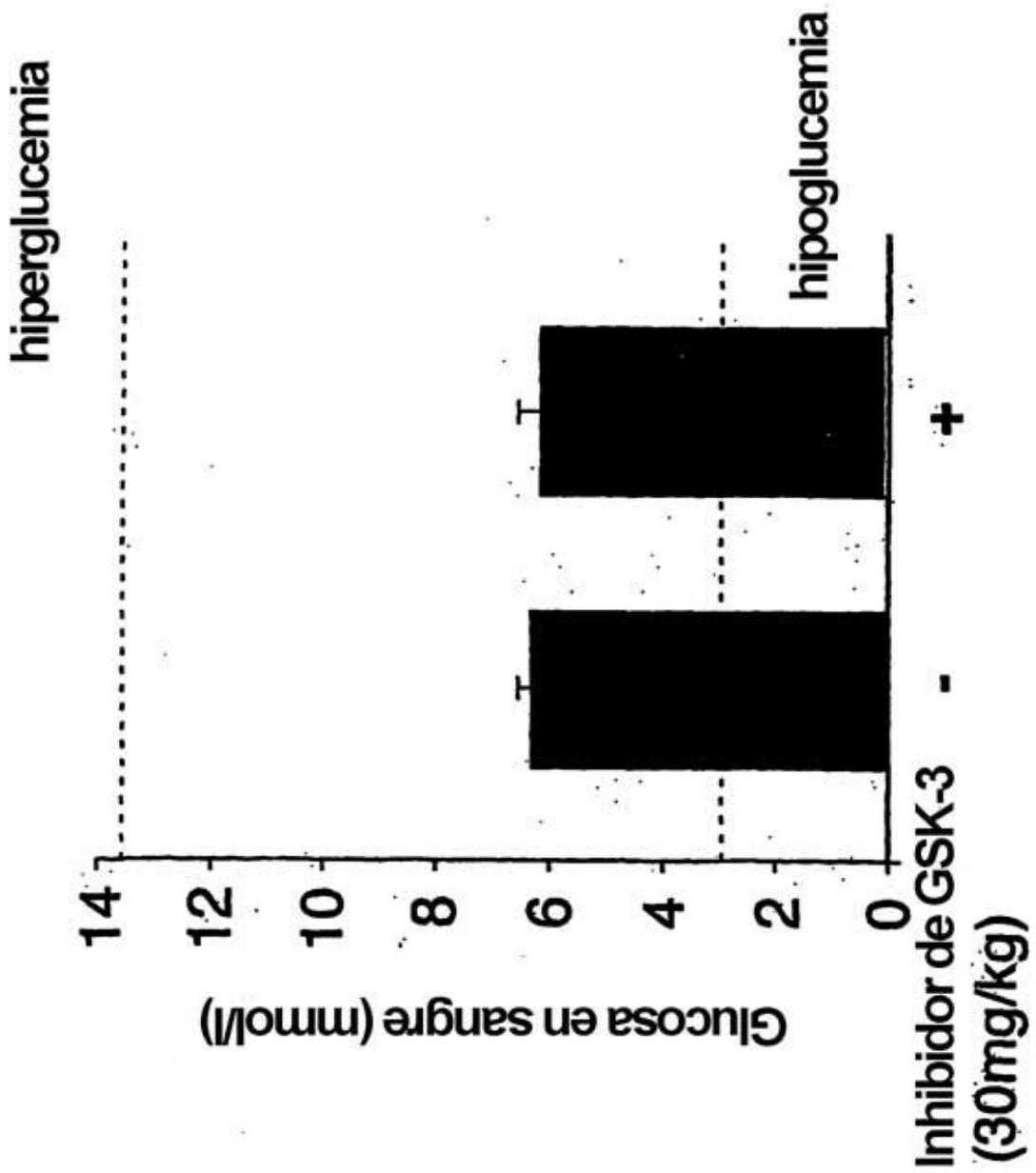


Figura 1b

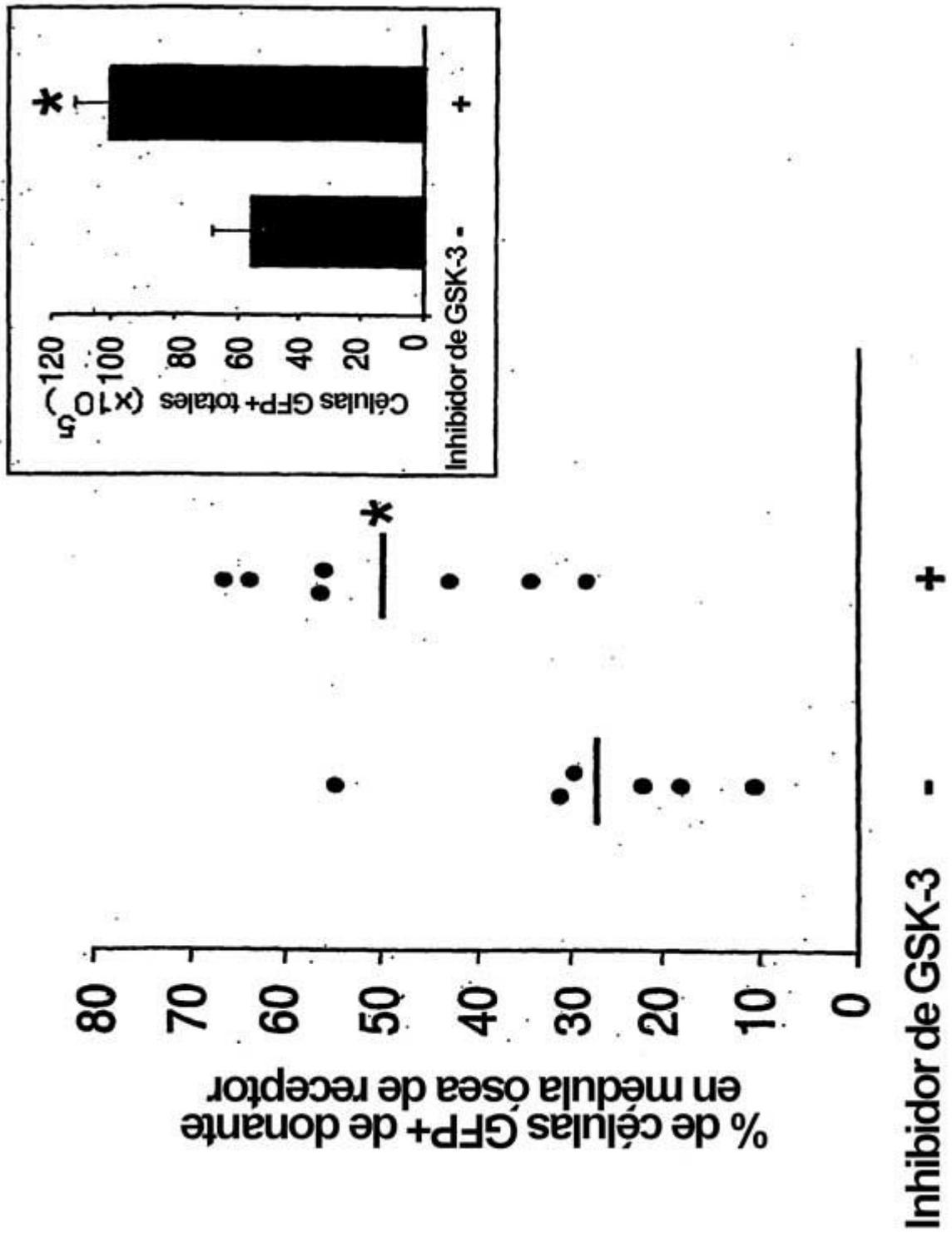


Figura 1c

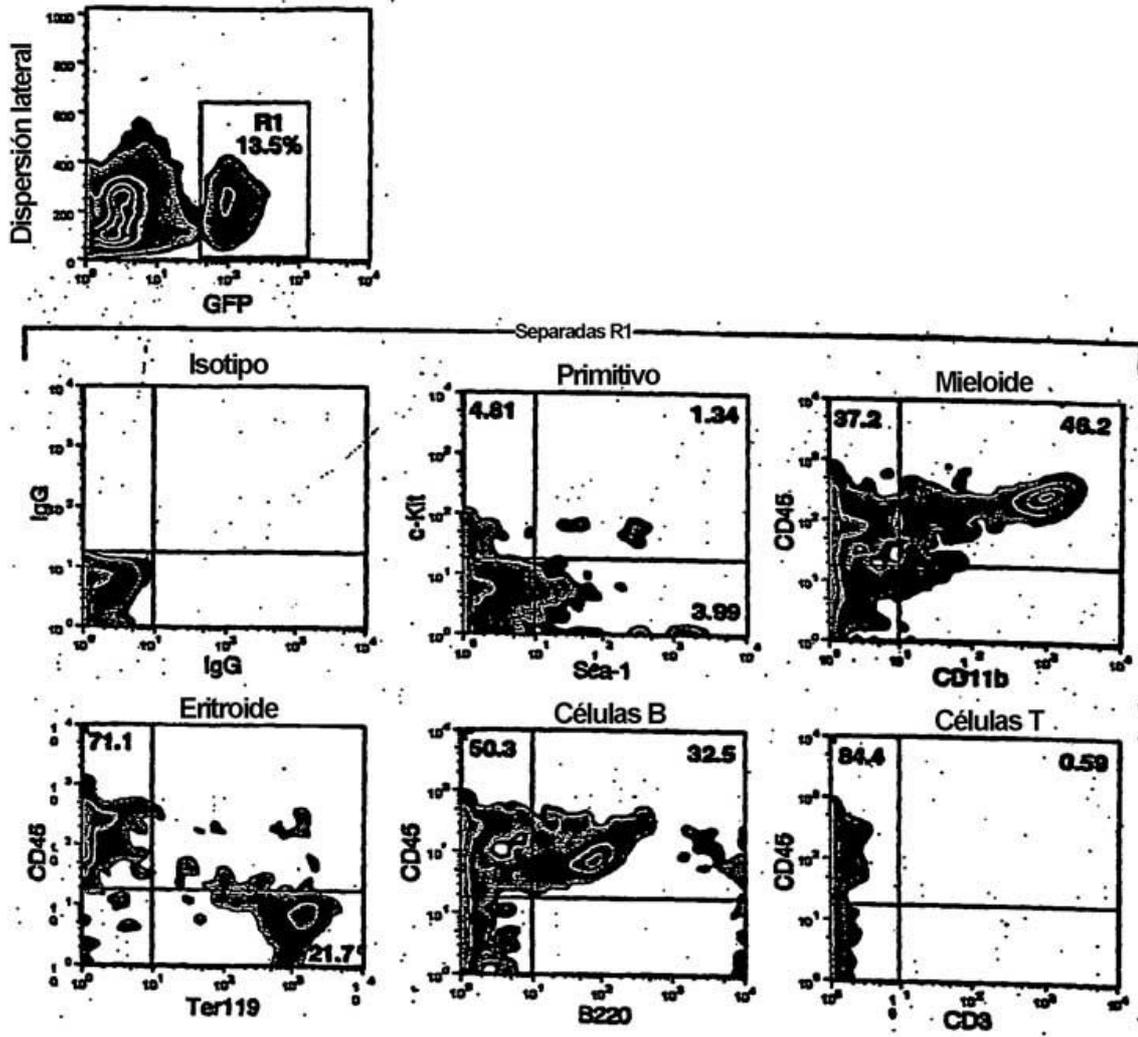


Figura 1d

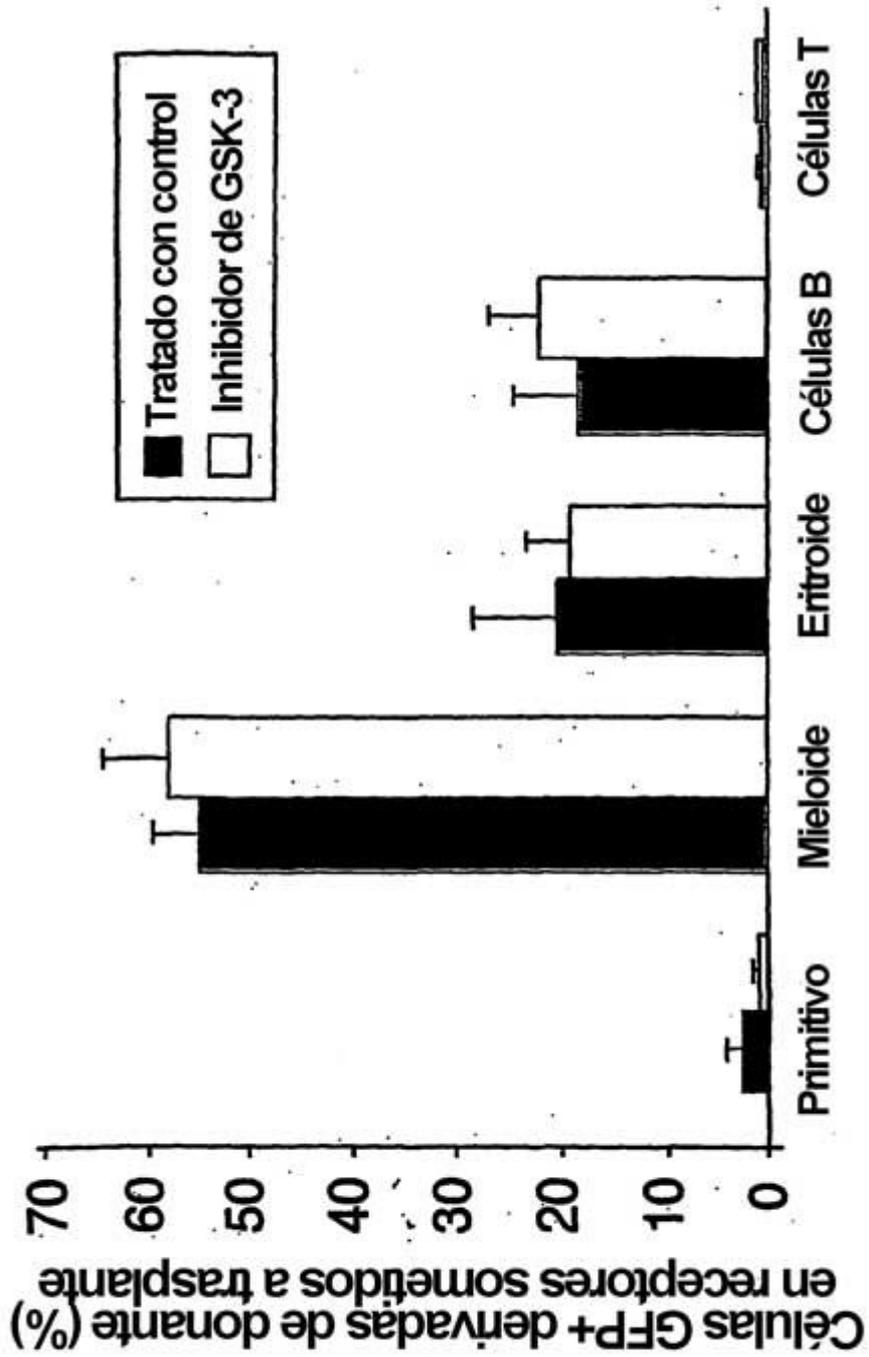


Figura 1e

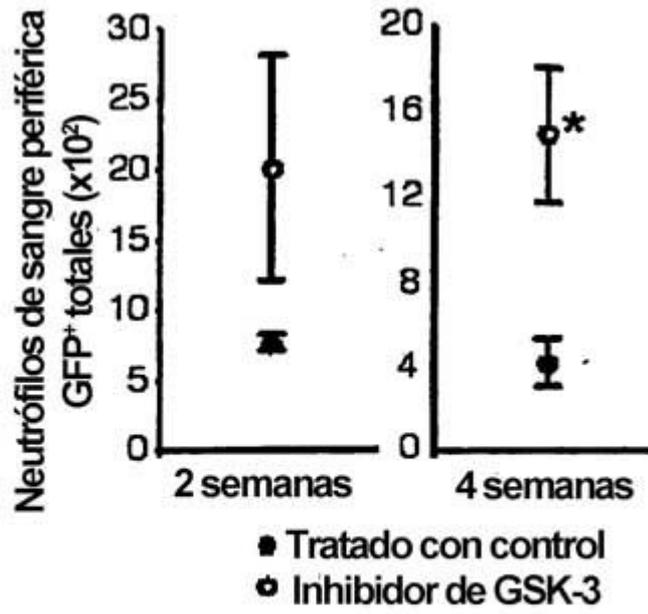


Figura 1f

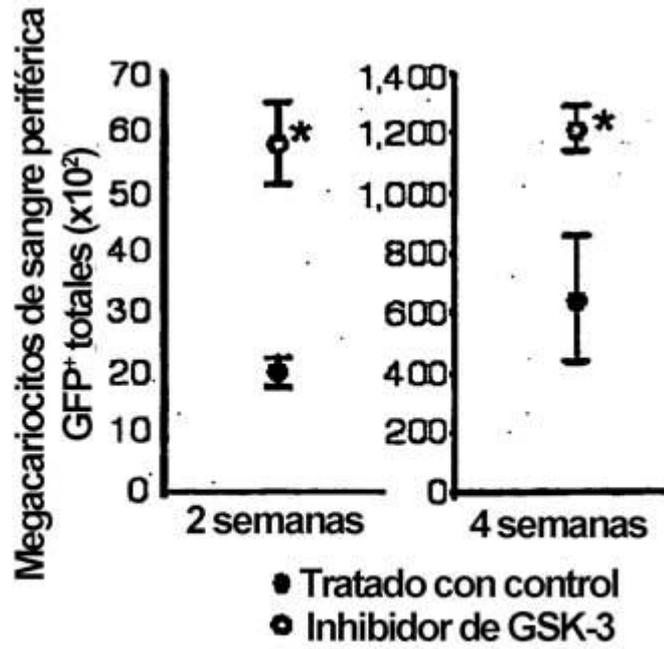


Figura 1g

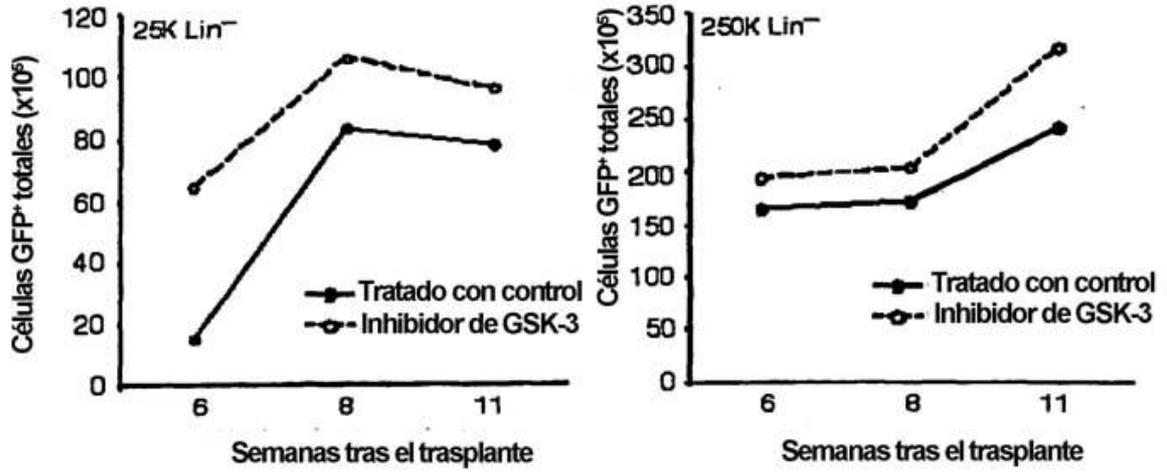


Figura 1h

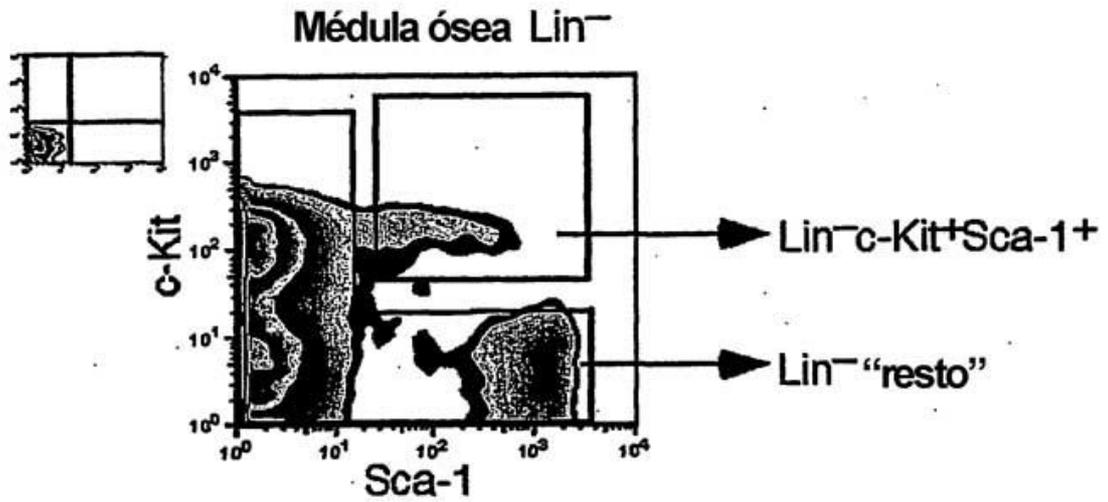


Figura 1i

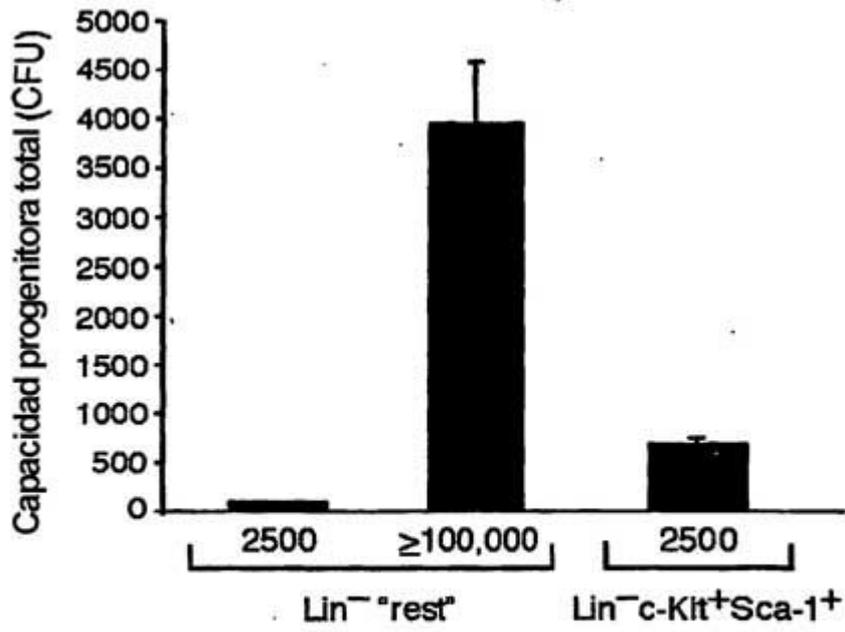


Figura 1j

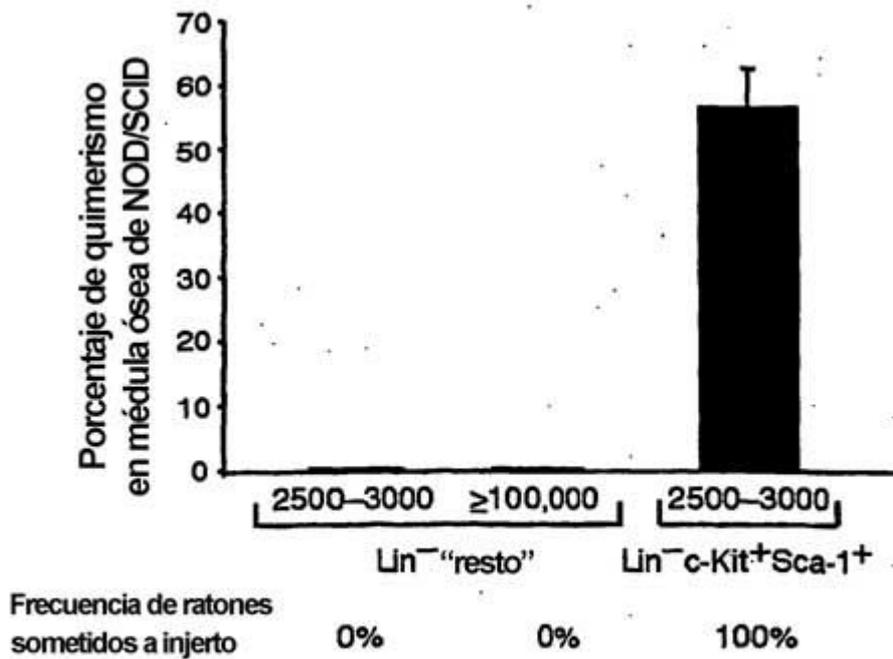


Figura 1k

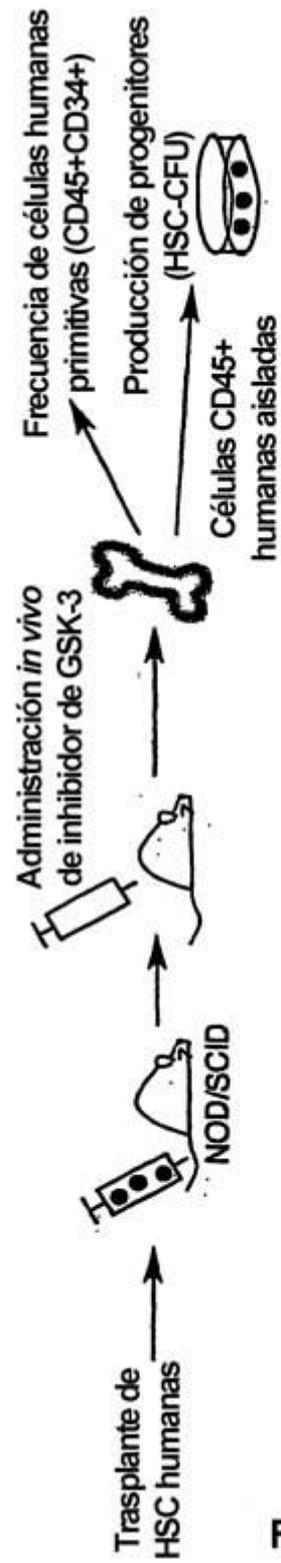


Figura 2a

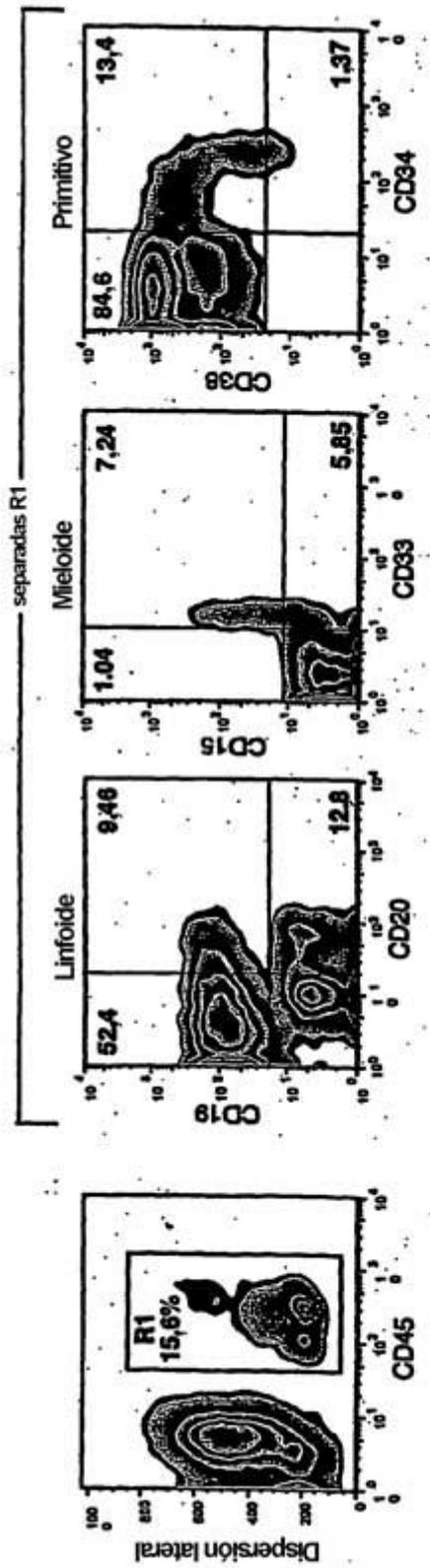


Figura 2b

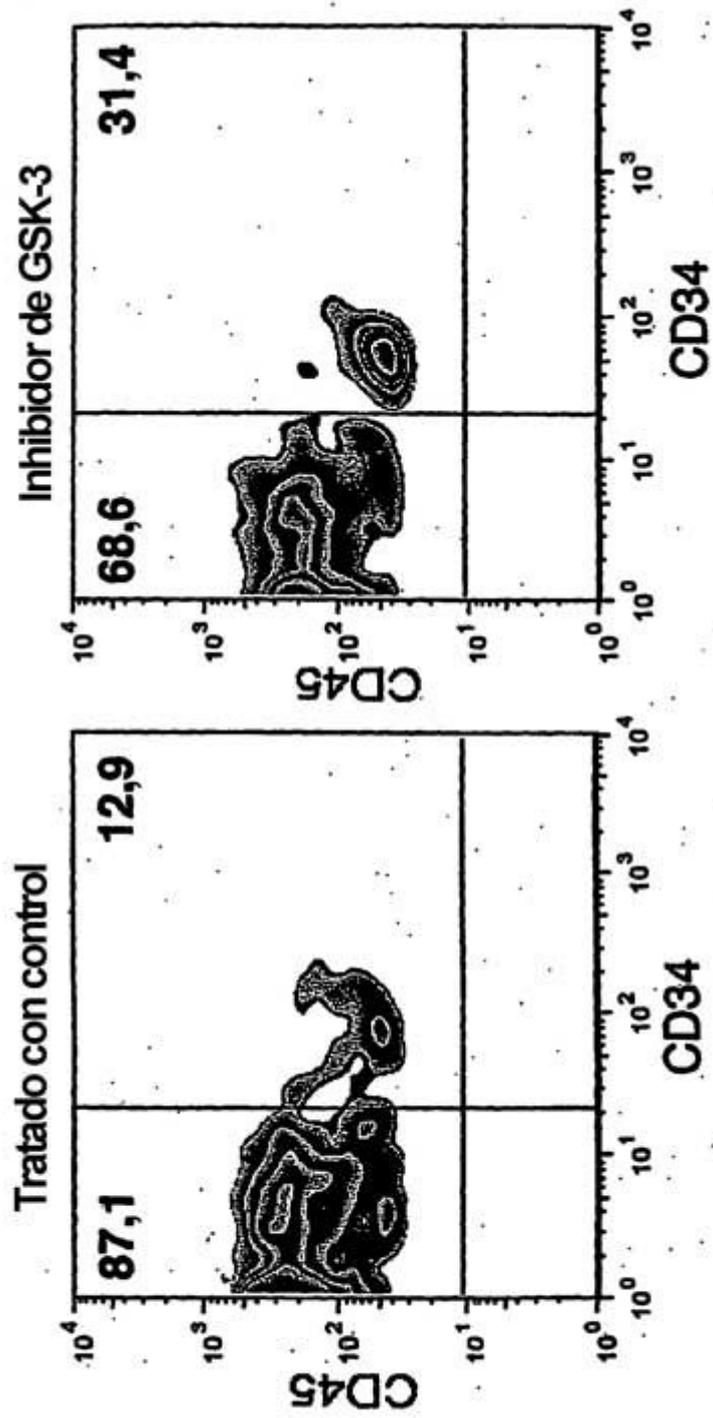


Figura 2c

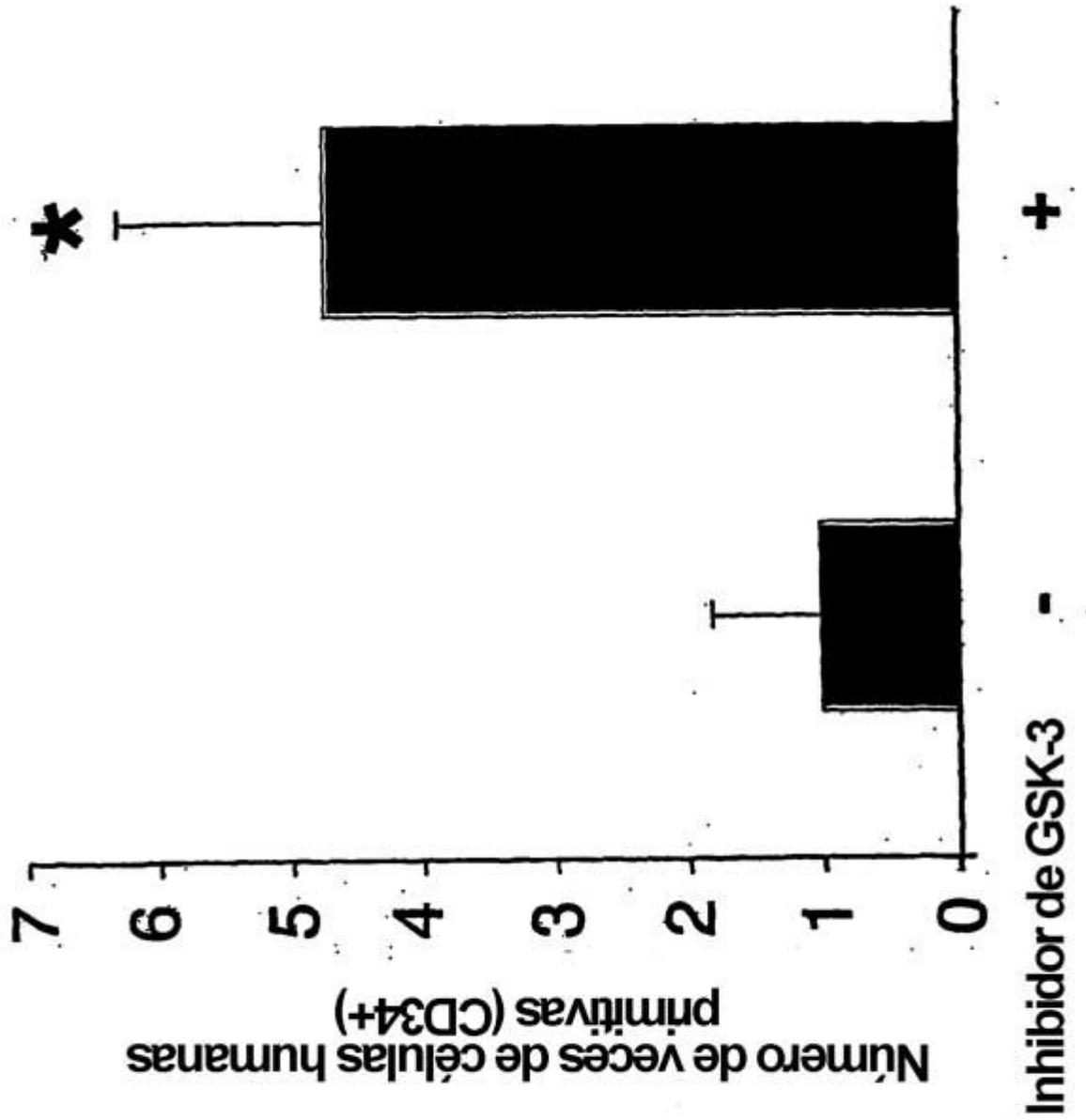


Figura 2d

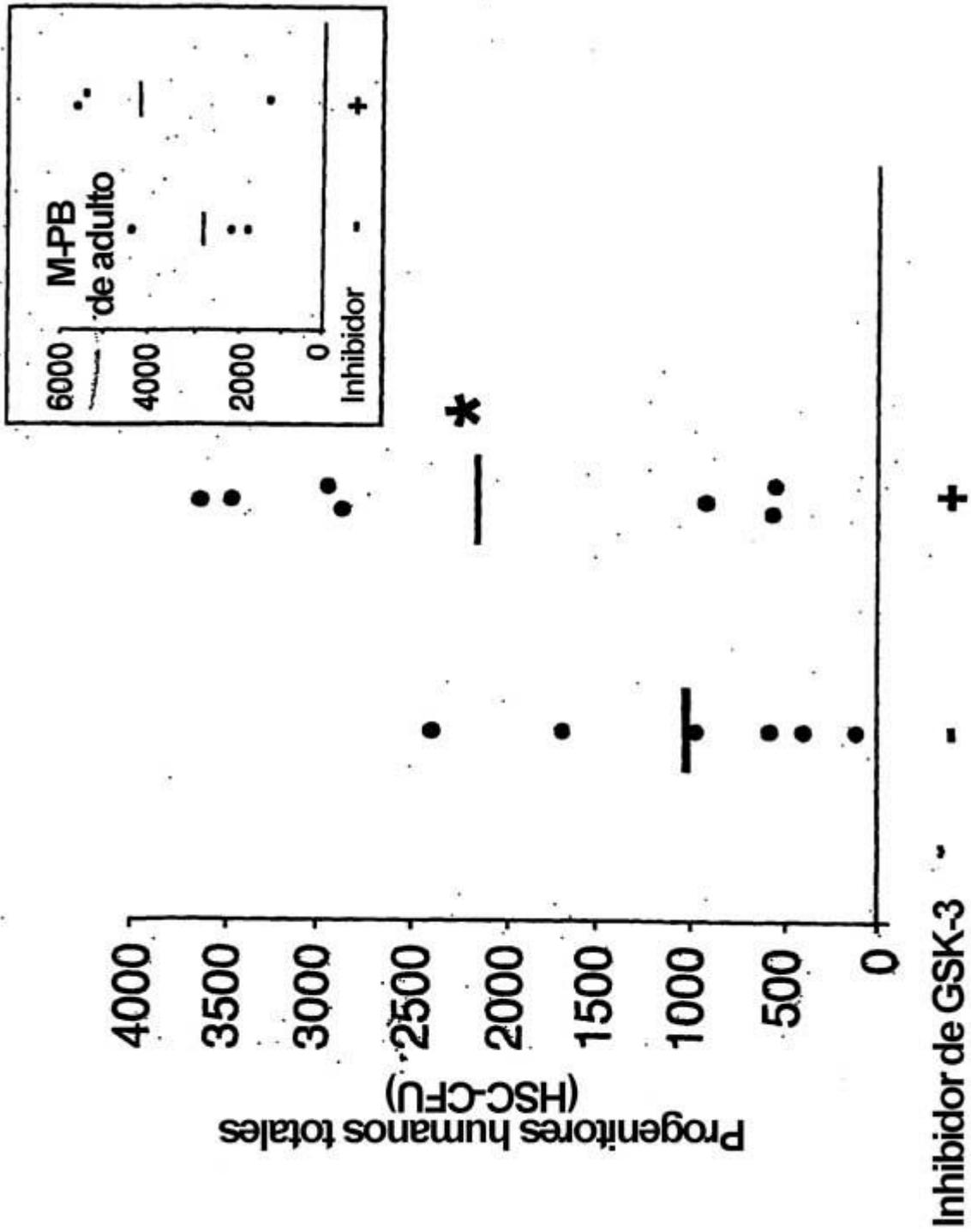


Figura 2e



Figura 3a

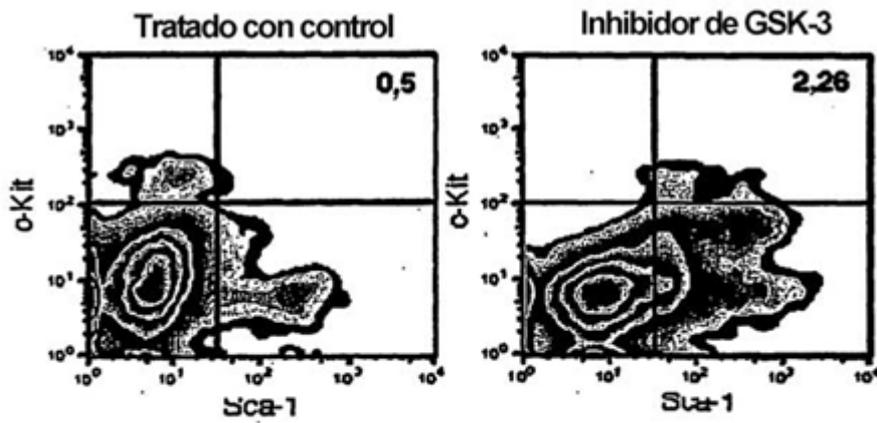


Figura 3b

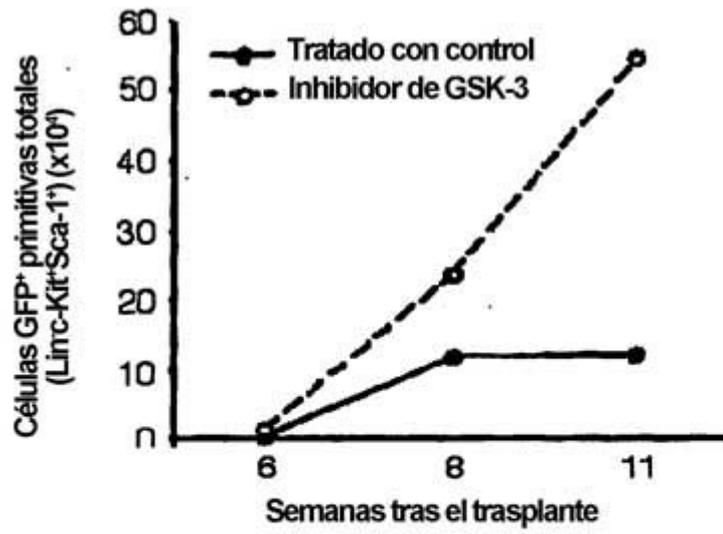


Figura 3c

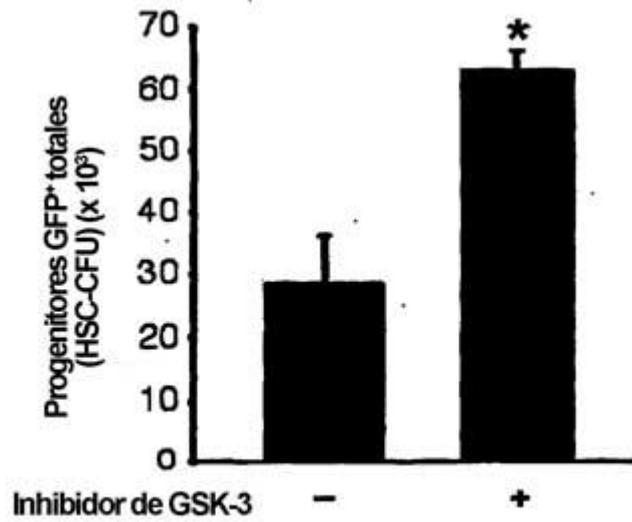


Figura 3d

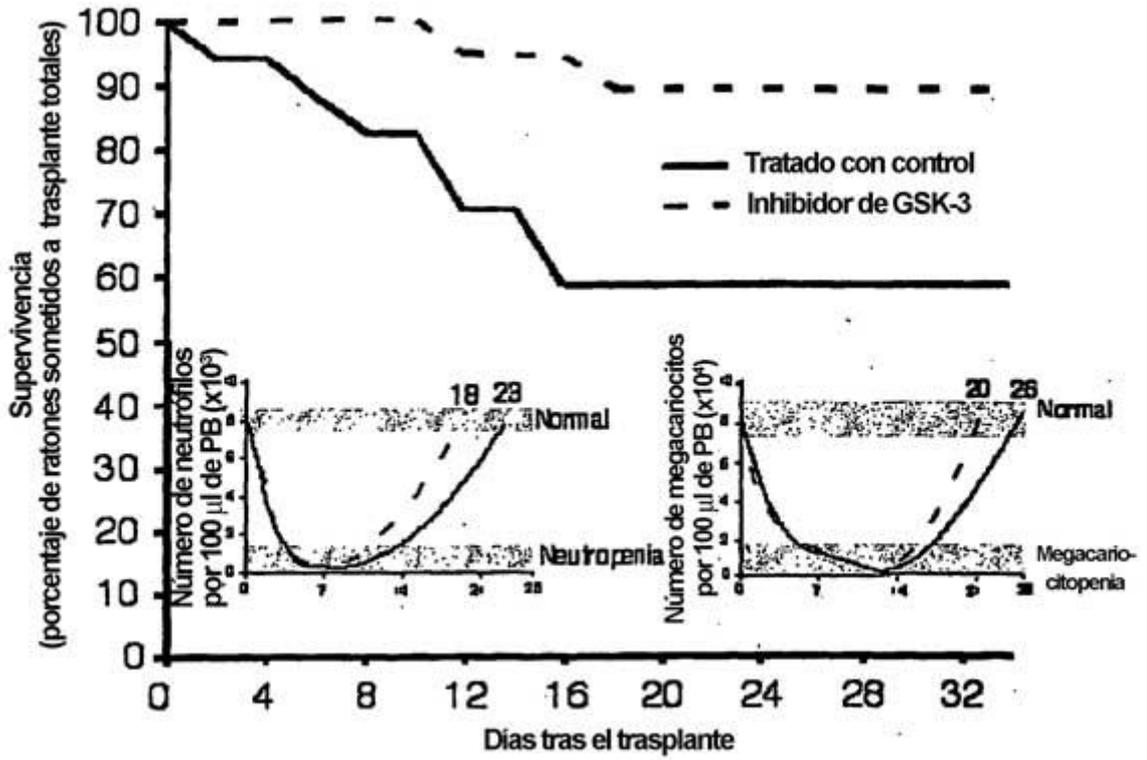


Figura 3e

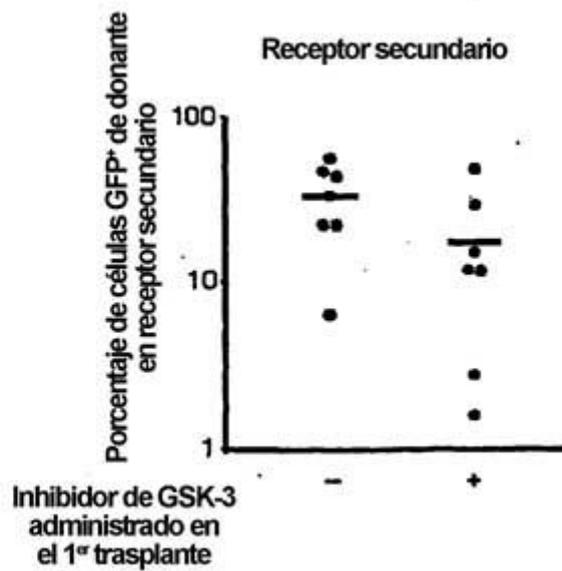


Figura 3f

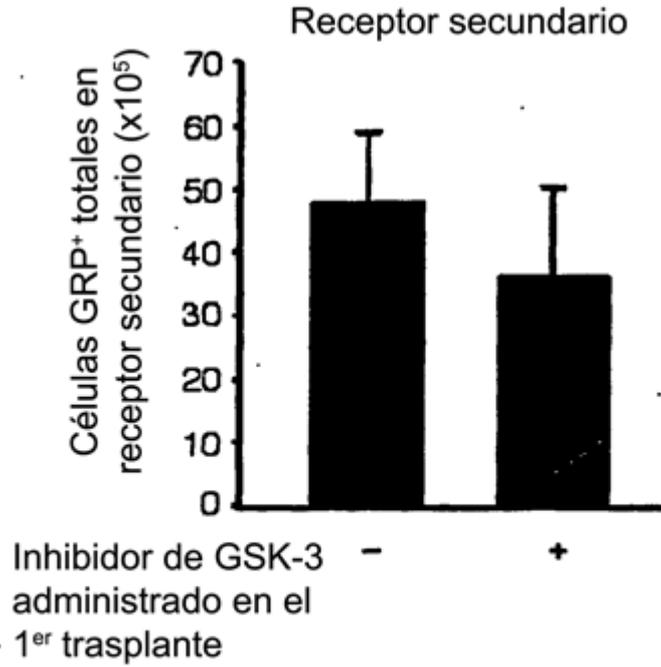


Figura 3g

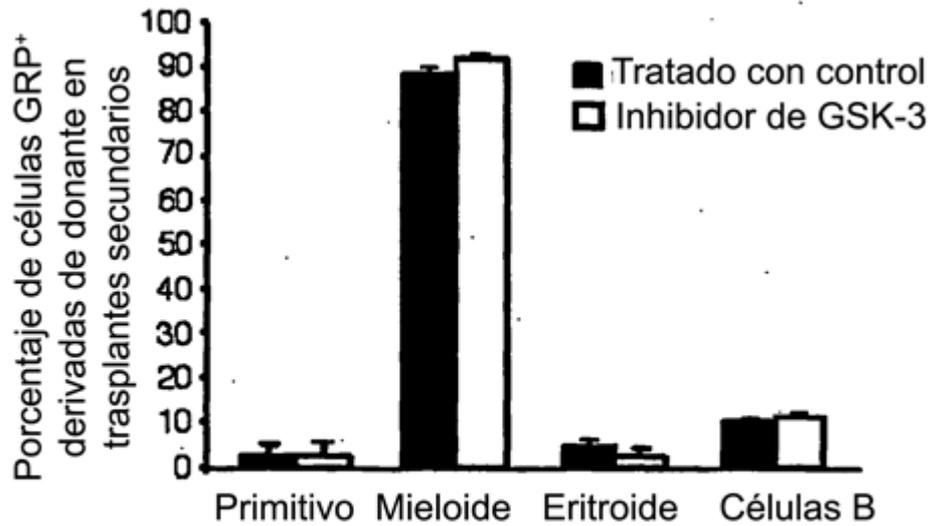
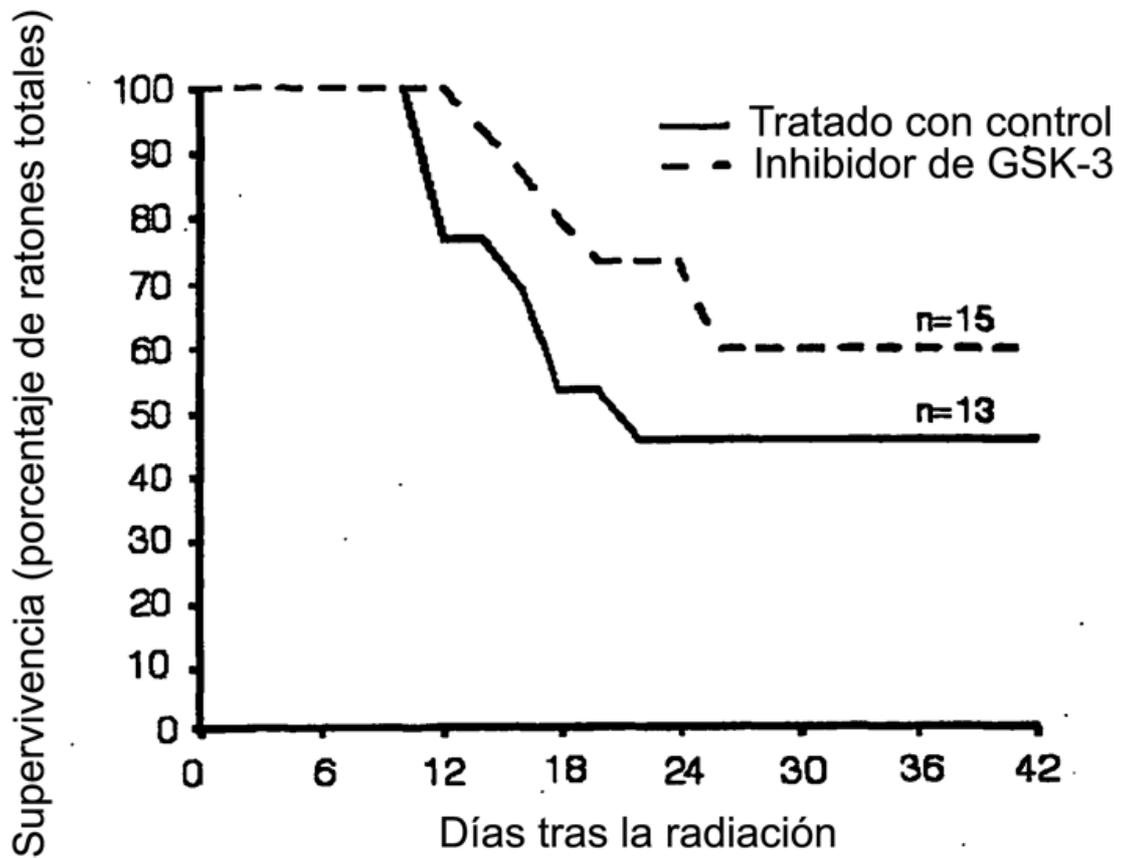
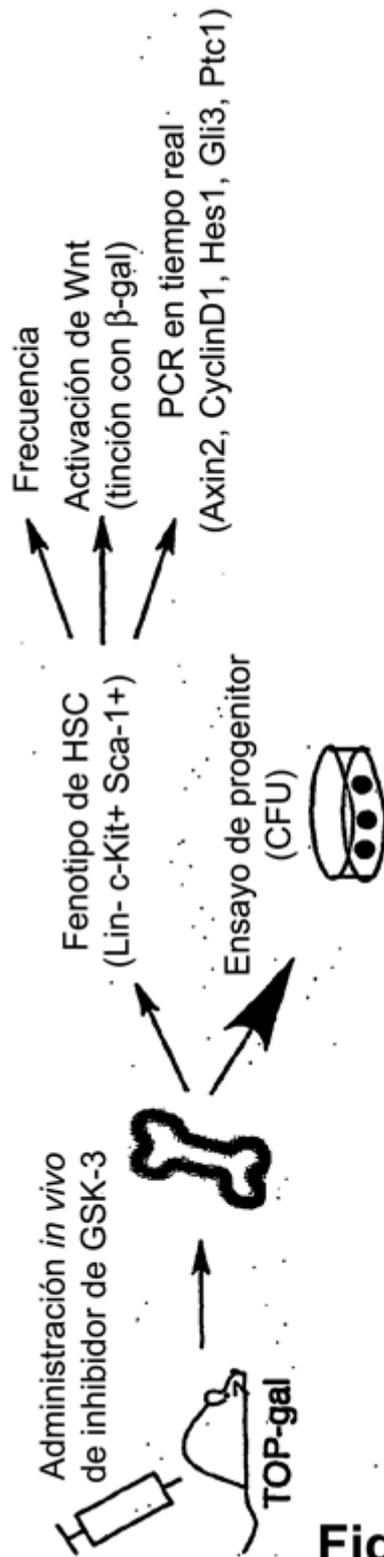


Figura 3h



**Figura 3i**



**Figura 4a**

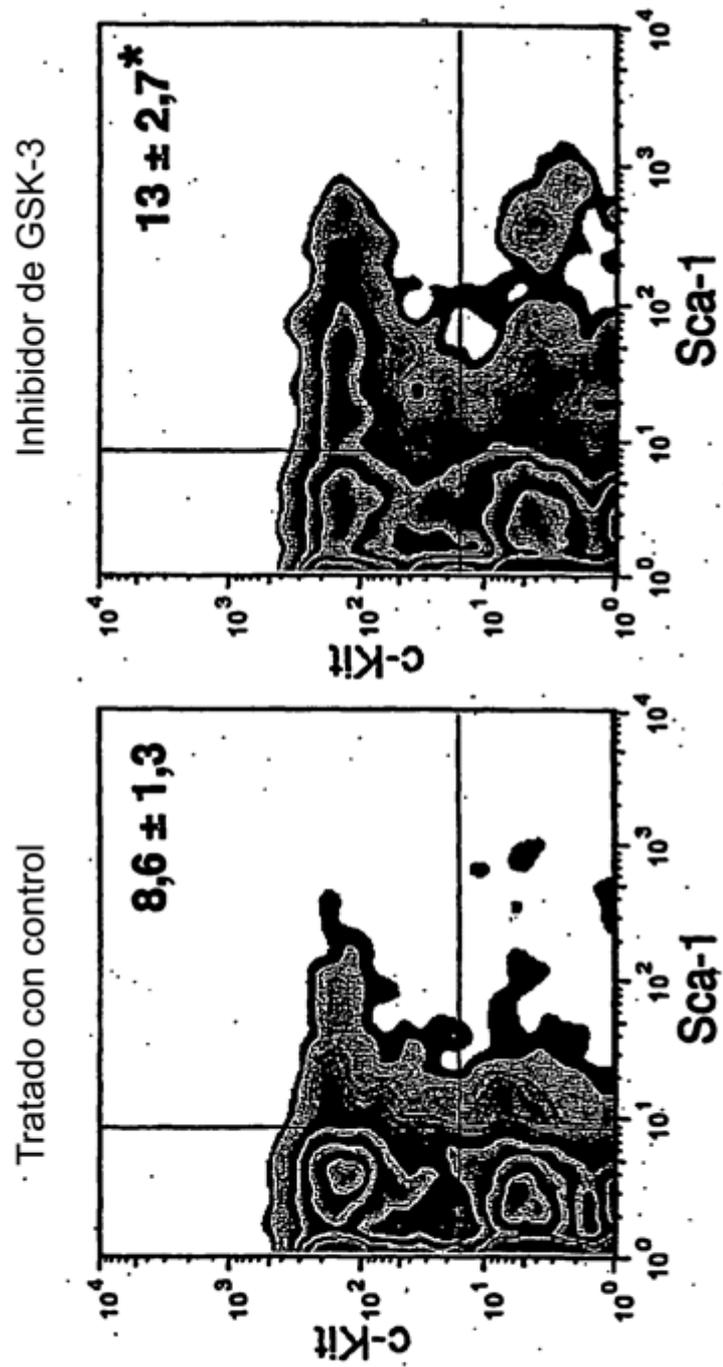
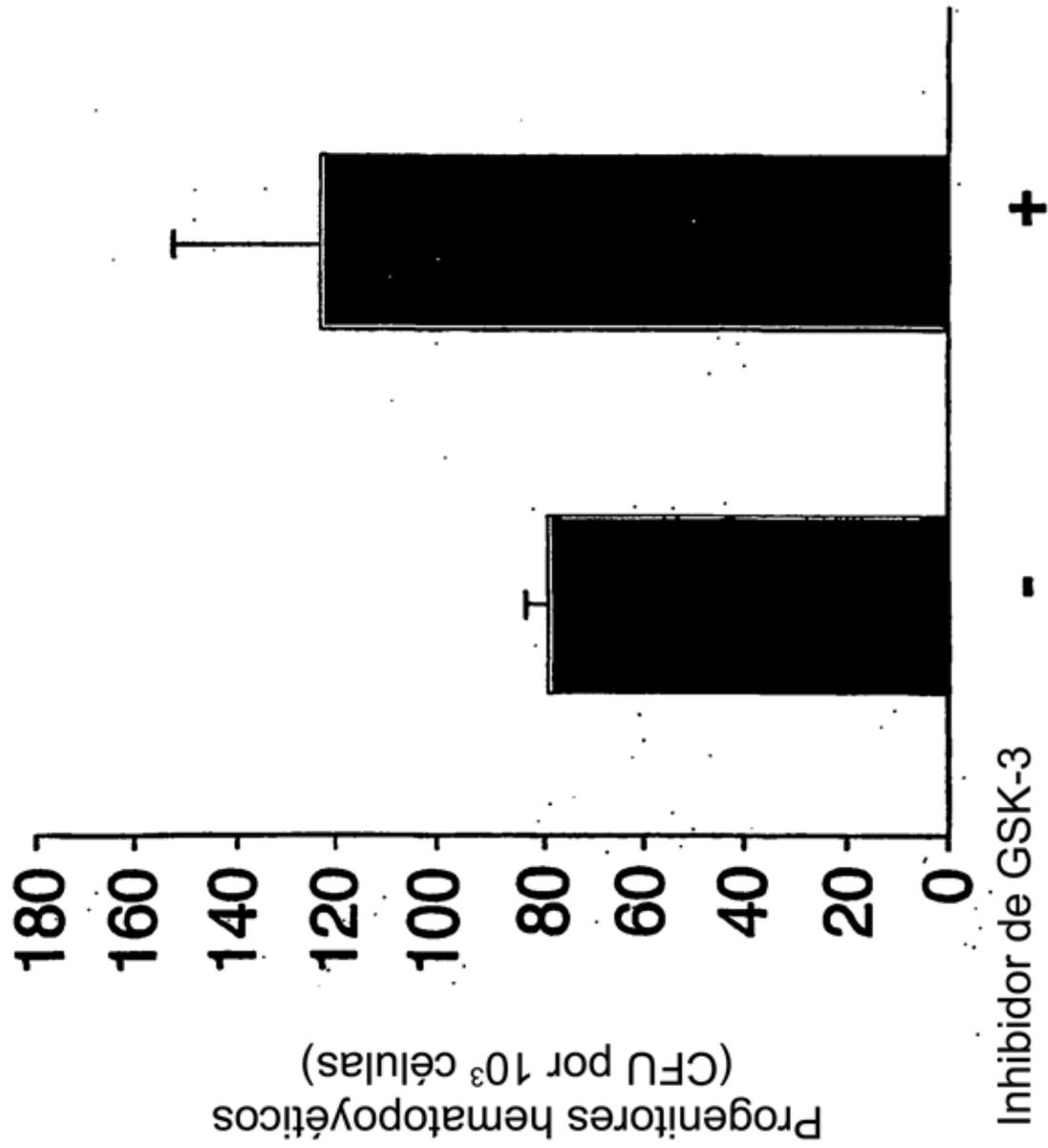


Figura 4b



**Figura 4c**

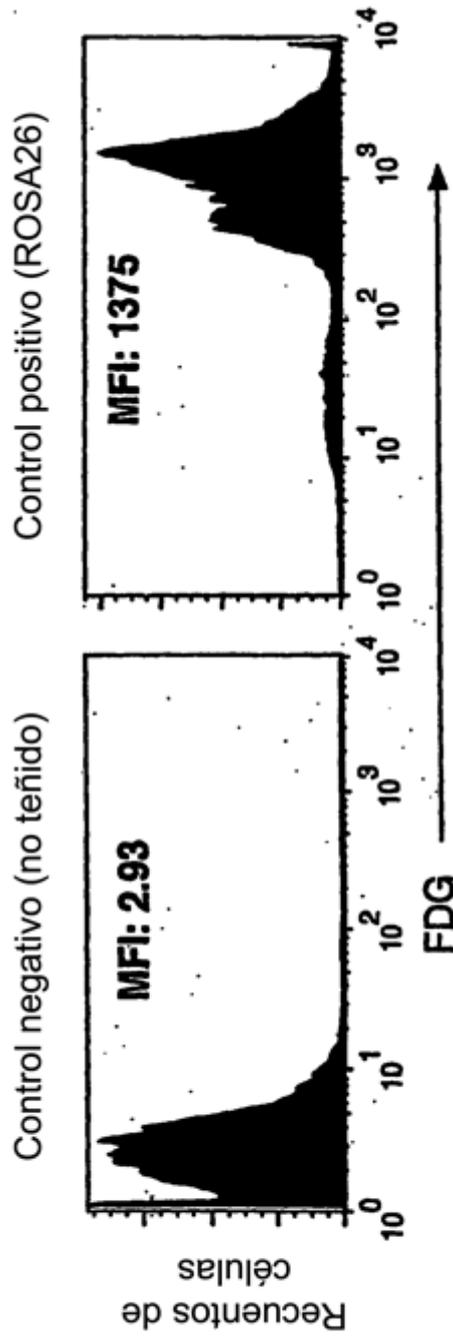


Figura 4d

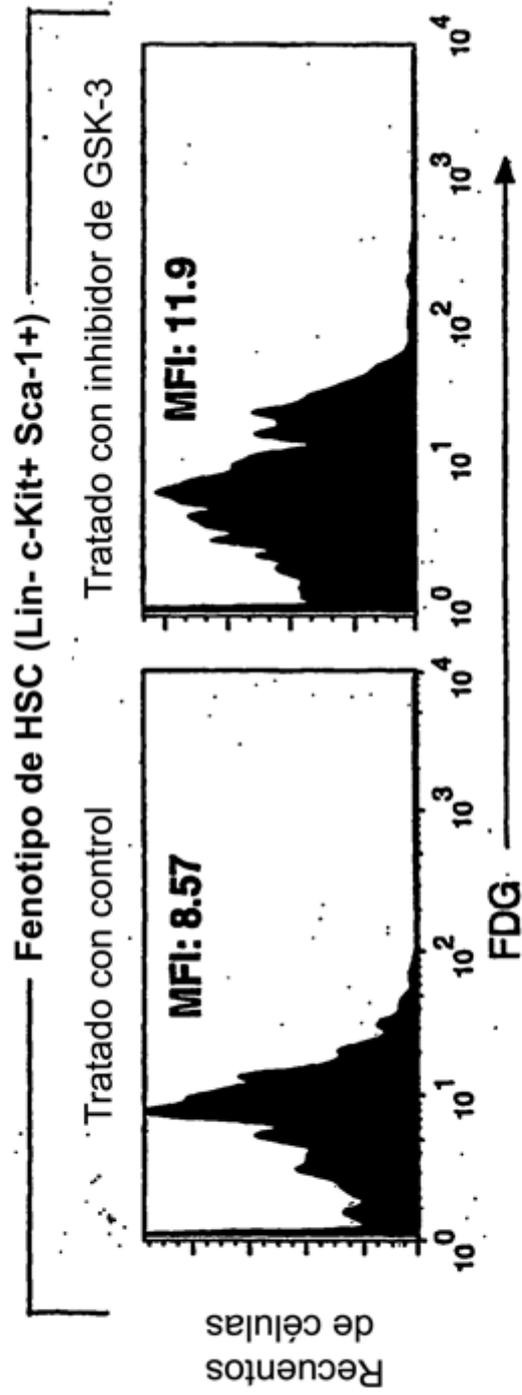


Figura 4e

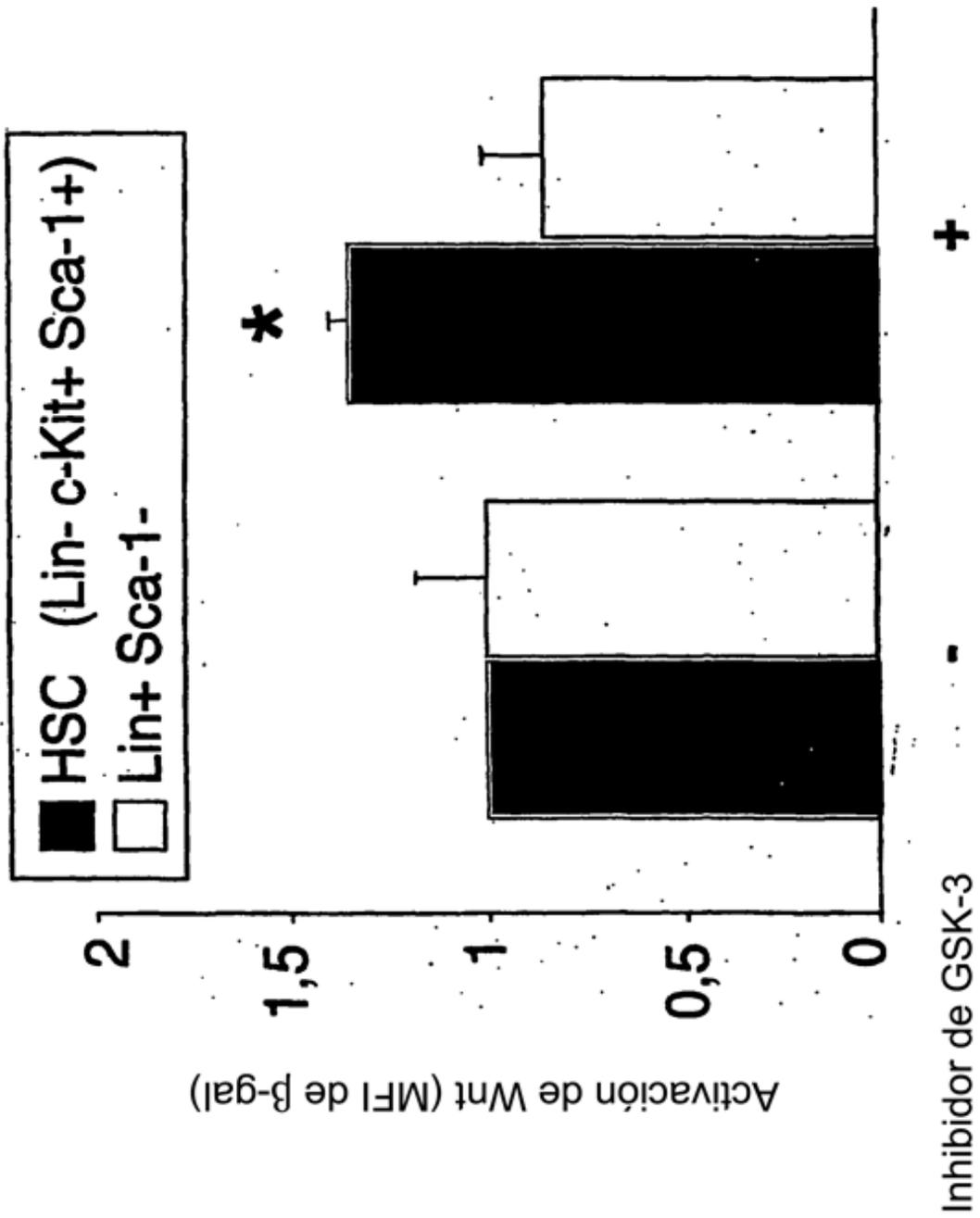


Figura 4f

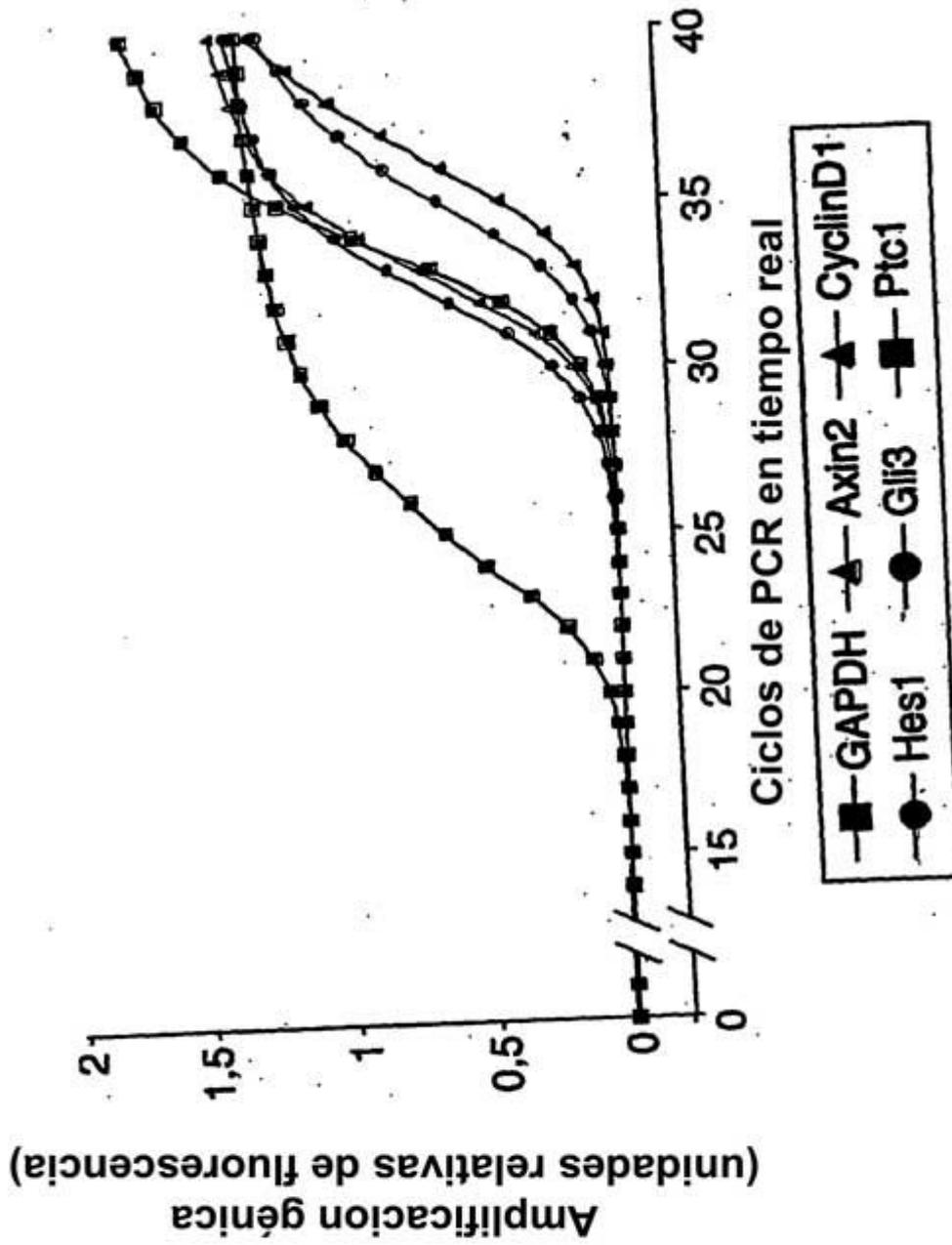


Figura 4g

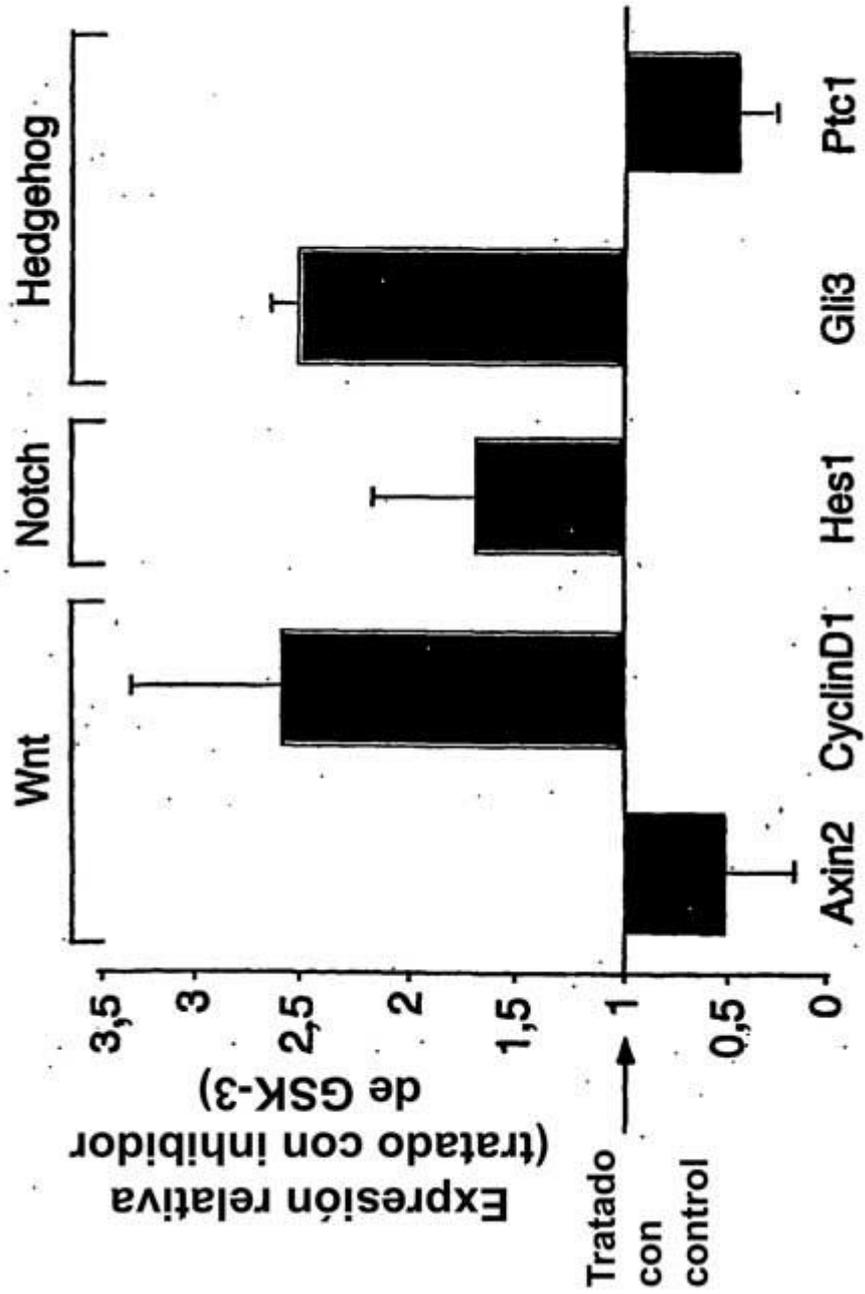


Figura 4h

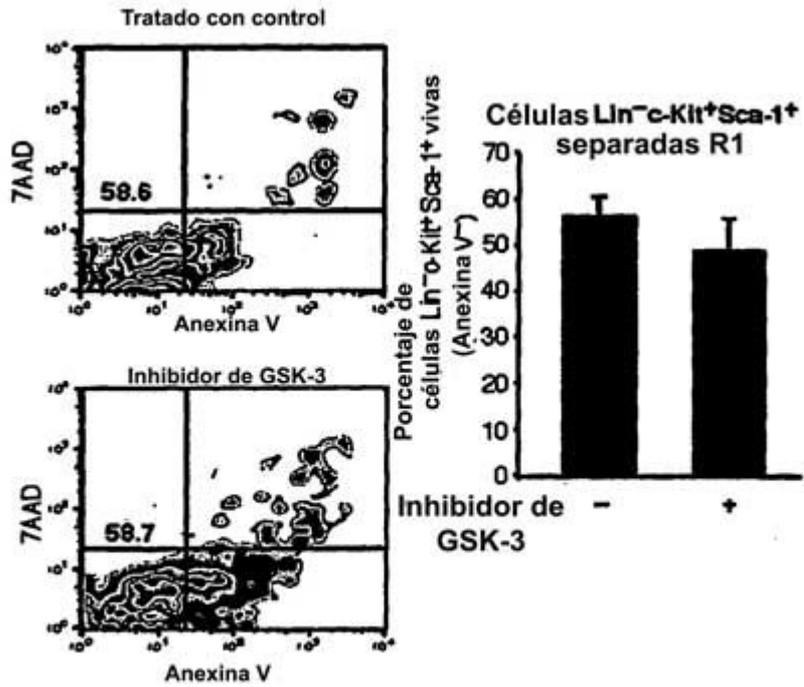


Figura 4i

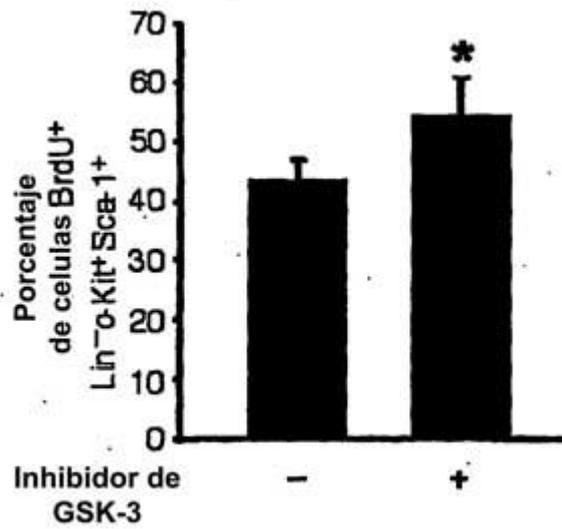


Figura 4j

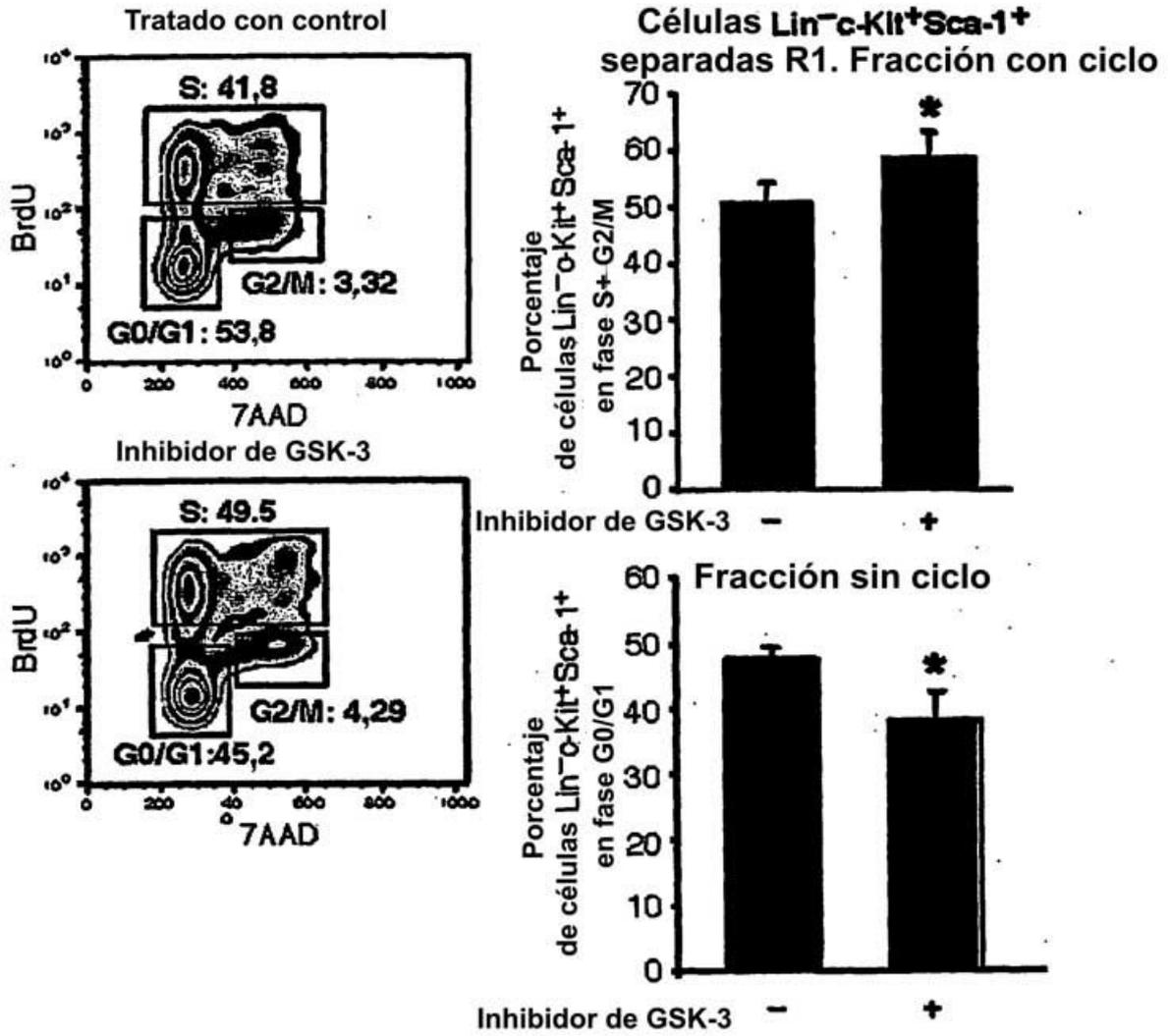


Figura 4k

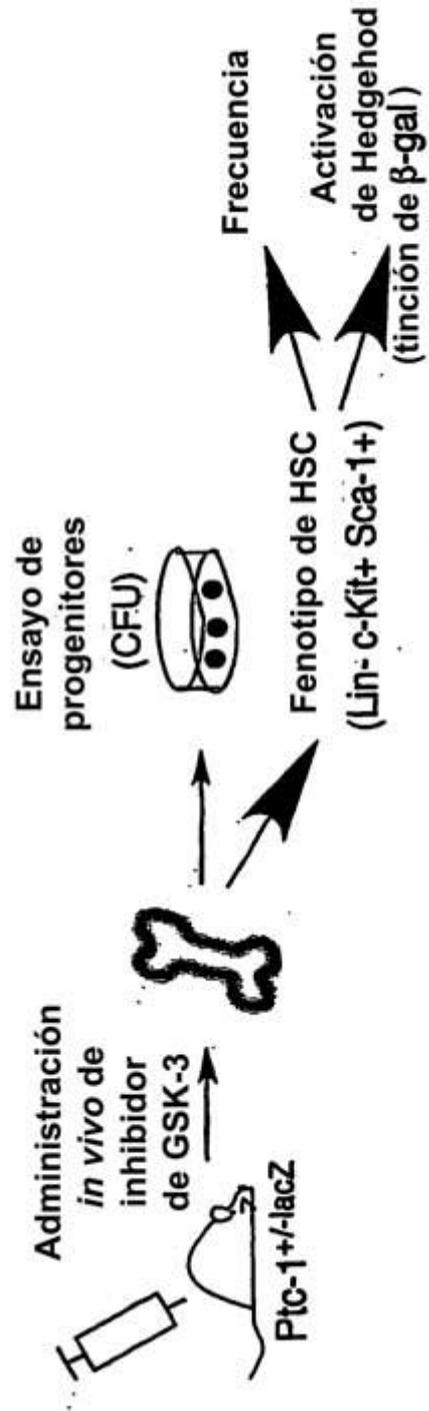


Figura 5a

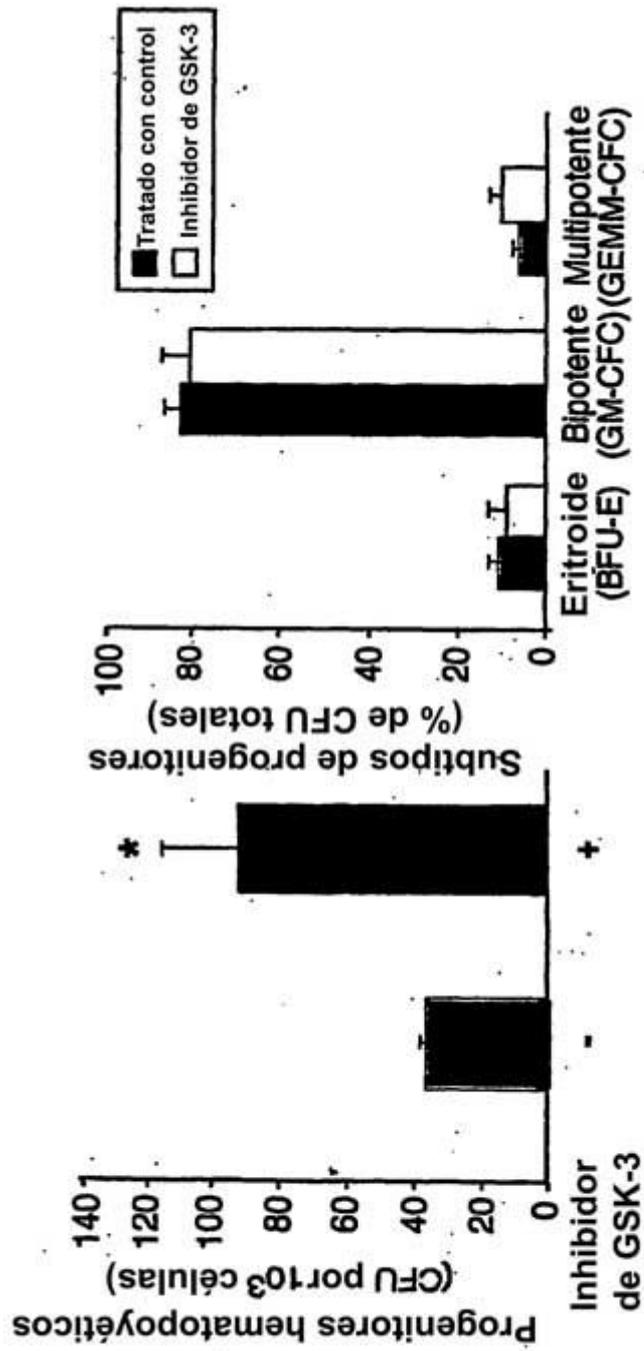


Figura 5b

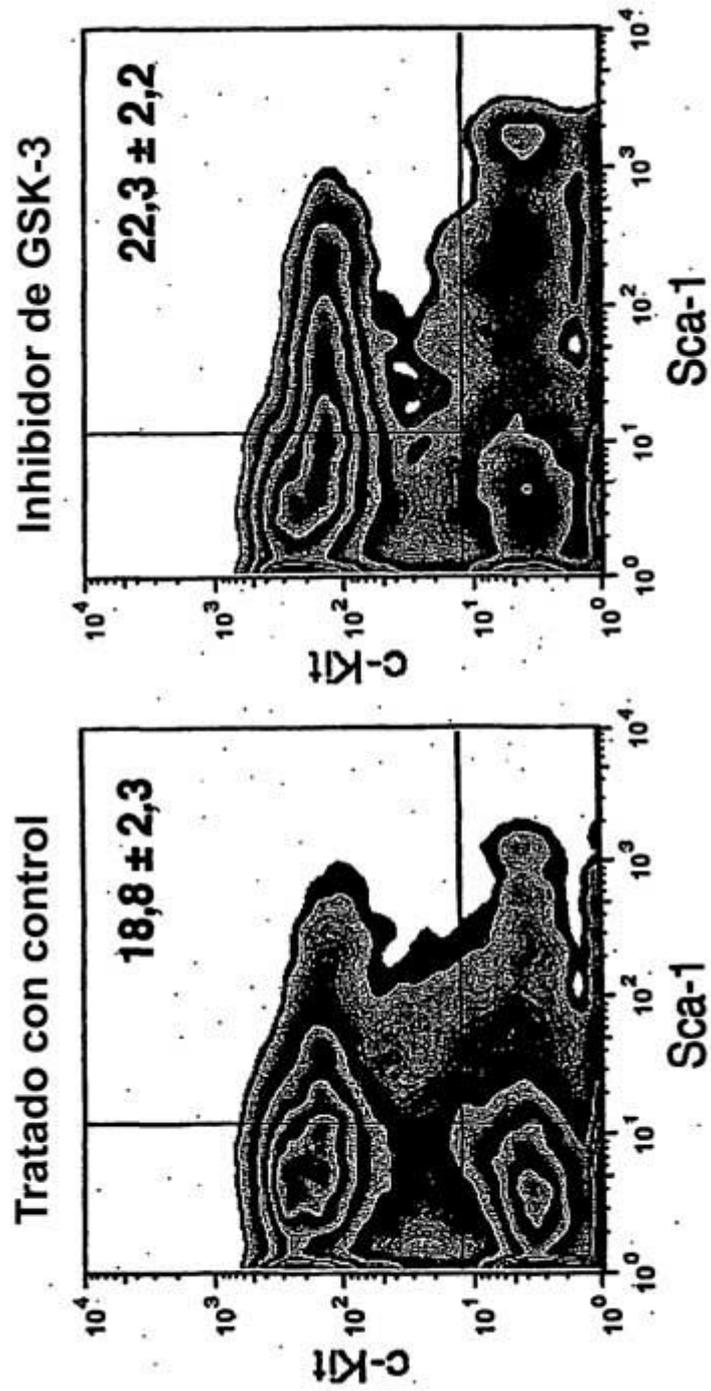


Figura 5c

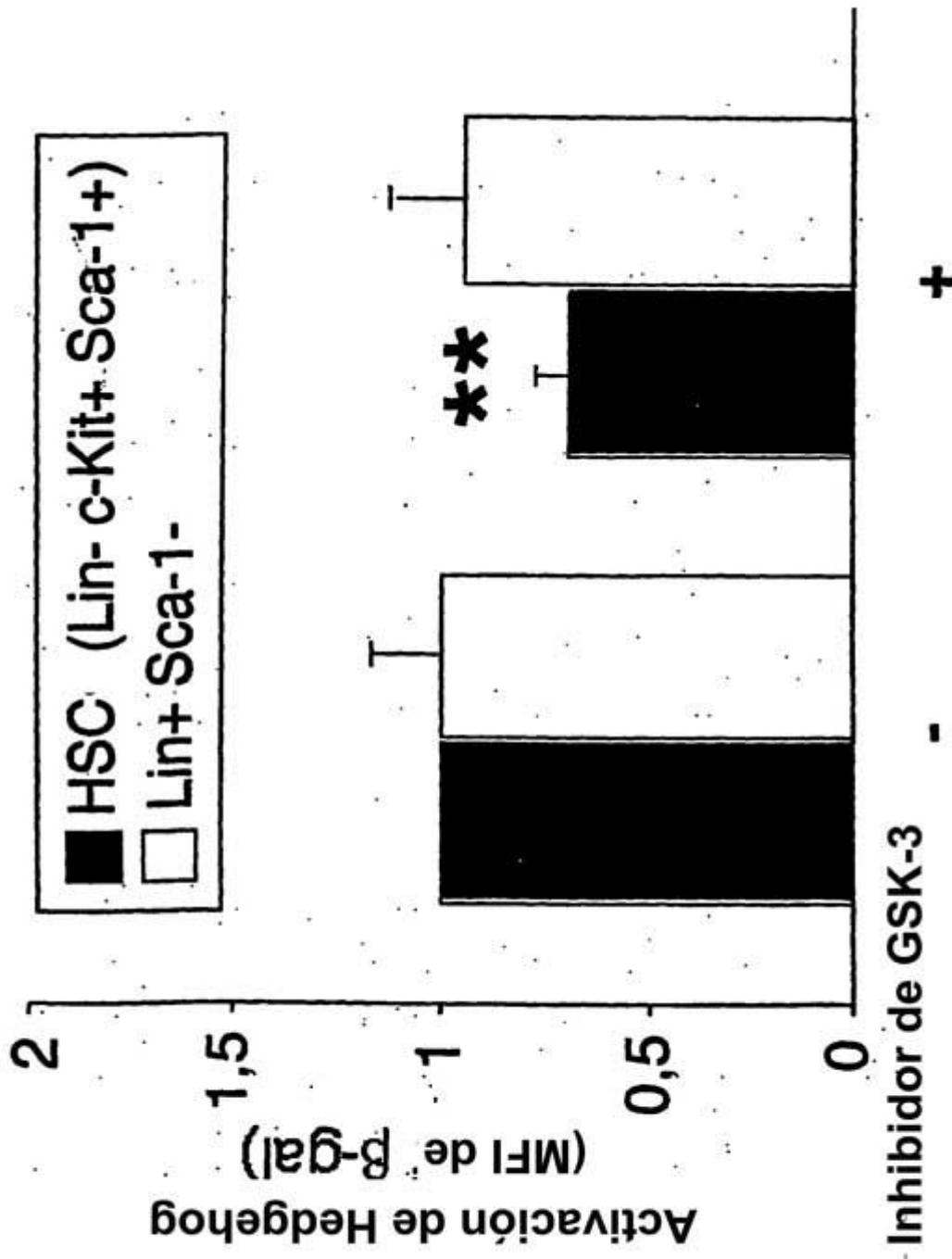


Figura 5d

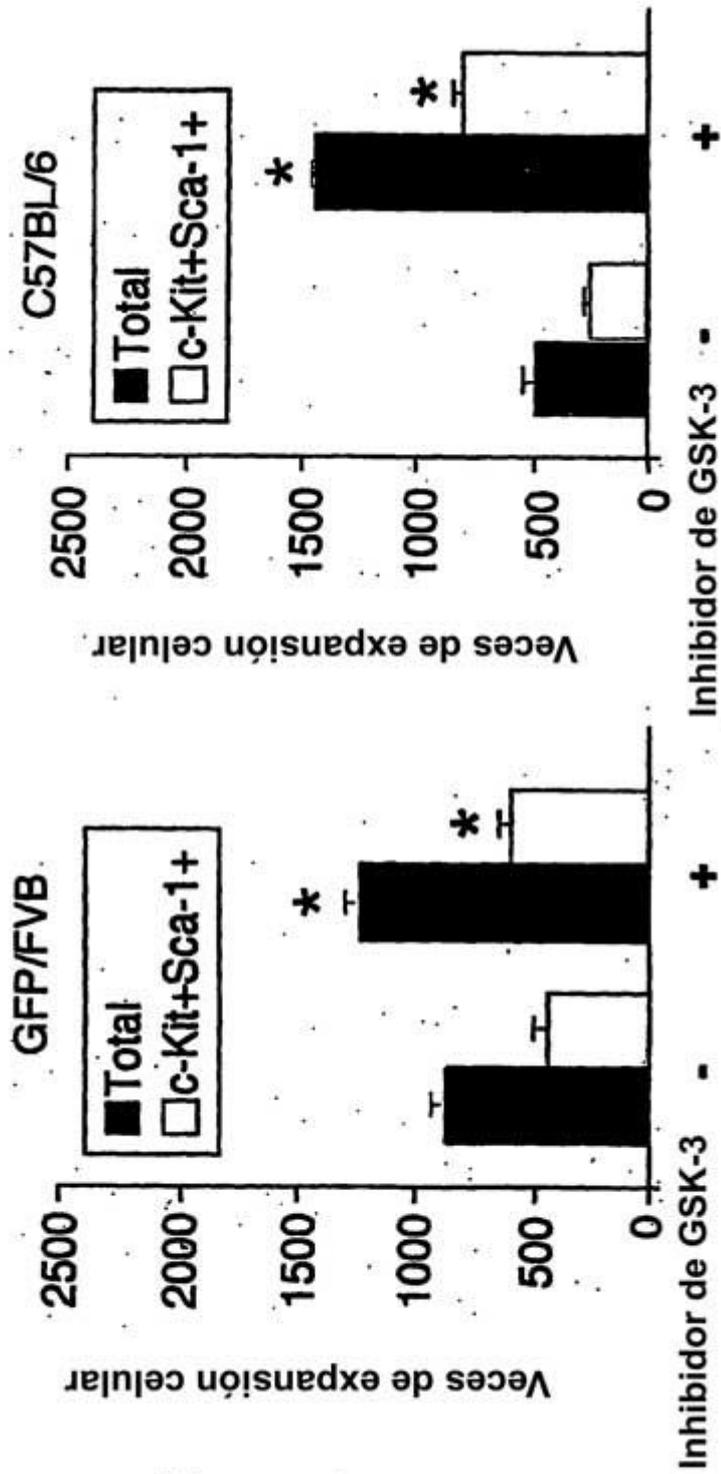


Figura 6a

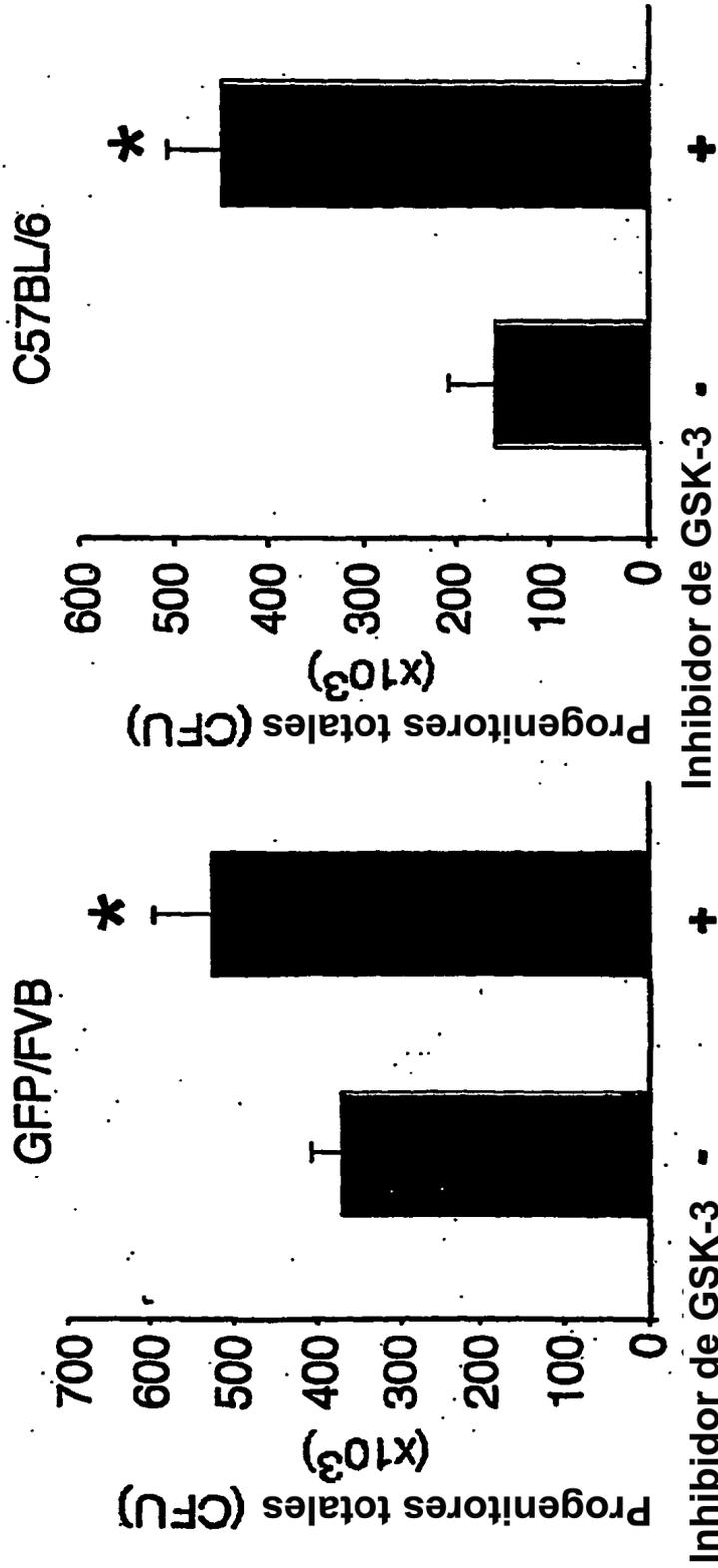


Figura 6b

Estimulación de 24 h

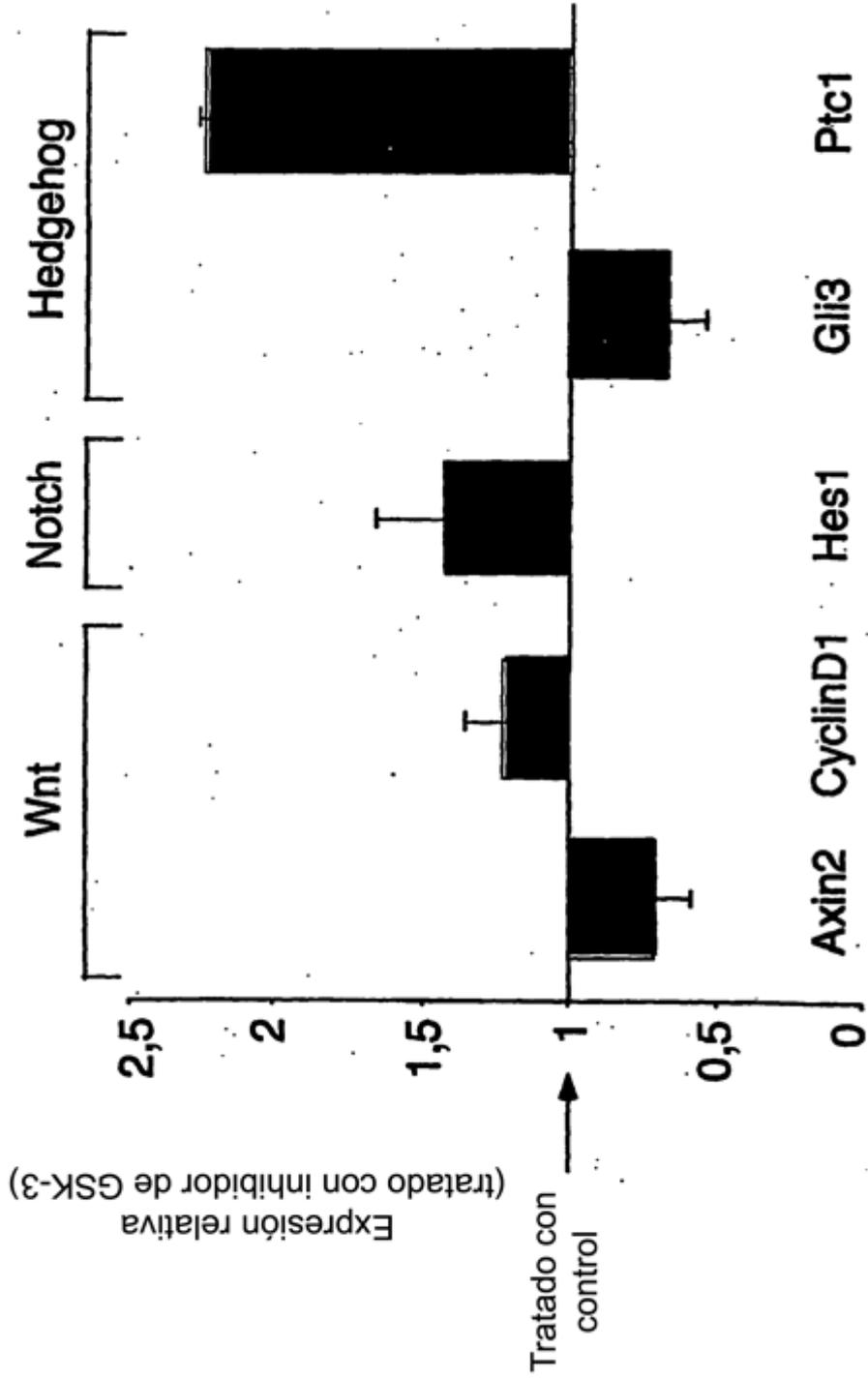


Figura 6c

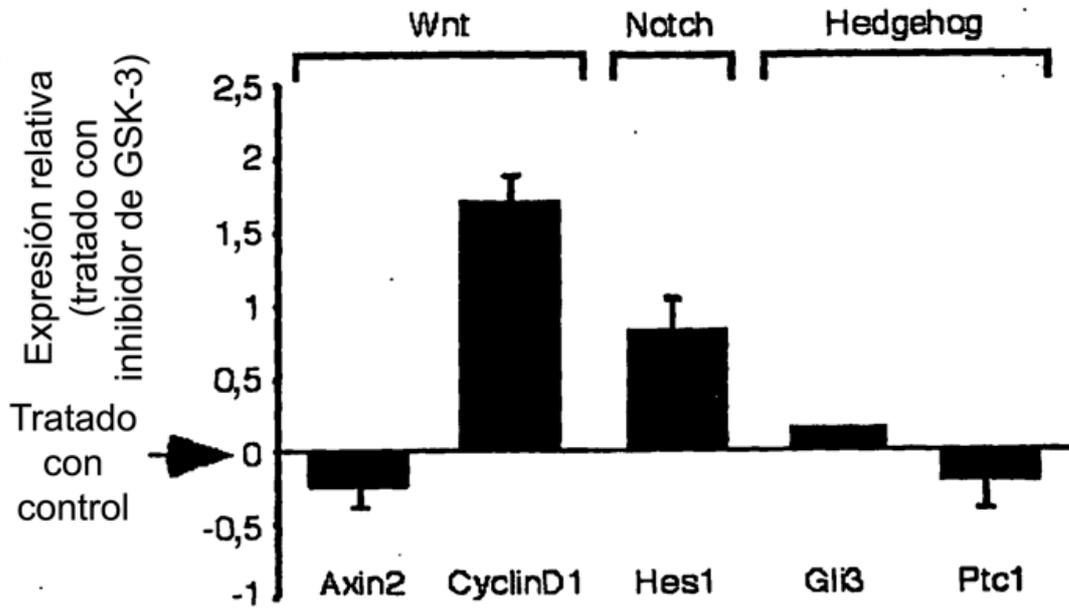


Figura 6d

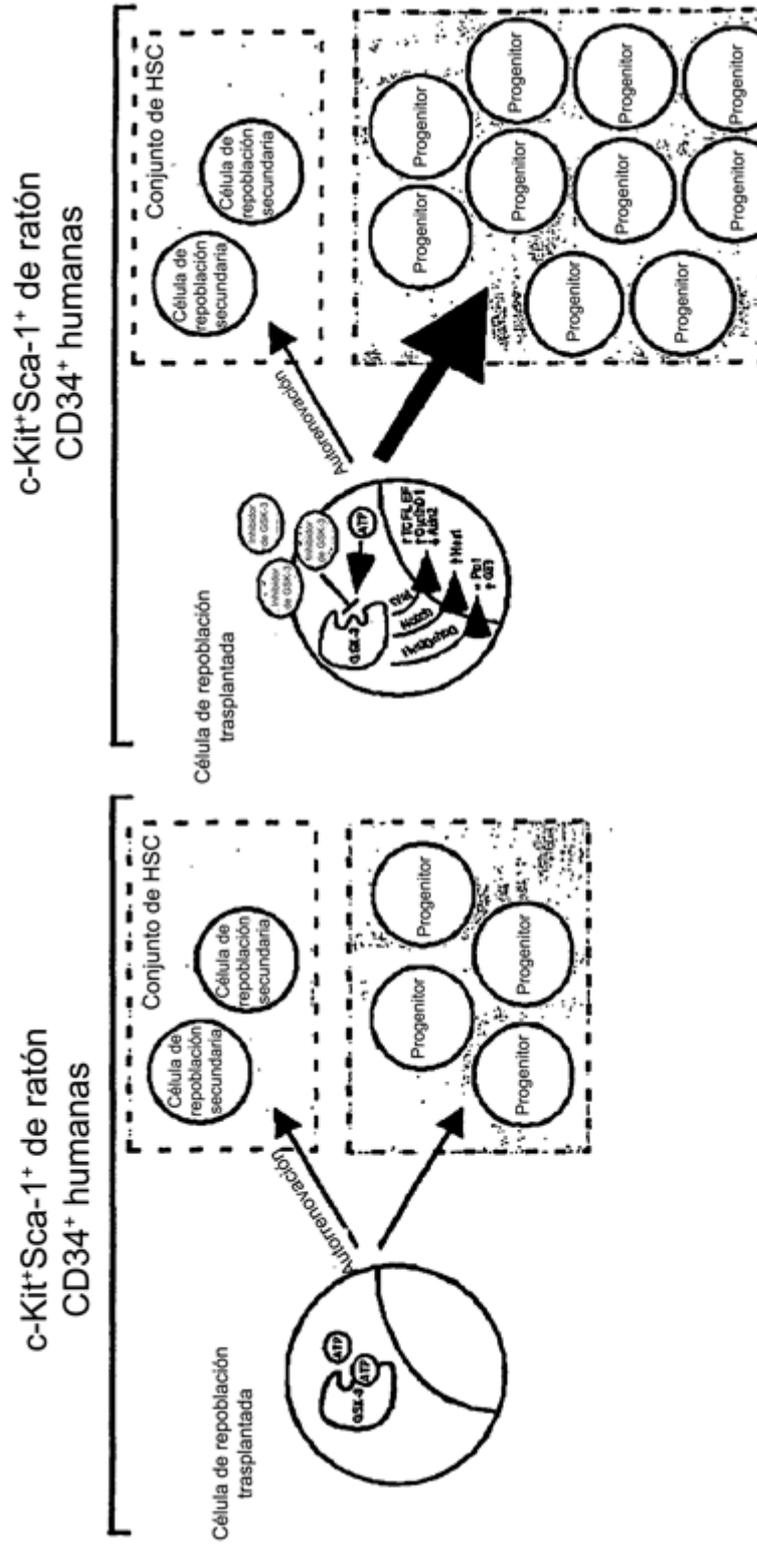


Figura 7