

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 606**

51 Int. Cl.:

C07K 14/46 (2006.01)
C07K 14/82 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2013** **PCT/US2013/031118**
87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013** **WO13148224**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013** **E 13768391 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018** **EP 2831103**

54 Título: **Propiedades antitumorales de Dickkopf3b**

30 Prioridad:

26.03.2012 US 201261615514 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.05.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL
SCHOOL (100.0%)
225 Franklin Street, 12th Floor
Boston, MA 02100, US**

72 Inventor/es:

**LEONARD, JACK L.;
LEONARD, DEBORAH, M. y
SIMIN, KARL, J.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 670 606 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

Propiedades antitumorales de Dickkopf3b

Campo técnico de la invención

La invención se refiere en general a propiedades y funciones supresoras de tumores de DKK3b y aplicaciones antitumorales y usos de la misma. Más particularmente, la invención se refiere a nuevos productos terapéuticos y métodos para tratar tumores y cánceres utilizando funciones supresoras de tumores de DKK3b, por ejemplo, mediante suministro específico de sitio de DKK3b o un agente relacionado.

Antecedentes de la invención

La expresión de Dickkopf-3 (DKK3) suprimida es un distintivo de muchos cánceres humanos y sus niveles de expresión están inversamente relacionados con la virulencia tumoral (por ejemplo, en cáncer de próstata y cáncer ovárico). Usando el cáncer de próstata como un ejemplo, la sobreexpresión de DKK3 detiene la proliferación de células de cáncer de próstata, pero las consecuencias beneficiosas de la sobreexpresión de DKK3 en modelos tanto *in vivo* como *ex vivo* de cáncer de próstata probablemente sean un artefacto del inicio involuntario de una respuesta de tensión de RE que intenta procesar un producto génico secretor, exógeno, sobreexpresado. (Abarzua, *et al.* **2005** *Cancer Res* 65(21): 9617-22; Abarzua, *et al.* **2008** *BiBSochem Biophys Res Commun* 375(4): 614-8; Abarzua, *et al.* **2007** *Int JMol Med* 20(1): 37-43).

También se ha indicado que la actividad supresora tumoral de DKK3 se debe a su capacidad para bloquear la translocación de β -catenina al núcleo formando un complejo inactivo compuesto de un producto génico de DKK3 de ~30 kDa citoplasmático y β TrCP. (Lee, *et al.* **2009** *Int J Cancer* 124(2): 287- 97.) Ya que es improbable que la tensión de RE crónica sea el mecanismo por el que los productos génicos de DKK3 endógenos influyen en la proliferación de células normales, la identificación de una versión intracelular, no secretada, de DKK3 y el descubrimiento de dos acontecimientos intracelulares (activación de JNK e inactivación de β -catenina) que facilitan la detención del crecimiento ofrecen una oportunidad para definir los acontecimientos moleculares que median en la función supresora tumoral de DKK3 en la próstata.

Estudios tempranos por el Dr. Leonard y colaboradores han descubierto que el locus génico de DKK3 codifica un segundo transcrito que produce una proteína de 29 kDa asociada a membrana intracelular (formalmente D2p29, ahora renombrada DKK3b). (Leonard, *et al.* **2000** *J Biol Chem* 275(33): 25194-201; Farwell, *et al.* **1996** *J Biol Chem* 271(27): 16369-74; Safran, *et al.* **1996** *J Biol Chem* 271(27): 16363-8; Farwell, *et al.* **1993** *J Biol Chem* 268(7): 5055-62).

Estudios posteriores han revelado que este producto génico de DKK3b se originó a partir de un segundo sitio de inicio de la transcripción localizado en el intrón 2. DKK3b se identificó originalmente en astrocitos como una proteína de la membrana altamente transportada que se une con la hormona tiroidea con alta afinidad. El análisis del locus génico de DKK3 reveló que DKK3b está codificado por los exones 3-8 y que un sitio de inicio de la transcripción funcional, con una caja TATA, se localiza en el intrón 2 (**FIG. 1A**). Los estudios de mapeo de promotores han estrechado la actividad promotora hasta ~250 bases cadena arriba del exón 3. La supresión de la caja TATA bloqueó la función promotora. El análisis de ChIP ha revelado que este promotor era funcional *in vivo* (**FIG. 1b**).

Es importante que, en los ARNm tanto de DKK3 de longitud completa como de DKK3b truncado, el único sitio de inicio de Kozak auténtico se localiza en el inicio de Met en el exón 3 y la traducción *in vitro* de ARNm de DKK3a de longitud completa usando condiciones dependientes del contexto de Kozak produce una proteína de 29 kDa. (Leonard, *et al.* **2000** *J Biol Chem* 275(33): 25194-201). El análisis por PCR en tiempo real de transcritos del locus de DKK3 reveló que el transcrito de DKK3a (exones 2-8) representaba ~55 % de los ARNm de DKK3 totales, mientras que el transcrito de DKK3b (exones 3-8) aportaba ~45 % de los ARNm de DKK3 totales. En el ratón Δ DKK3 que carece de los exones 2, los transcritos de DKK3a de longitud completa se pierden, pero el ARNm de DKK3b se conserva. (**FIG. 1C**). (Barrantes, *et al.* **2006** *Mol Cell Biol* 26(6): 2317-26). El marcaje de afinidad de DKK3b asociado con las membranas celulares de cerebro de ratón Δ DKK3 produjo la DKK3b inmunoreactiva anticipada, mientras que no se sintetizó una DKK3 glucosilada de longitud completa. (**FIG. 3D**). (Farwell, *et al.* **1989** *J Biol Chem* 264(34): 20561-7). Estos datos demuestran que el locus de DKK3 codifica dos transcritos funcionales; uno que codifica una glucoproteína secretada identificada como DKK3a y el otro, una proteína DKK3b de 29 kDa intracelular.

Sigue existiendo una necesidad continuada de establecer enfoques terapéuticos novedosos para el tratamiento del cáncer utilizando función supresora tumoral de DKK3b, por ejemplo, metodologías del tratamiento y composiciones farmacéuticas que puedan detener el crecimiento de diversos cánceres, tales como cánceres ováricos y de próstata.

Abarzua F. *et al.*, "An N-terminal 78 amino acid truncation of REIC/Dkk-3 effectively induces apoptosis", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, Estados Unidos, vol. 375, n.º 4, páginas 614 – 618, describe un fragmento de 78 aa N terminal de DKK3 humana que presenta propiedades apoptóticas.

Jiirgen Veeck *et al.*, "Targeting the Wnt pathway in cancer: The emerging role of Dickkopf-3", BBA - REVIEWS ON CANCER, ELSEVIER SCIENCE BV, ÁMSTERDAM, Países Bajos, vol. 1825, n.º 1, páginas 18 - 28, y Abarzua F. *et al.*, "Adenovirus-mediated overexpression of REIC/Dkk-3 selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of c- Jun- NH2-kinase.", CANCER RES., (2005), vol. 65, n.º 21, páginas 9617 - 9622, describe que DKK3 actúa de forma intracelular mediante Quinasa Jun o asociación a β -catenina.

Sumario de la invención

La invención proporciona enfoques terapéuticos novedosos para el tratamiento del cáncer que aprovechan las funciones supresoras tumorales de DKK3b. Se ha identificado un supresor tumoral novedoso que se origina desde un sitio de inicio de la transcripción interno del locus génico de DKK3 que alberga todas las propiedades antineoplásicas. En lugar de los intentos terapéuticos actuales que se dirigen todos a una respuesta de tensión de RE artificial debida a la expresión exógena del producto génico de DKK3 de longitud completa secretado y glucosilado, la presente invención pretende proporcionar un enfoque único que cambia la dirección del campo.

En un aspecto, la invención se refiere en general a una forma truncada de una proteína Dickkopf 3 (DKK3) humana aislada, que está codificada por los exones 3-8 del locus génico de DKK3.

Otros aspectos de la invención son como se definen en las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a enfoques terapéuticos novedosos para el tratamiento del cáncer que aprovechan las funciones supresoras tumorales de DKK3b. Más particularmente, se ha identificado un supresor tumoral novedoso que se origina desde un sitio de inicio de la transcripción interno del locus génico de Dkk3 y este producto génico alberga todas las propiedades antineoplásicas de este gen. En lugar de los intentos terapéuticos actuales que se dirigen todos a una respuesta de tensión de RE artificial debida a la expresión exógena del producto génico DKK3 secretado y glucosilado de longitud completa, la presente invención pretende proporcionar un enfoque único que cambiará la dirección del campo.

La señalización incontrolada por la molécula de señalización de la ruta de Wnt, β -catenina, es habitual en el cáncer y la proteína relacionada con Dickkopf 3 (DKK3) es una de las moléculas supresoras tumorales más prometedoras que controlan los niveles de β -catenina. La malignidad tumoral está inversamente relacionada con los niveles de DKK3 y la sobreexpresión detiene la proliferación celular en casi todas las células cancerosas. Incluso aunque DKK3 no bloquee la activación del receptor por Wnt, se supone ampliamente que las acciones antineoplásicas de la glucoproteína DKK3 secretada se deben a la inhibición del complejo de receptor de Wnt. Sin embargo, informes recientes ponen en duda esta visión convencional de la acción de DKK3. El análisis de dos híbridos de levadura reveló que DKK3 interaccionaba con la ubiquitina ligasa, proteína que contenía repeticiones de β -transducina (β TrCP) y estudios posteriores de coimmunoprecipitación identificaron DKK3 como parte de un complejo intracelular con (β TrCP) y β -catenina que evitan la translocación nuclear de β -catenina. También se ha mostrado que DKK3 activa la ruta de tensión de Jun quinasa (JNK) N terminal lo que conduce a pérdida de células cancerosas. Estos hallazgos ilustran un papel importante para la señalización intracelular por DKK3. Se ha descubierto recientemente que el locus *Dkk3* codifica dos productos génicos, una glucoproteína secretada (DKK3a) que no influye en la segregación de Wnt, y una proteína intracelular novedosa, DKK3b, que inhibe la señalización de Wnt. Los inventores proponen que la DKK3b intracelular es responsable de los efectos antineoplásicos publicados de este supresor tumoral y actúa bloqueando la importación nuclear de β -catenina y aumentando la muerte celular, dos acontecimientos celulares fundamentales que detienen el crecimiento tumoral y la propagación.

El mecanismo molecular de la acción de DKK3b

Existe un acuerdo general de que 1) los niveles de expresión de DKK3 están inversamente relacionados con la malignidad tumoral y que 2) la sobreexpresión de DKK3 detiene la proliferación de células cancerosas. (Lodygin, *et al.* **2005** *Cancer Res* 65(10):4218-4227; Veeck, *et al.* **2008** *Breast Cancer Res* 10(5):R82; Veeck, *et al.* **2012** *Biochim Biophys Acta* 1825(1): 18-28; Yue, *et al.* **2008** *Carcinogenesis* 29(1):84-92; Edamura, *et al.* **2007** *Cancer Gene Ther* 14(9):765-772; Gu, *et al.* **2011** *World J Gastroenterol* 17(33):3810-3817; Medinger, *et al.* **2011** *Thrombosis and haemostasis* 105(1):72-80; Pei, *et al.* **2009** *Virchows Arch* 454(6):639-646). A pesar de estos hallazgos, el mecanismo o los mecanismos de acción de DKK3 siguen siendo completamente desconocidos. A diferencia de otros miembros de la familia DKK, DKK3 no se une con el complejo de receptor de Wnt. (Niehrs, *et al.* **2006** *Oncogene* 25(57):7469-7481; Barrantes, *et al.* **2006** *Mol Cell Biol* 26(6):2317-2326). Además, la supresión de un gen de DKK3 de ratón produjo un fenotipo benigno sin aumento en la formación de tumores.

El descubrimiento por parte de los inventores de un producto génico de DKK3 intracelular novedoso, DKK3b (previamente denominado D2p29), producido a partir de transcritos que se originan desde un sitio de inicio interno, redefine y reconcilia estas observaciones dispares. (Leonard, *et al.* **2000** *JBiol Chem* 275(33):25194-25201). DKK3b posee todos los efectos antitumorales previamente atribuidos a DKK3a. De hecho, la estrategia de dirección usada para suprimir la DKK3 de ratón anuló solamente DKK3a, dejando DKK3b intacto, lo que explica por lo tanto la falta

de tumorigénesis aumentada. (Barrantes, *et al.* **2006** *Mol Cell Biol* 26(6):2317-2326).

Estudios recientes muestran que DKK3 se une específicamente con el componente de ubiquitina ligasa E3, proteína que contiene repetición de β transducina (β TrCP), y que este complejo a su vez se une con β -catenina no fosforilada lo que evita su importación nuclear. (Lee, *et al.* **2009** *Int J Cancer* 124(2):287-297; Hoang, *et al.* **2004** *CancerRes* 64(8):2734-2739). Ya que la barrera de membrana hace improbable que la glucoproteína DKK3a secretada actúe dentro de la célula por asociación directa con la maquinaria de ubiquitina ligasa E3, el producto génico DKK3b novedoso se convierte en el supresor tumoral probable responsable de la atenuación de la señalización de Wnt. El entendimiento de los detalles de cómo DKK3b detiene el crecimiento tumoral ofrece una oportunidad real de desarrollar productos terapéuticos eficaces que derroten la oncogénesis en su fuente.

La presente invención define el mecanismo o los mecanismos moleculares de la función supresora tumoral de DKK3b usando células cancerosas tanto de próstata como de mama como modelos para cánceres en general y aborda los efectos antitumorales de suministro específico de sitio de DKK3b. Redirigiendo la atención del trabajo al supresor tumoral auténticamente importante, la invención establece una base importante para enfoques terapéuticos racionales para el tratamiento del cáncer.

El análisis por ordenador reveló que DKK3b estaba codificada por los exones 3-8 del gen de *Dkk3*, y la presencia de este producto génico de DKK3 novedoso en los cerebros de los ratones *Dkk3*^{-/-} proporcionó información acerca de sus orígenes. (Barrantes, *et al.* **2006** *Mol Cell Biol* 26(6):2317-2326). La supresión del exón 2 del locus *Dkk3* de ratón (**FIG. 1a**) eliminó claramente la expresión de DKK3a, pero no afecta a los transcritos de DKK3b que comienzan en el exón 3 (**FIG. 1b**) y condujeron a un aumento casi triple de la proteína DKK3b de ~30 kDa (**FIG. 1c**). La actividad promotora se localizó a ~250 bases cadena arriba del exón 3, y la supresión de la caja TATA bloqueó la función promotora. El análisis de ChIP mostró que el promotor de DKK3b era funcional *in vivo* (**FIG. 1d, 1e**). La QPCR usando conjuntos de cebadores de DKK3 específicos de exón 2 y exón 3 descubrió que el transcrito de DKK3a (exones 2-8) representaba el 50-55 % del ARNm en células primarias, mientras que el transcrito de DKK3b (exones 3-8) aportaba ~45 % del total. Estos datos muestran que el gen de *Dkk3* codifica dos transcritos funcionales: uno que codifica una glucoproteína secretada de ~60 kDa DKK3a; y una segunda proteína intracelular de 30kDa, DKK3b.

Para evaluar la función supresora tumoral de los dos productos génicos de DKK3, DKK3a y DKK3b se clonaron en el vector de expresión, inducible por Tet (pTRex), y se transfectaron en células de tumor de próstata PC3 que expresan de forma constitutiva la proteína represora de Tet. Los datos en la **FIG. 2** muestran que DKK3a no ralentiza el crecimiento celular. Por otro lado, DKK3b detiene completamente la proliferación celular y conduce a la pérdida de células PC3 en puntos temporales posteriores. Estos datos ilustran que DKK3a carece de la función supresora tumoral asociada con su forma intracelular, DKK3b.

Caracterización de los acontecimientos moleculares que median en la detención del crecimiento dependiente de DKK3b

La capacidad de DKK3b para detener la proliferación de células cancerosas podría deberse a detención del ciclo celular específica, apoptosis potenciada y/o senescencia celular inducida. Para explorar este acontecimiento o estos acontecimientos celulares sin la influencia confusa de aneuploidía/poliploidía y la inestabilidad genética que son inherentes en líneas celulares tumorales, se realizan estudios iniciales en astrocitos C8 inmortales. Estas células tienen un número de copias de genes 2N estable y muestran todas las propiedades de un astrocito primario. Se transfectan fácilmente y tienen DKK3b nativa marginal. Las DKK3b marcadas con epítomos se vuelven a expresar en células C8 usando el sistema de expresión de pTRex inducible por tetraciclina (tet) que puede valorarse para generar células que albergan cantidades crecientes del supresor tumoral como se ilustra en células DU145 en la **FIG. 3**.

Ya que los inventores proponen que una de las acciones primarias de DKK3b se inicia deteniendo la importación nuclear de β -catenina, se usa un indicador de luciferasa TOPFlash conducido por TCF para supervisar la expresión génica dependiente de β -catenina. Se transfectaron células cancerosas de mama dependientes de Wnt MnuMG con DKK3a y DKK3b y la luciferasa conducida por TCF (pTOPFlash), y se determinaron los efectos de los dos productos génicos de DKK3 en la actividad indicadora estimulada por Wnt7a y basal. Como se muestra en la figura 4, la estimulación con Wnt dio como resultado un aumento de 10-14 veces de la señalización TOPFlash en ausencia de cualquier DKK3 o en presencia de la DKK3a inactiva. La expresión de DKK3b redujo la señalización de TOPFlash hasta niveles casi basales. Estos datos ilustran la capacidad específica de DKK3b para silenciar la señalización de β -catenina, una tesis central de la base molecular para la acción de este supresor tumoral.

Para confirmar las interacciones directas entre β TrCP y DKK3b, la atenuación mediada por ARNi de β TrCP en células indicadoras C8 pTOPFlash se usa para explorar la influencia de la expresión de β TrCP alterada en la capacidad de DKK3b para suprimir la expresión indicadora de TCF. Los controles incluyen los grupos de ARNi mezclados y/o lentivirus de ARNihp fuera de diana y la eficacia de la atenuación se miden por inmunotransferencia e inmunocitoquímica. La pérdida de β TrCP eliminará la supresión dependiente de DKK3b de actividad indicadora de TCF-TOPflash.

Basándose en estos estudios iniciales, la influencia de productos génicos derivados de Dkk3 en la proliferación celular y el ciclo celular se examinan en células LNCaP, PC3 y DU145 usando las construcciones de DKK3a y DKK3b inducibles por tet. Se realiza análisis de proliferación celular (WST-1), recuento de células viables y ciclo celular usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de células marcadas con BrdU/7-AAD.

- 5 Como se muestra en la **Tabla 1**, DKK3b detiene la célula PC3 de cáncer de próstata humano en la fase G0/G1 del ciclo celular, mientras que DKK3a no tuvo ningún efecto en el ciclo celular o en la proliferación celular (véase también **FIG. 2**).

TABLA 1. Efectos de DKK3a y DKK3b en el ciclo celular en células PC3.

	Análisis del ciclo celular (% células totales)		
	G0/G1	S	G2/M
control	44,1	27,2	17,1
DKK3a	42,3	28,5	16,3
DKK3b	95,7	2,6	1,2

10 Debido a que DKK3b condujo tanto a la detección del crecimiento como a pérdida de células PC3 (**FIG. 2**), la influencia de DKK3b en la apoptosis se evalúa usando citometría de flujo, ensayos TUNEL, análisis de caspasa 3 y tinción con anexina V. TUNEL, las mediciones de caspasa3 y la proliferación celular usando Ki67 se repiten usando enfoques inmunocitoquímicos convencionales para proporcionar confirmación de los efectos de DKK3b en la apoptosis determinados por análisis de flujo.

Una vez que se han establecido esos parámetros funcionales básicos, se examina el papel del complejo de DKK3b:βTrCP en la detención del crecimiento de células tumorales usando la estrategia de atenuación por ARNi de βTrCP detallada anteriormente para células C8. La pérdida de βTrCP en células cancerosas impediría la detención del crecimiento inducida por DKK3b. Los resultados de estos estudios establecerán el papel del complejo de DKK3b:βTrCP en la modulación de la señal de proliferación de β-catenina. DKK3b puede afectar a más de una ruta celular; sin embargo, centrándose en la caracterización específica del papel inhibitorio de un complejo de DKK3b:βTrCP en el crecimiento celular se proporciona una conexión clara entre la influencia bien conocida de β-catenina en la proliferación celular y la función supresora tumoral de DKK3b.

Identificación de ruta o rutas de señalización moduladas por DKK3b

Los inventores proponen que el complejo de DKK3b:βTrCP suprime la expresión génica conducida por TCF evitando que la β-catenina alcance su diana de TCF nuclear. Por lo tanto, el análisis de los más de 50 genes conducidos por TCF conocidos proporciona un criterio de valoración bien definido para evaluar la eficacia del complejo de DKK3b:βTrCP. (Willert, *et al.* **2002 BMC developmental biology** 2:8). RNA-seq proporciona un enfoque imparcial que permite el análisis del transcriptoma del conjunto completo de genes diana de TCF. Esta metodología de genómica contemporánea proporciona un conjunto de datos que no solamente permite evaluar los genes conducidos por TCF conocidos, sino que también se puede usar para encontrar cambios dependientes de DKK3b inesperados en el transcriptoma. RNA-seq es un enfoque significativamente más rentable y menos parcial que los conjuntos de matrices basados en PCR disponibles en el mercado cuando se tiene en cuenta el criterio de coste/datos. Para determinar la influencia de DKK3b en la expresión génica conducida por TCF, RNA-seq se usa para definir la influencia del complejo de DKK3b:βTrCP inhibitorio en la expresión de una cohorte conocida de ~110 dianas génicas conducidas por TCF.

A partir de los análisis de RNA-seq, se seleccionan 10-15 productos génicos y se usan para ensamblar una matriz de señalización de DKK3b (matriz de respuesta de DKK3b, DK3RA) para informar con fiabilidad de la función de DKK3b en células de cáncer de próstata y mama. Se confirman cambios en el contenido celular de esta proteína o estas proteínas diana usando ensayos de luminex EpiQuant de Millipore múltiples, de lisados celulares completos, análisis de inmunotransferencia o inmunocitoquímica. Estos estudios se diseñan para demostrar que el supresor tumoral de DKK3b inhibe la señalización de β-catenina y proporciona un conjunto validado de transcritos alterados de DKK3b (DK3RA) que pueden usarse para supervisar la función supresora tumoral. Adicionalmente, se generará y archivará un depósito de datos inestimable de transcritos alterados de DKK3b que puede usarse para encontrar compañeros de señalización novedosos.

El papel de las interacciones de DKK3b:βTrCP en la redistribución subcelular de β-catenina

La sobreexpresión de DKK3b puede iniciar la redistribución de β-catenina del citoplasma a la membrana celular sin alterar los niveles de β-catenina totales. (Hoang, *et al.* **2004 CancerRes** 64(8):2734-2739). Junto con el hallazgo de que un complejo de DKK3b:βTrCP intracelular se une con β-catenina no fosforilada y puede conducir a la degradación de β-catenina, es probable que el complejo de DKK3b:βTrCP cumpla al menos tres papeles: 1) secuestro de β-catenina; 2) relocalización de β-catenina; y 3) degradación de β-catenina. Ya que estos papeles probablemente estén relacionados temporalmente, los inventores usan microscopía confocal, de fluorescencia de reflectancia interna total (TIRF) y captura de imágenes digital en tiempo real para definir la dinámica de redistribución subcelular de β-catenina, DKK3b y βTrCP en células C8 y en las líneas de células cancerosas de los inventores que

expresan concentraciones crecientes, inducidas por tet, de DKK3b (Lee, *et al.* **2009** *Int J Cancer* 124(2):287-297). El trabajo previo de los inventores que detalla la dinámica del transporte de DKK3b guía la compleción de estos estudios por los inventores. (Farwell, *et al.* **1990** *J Biol Chem* 265(30):18546-18553; Stachelek, *et al.* **2000** *J Biol Chem* 275(41):31701-31707; Stachelek, *et al.* **2001** *J Biol Chem* 276(38):35652-35655). En su forma más sencilla, el complejo de DKK3b:βTrCP unido a membrana atrae β-catenina no fosforilada lo que conduce a su asociación a membrana. Si hay complejos adherentes cerca este complejo puede depositar β-catenina en estas estructuras de unión (Hartsock, *et al.* **2008** *Biochim Biophys Acta* 1778(3):660-669). Si no, el complejo inactivo puede degradarse en el proteasoma.

10 Caracterización de la distribución orgánica/tisular y perfiles de expresión de DKK3b en el ratón

Se sabe poco acerca de la distribución tisular, el momento de desarrollo y/o el perfil de expresión de DKK3b y los enfoques inmunocitoquímicos tradicionales son poco prácticos debido a que los anticuerpos disponibles reconocen tanto DKK3b como DKK3a. Para definir el momento de desarrollo básico y la distribución tisular de expresión de DKK3b, los inventores usan el enfoque de edición de genes basada en nucleasa de dedos de zinc (ZFN) para producir un ratón indicador de Dkk3b redirigiendo el promotor de DKK3b para conducir la expresión de un indicador fluorescente (**FIG. 4**). (Clark, *et al.* **2011** *Zebrafish* 8(3):147-149; Collin, *et al.* **2011** *Stem Cells* 29(7):1021-1033; Kim, *et al.* **2009** *Genome research* 19(7):1279-1288). Durante la validación de los pares de ZFN, se generan por defecto células CFP C8 (C8^{Dkk3bCFP}) conducidas por promotor de Dkk3b, con genes editados, que son un indicador basado en células valioso para exploración de alto rendimiento de bibliotecas combinatorias.

Se realiza análisis funcional sistemático del promotor de DKK3b usando la expresión de CFP como el criterio de valoración y se usa análisis por ordenador (TranFac, algoritmos de Genomatrix) para identificar elementos promotores de Dkk3b individuales. Este enfoque de consulta de promotor identificará uno o más moduladores de promotores que modulan la transcripción de este locus.

El ratón indicador de Dkk3b proporciona dos modelos *in vivo* importantes. 1) Los **heterocigotos** (Dkk3b^{+/-CFP}) expresan los tres productos génicos del locus *Dkk3*, DKK3a, DKK3b y CFP. Estos ratones se usan para definir el momento de desarrollo y la distribución tisular de DKK3b en embriones, neonatos y adultos. Se espera que la CFP conducida por promotor de DKK3b muestre distribución generalizada en los tejidos. 2) Los **homocigotos** (Dkk3b^{CFP/CFP}) son inactivados funcionales que expresan DKK3a, pero no DKK3b, debido a que el promotor de Dkk3b de ambos alelos se ha desviado para conducir la expresión de CFP. Estos ratones con "inactivación" de Dkk3b, a diferencia del inactivado de Dkk3a original, pierden el supresor tumoral DKK3b y se espera que muestren un riesgo de cáncer notablemente aumentado y anomalías del desarrollo potenciales.

35 Métodos y procedimientos

Ensayos biológicos para proliferación celular, ciclo celular, apoptosis y senescencia.

La proliferación celular se supervisa usando el reactivo WST-1 según las instrucciones del fabricante. Se realiza proliferación celular, análisis del ciclo celular y apoptosis usando análisis por FACS de células marcadas con BrdU que se marcan posteriormente con anticuerpos fluorescentes de tejidos contra DKK3b marcado con epítipo y anexina V (apoptosis). Como alternativa, la apoptosis se sigue mediante ensayos de TUNEL según métodos establecidos en el laboratorio. La senescencia celular se determina por actividad β-galactosidasa usando kits disponibles en el mercado. Todos los análisis se realizan por triplicado y se repiten al menos tres veces para validar los datos.

Construcciones de ADNc de DKK3, plásmido, construcciones de expresión vírica y sondas inmunológicas.

Se usa tecnología Gateway (Invitrogen) para generar plásmidos de entrada que albergan DKK3a y DKK3b marcadas con epítipo. El sistema de vector lanzadera permite el rápido ensamblaje de un amplio repertorio de vectores plasmídicos o de expresión vírica mediante recombinación basada en fago λ. Se usan vectores de destinación tanto constitutivos como inducibles por tet en el laboratorio. También está disponible tecnología Gateway para desplazar ARNhpi generado por PCR a células o tejidos. Está disponible una colección completa de bibliotecas de ARNhpi de ser humano y ratón basadas en retrovirus y lentivirus.

Secuenciación profunda de bibliotecas de ARN con DKK3b alterada

Se exponen células que albergan DKK3a o DKK3b inducibles por tet a tetraciclina y se cultivan durante hasta 24 h. El ARN total se aísla mediante columnas de RNeasy Qiagen y el ARNm poli A+ se aísla por purificación de oligo dT. Se preparan bibliotecas de mRNA-seq por triplicado a partir de células de control (sin tet), que expresan DKK3a y expresan DKK3b usando kits disponibles en el mercado.

Edición génica del locus del promotor de Dkk3b

La selección del par de ZFN dirigido a promotor de Dkk3b se guía por métodos desarrollados por Wolfe (Wolfe, *et al.* **2003** *Biochemistry* 42(46):13401-13409; Meng, *et al.* **2008** *Nature biotechnology* 26(6):695-701; Zhu, *et al.* **2011** *Development* 138(20):4555-4564). Se utilizan ADNc que codifican pares de ZFN diana de novo y se clonan en el vector pCS-Fok1. Se realiza modificación de diana de ZFN en la línea celular C8 isogénica y la especificidad diana se evalúa usando PCR. Se realiza validación de modificación de diana ZFN mediante ensayos de Cel-1, por reparación de recombinación homóloga (RH) de oligos monocatenarios mediante inserción mediada por RH de un indicador de CFP flanqueado por sitios LoxP (Chen, *et al.* **2011** *Nature methods* 8(9):753-755). La actividad de ZFN fuera de la diana se evalúa por ordenador y los tres sitios superiores fuera de diana se investigan por análisis de PCR. El par o los pares de ZFN validados que editan la región diana del promotor de Dkk3b y la construcción de ADNc de CFP-pA basada en RH se usan para preparar ratones indicadores de Dkk3b.

Se inyectan ARNm de ZFN sintetizados *in vitro* y el ADNc de reparación de RH-pLox-CFP-pA-pLox dirigido a promotor de Dkk3b en 50-75 oocitos de ratón C57BL/6 fertilizados en el núcleo de movilización de animales transgénicos en UMMS. Se implantan embriones unicelulares en sustitutas y la descendencia se genotipa usando PCR específica de promotor de Dkk3b. Los ratones con el gen de promotor de Dkk3b editado se expanden a dos colonias: los heterocigotos Dkk3b^{+/-CFP} se crían para su uso en estudios de distribución tisular y del desarrollo y los homocigotos Dkk3b^{CFP/CFP} se crían para evaluación de la susceptibilidad tumoral del ratón con inactivación de Dkk3b. Si la pérdida de Dkk3b resulta ser letal, la base de la letalidad se determina después y se usa la expresión de Cre específica de tejido para escindir el indicador de CFP y restaurar la expresión de Dkk3b en el tejido o los tejidos requeridos para supervivencia.

Con la identificación y caracterización de la influencia de un complejo de DKK3b:βTrCP en la biología de la señalización de β-catenina y la función supresora tumoral de DKK3b, la capacidad de DKK3b para “secuestrar” β-catenina, detener el crecimiento de células tumorales y bloquear las señales de proliferación/supervivencia conducidas por TCF proporciona un mecanismo sencillo para la función supresora tumoral. El enfoque basado en bioinformática, RNA-seq, imparcial, se usa para identificar las rutas génicas diana afectadas. A partir de estos datos, se seleccionará un conjunto validado de genes indicadores de DKK3b (DK3RA) y se usará para supervisar la función de DKK3b. El análisis de la dinámica de desplazamiento inducido por DKK3b de β-catenina entre diferentes compartimentos intracelulares es un problema de biología celular sencillo que se aborda por paradigmas de captura de imágenes estáticas y dinámicas. Estos datos proporcionan información básica sobre qué etapas en el proceso pueden ser diana de intervención terapéutica.

Adicionalmente, la generación de la línea celular indicadora DKK3b^{+/-CFP} y modelos de ratón DKK3b^{+/-CFP} son inestimables para el estudio del tumorigénesis. Las estrategias de edición génica contemporáneas que usan tecnología de ZFN producen significativamente el tiempo requerido para desarrollar modelos biológicos ensayables. Las células C8^{DKK3bCFP} generadas durante el proceso de validación proporcionan un beneficio de valor añadido significativo, son útiles para explorar métodos de activación del promotor de Dkk3b y para el descubrimiento de moléculas pequeñas que alteran la expresión de DKK3b. La producción del ratón indicador de Dkk3b es significativamente más rentable que las estrategias de recombinación homóloga basadas en células ES tradicionales y reducen el tiempo para generar un modelo de ratón viable en >80 %. La caracterización de la función promotora de Dkk3b puede aplicarse directamente a la intervención *in vivo* del proceso oncogénico y al desarrollo de enfoques terapéuticos novedosos para el cáncer.

Análisis mecánico de activación de JNK inducida por DKK3b en tumores de próstata.

La ruta de JNK está ampliamente reconocida como un regulador importante de la biología tumoral y actúa como un mecanismo de defensa celular clave para evitar la inestabilidad genética y el desarrollo de aneuploidia. (Kennedy, *et al.* **2003** *Cell Cycle* 2(3):199-201; Vivanco, *et al.* **2007** *Cancer Cell* 11(6):555-569; Whitmarsh, *et al.* **2007** *Oncogene* 26(22):3172-3184; MacCorkle, *et al.* **2004** *J Biol Chem* 279(38):40112-40121; Miyamoto-Yamasaki, *et al.* **2007** *Cell BiolInt.*;31(12):1501-1506; Nakaya, *et al.* **2009** *Cell Biochem Funct* 27(7):468-472; Wang, *et al.* **2009** *J Pathol* 218(1):95-103). Informes previos han mostrado que la sobreexpresión de DKK3 en células tumorales aumenta la actividad de JNK lo que conduce a inhibición de la proliferación celular y aumento de la pérdida celular mediada, en parte, por la apoptosis. (Edamura, *et al.* **2007** *Cancer Gene Ther* 14(9):765-772; Abarzua, *et al.* **2005** *Cancer Res* 65(21):9617-9622; Ikezoe, *et al.* **2004** *Br J Cancer* 90(10):2017-2024; Kawano, *et al.* **2006** *Oncogene* 25(49):6528-6537).

En manos de los inventores, la detención del crecimiento de DKK3b en la célula tumoral de próstata DU145 requiere, en parte, la ruta de quinasa de tensión de JNK (figura 5a). Aunque DKK3b detuvo la proliferación celular, la inhibición por TAT-JBD de la actividad de JNK bloqueó la pérdida celular (**FIG. 5A**), lo que sugiere que la ruta de JNK es necesaria para la pérdida celular. Estos resultados concuerdan con las observaciones de los inventores de que Jnk inhibe la formación de tumor de próstata en el modelo de ratón de Pten condicional bien establecido de cáncer de próstata. PTEN (homología de fosfatasa y tensina) es un supresor tumoral mutado habitualmente en cáncer que se ha mostrado recientemente que tiene un papel directo en la prevención de la inestabilidad cromosómica: los ratones ΔPten/ΔJnk carecen de PTEN y JNK en epitelio de próstata y desarrollan cáncer más

agresivo que animales que carecen de PTEN solamente (Δ Pten) (**FIG. 5C**). Baker **2007** *Cell* 128(1):25-28; Blanco-Aparicio, *et al.* **2007** *Carcinogenesis* 28(7):1379-1386; Trotman, *et al.* **2007** *Cell* 128(1):141-156; Yin, *et al.* **2008** *Oncogene* 27(41):5443-5453; Shen, *et al.* **2007** *Cell* 128(1):157-170; Puc, *et al.* **2005** *Cancer Cell*;7(2): 193-204; Wang, *et al.* **2003** *Cancer Cell* 4(3):209-221). Aunque este resultado ilustra claramente el papel de la ruta de JNK en la prevención de este cáncer, los procesos biológicos que JNK regula siguen sin estar claros. El control de la inestabilidad genética representa un mecanismo probable para la función de JNK para prevenir el cáncer. Estudios preliminares que usan fibroblastos embrionarios murinos (MEF) muestran que la pérdida de expresión de JNK aumenta drásticamente la inestabilidad cromosómica y conduce a aneuploidía (**FIG. 5B**).

La inestabilidad genética aumentada resultante de la pérdida de JNK es responsable de los tumores más agresivos en epitelio de próstata (**FIG. 5C**). Los inventores proponen que DKK3b inhibe el crecimiento tumoral, en parte, de una manera dependiente de JNK *in vivo*. La invención proporciona el primer marco mecánico para entender cómo el eje de señalización de DKK3b-JNK evita la tumorigénesis y por lo tanto potencia significativamente el entendimiento del papel de esta ruta de quinasas en el cáncer humano.

Por lo tanto, la invención demuestra un papel para JNK en la prevención de la inestabilidad genética que promueve la formación tumoral y define las conexiones moleculares entre DKK3b y la ruta de JNK.

Caracterización del eje de señalización de DKK3b-JNK en cáncer de próstata.

La expresión de DKK3 se pierde en la mayoría de tumores de próstata, y DKK3b es el supresor tumoral biológicamente relevante del locus *Dkk3*. La quinasas activadora de JNK *Mkk4* también está mutada en un subconjunto de tumores de próstata humanos primarios (Whitmarsh, *et al.* **2007** *Oncogene* 26(22):3172-3184; Kim, *et al.* **2001** *Cancer Res*;61(7):2833-2837; Taylor, *et al.* **2008** *Cancer Lett* 272(1):12-22). Sin embargo, se desconoce si la pérdida de ambos productos génicos actúa de forma sinérgica para generar un cáncer más grave. La invención establece conexiones correlativas y causativas entre DKK3b y la ruta de JNK que demuestran la importancia de este eje de señalización en la prevención del cáncer de próstata. Las muestras de tumor de próstata humano primario que representan un intervalo de puntuaciones de Gleason para expresión de DKK3b, DKK3a, β -catenina, MKK4, MKK7 y JNK y fosfoanálogos se exploran por inmunocitoquímica, qPCR y análisis de inmunotransferencia. La expresión del supresor tumoral PTEN también se explora para determinar si las conexiones entre las rutas de DKK3b y JNK requieren mutaciones de *Pten*. Los inventores proponen que la gravedad tumoral está inversamente relacionada con los niveles de DKK3b y directamente relacionada con la localización nuclear de β -catenina, y se espera que la expresión o actividad de JNK, MKK4 y/o MKK7 esté inversamente correlacionada con la gravedad tumoral.

Análisis de la inestabilidad genética en epitelio de próstata

La inestabilidad genética está asociada con roturas de ADN, translocaciones y el desarrollo de aneuploidía. El grado de inestabilidad genética se determina en secciones tisulares de próstatas de ratones Δ Pten and Δ Pten/ Δ Jnk recogidas en diversos estadios del desarrollo tumoral incluyendo cuando solamente son evidentes lesiones de PIN. La tumorigénesis de próstata potenciada en ratones Δ Pten/ Δ Jnk indica que los mecanismos reguladores que evitan el crecimiento celular descontrolado (tales como apoptosis o senescencia) son defectuosos debido a la pérdida de JNK. La pérdida de estas rutas desconecta el supresor tumoral DKK3b de la maquinaria de vigilancia genómica y en última instancia conduce a la formación de tumores más agresivos.

Inhibición tumoral usando suministro por lentivirus de JNK o DKK3b activadas.

Se ensaya la idea de que la expresión específica de próstata de DKK3b o JNK activada inhibe la formación de PIN y el crecimiento tumoral en modelos murinos de cáncer de próstata. Para estos estudios, se modifican modelos murinos para incluir un indicador de luciferasa específico de próstata para visualizar el crecimiento tumoral en ratones vivos. Se usa el sistema de suministro lentivírico para expresar DKK3b y/o una versión constitutivamente activa de JNK específicamente bajo el control del promotor de probasina específico de próstata. (Vivanco, *et al.* **2007** *Cancer Cell* 11(6):555-569). El efecto de la expresión específica de próstata de DKK3b o JNK activa en el crecimiento tumoral se supervisa a lo largo del tiempo en animales vivos evaluando la expresión del indicador de luciferasa.

Dependencia de JNK para efectos antitumorales de DKK3b

Aunque DKK3b bloquea la proliferación de células cancerosas *ex vivo*, mediante un mecanismo que implica JNK, se desconoce si esto también sucede *in vivo*. El reemplazo génico por construcciones lentivíricas se usará para expresar tanto DKK3b como TAT-JBD, un inhibidor peptídico específico de JNK, en tumores de próstata de ratones indicadores de Δ Pten/Luciferasa. El efecto de la inhibición de JNK en la función de DKK3b se evalúa analizando la formación de PIN en secciones de próstatas de ratones sacrificados y supervisando la regresión tumoral a lo largo del tiempo en animales vivos. Los inventores esperan que la pérdida de actividad de JNK conduzca a más formación de PIN.

Mecanismo o mecanismos moleculares de la activación de JNK por DKK3b

Se examina la activación de quinasas corriente arriba que se sabe que conduce a fosforilación de JNK. El conjunto de datos de RNA-Seq se consulta para identificar cambios en la expresión génica que afectan a rutas que se sabe que regulan la señalización de JNK. Se usa ELISA múltiple para analizar cambios en los perfiles de expresión de citocinas que podrían conducir a la activación de JNK. Los principales hallazgos del análisis *in vitro* de los inventores se confirman *in vivo* usando reemplazo génico/atenuación por ARNi de miembros de la ruta candidatos que se sospecha que desempeñan un papel en la regresión tumoral y/o supresión de formación de PIN. Por ejemplo, la identificación *in vitro* de una MAPKKK alterada por DKK3b o producción dependiente de DKK3b de citocina o citocinas activadoras de JNK se evaluará experimentalmente en tumores que expresen DKK3b.

Métodos y procedimientos

Citometría de exploración por láser

La citometría de exploración por láser se usa para analizar los cambios en la ploidía de células de tumores de próstata de ratones Δ Pten y Δ Pten/ Δ Jnk. Debido a que este método usa secciones de próstata intacta, la arquitectura tisular se conserva permitiendo la evaluación de la formación de PIN. Se tiñen secciones tisulares de próstata con anticuerpos para E-cadherina (para marcar células del estroma), N-cadherina/cadherina-11 (para marcar células tumorales) y yoduro de propidio para marcar ADN seguido de análisis usando citometría de exploración por láser. El análisis del contenido de ADN en células del estroma (positivas para E-cadherina, pero negativas para N-cadherina y cadherina-11) actúa como un control interno para la población de células diploides. El contenido de ADN de células tumorales (positivas para N-cadherina y cadherina-11 y bajos niveles de E-cadherina) se compara con células del estroma para determinar cambios de ploidía. Los experimentos de control incluyen próstatas de ratones de tipo silvestre, Pb-Cre, Pten^{fl/fl} y Jnk1^{fl/fl}/Jnk2^{-/-}.

Métodos morfológicos

Se usan técnicas inmunohistoquímicas e inmunofluorescentes convencionales para analizar la morfología del tejido prostático y la presencia de roturas de cadenas de ADN en ratones Δ Pten/ Δ Jnk. Las secciones tisulares de próstata se tiñen con hematoxilina y eosina para revelar la morfología. Las roturas de cadenas de ADN se valoran usando anticuerpos para fosfo-H2Ax y p53BP. Las reordenaciones cromosómicas se evalúan usando la técnica de cariotipación espectral (SKY). La senescencia celular se determina ensayando el marcador de senescencia β -galactosidasa. La apoptosis se evalúa valorando los niveles de ADN con muescas usando el ensayo (TUNEL) y actividad caspasa 3. La proliferación se cuantifica usando inmunotinción con Ki67 o BrdU. El tejido de próstata de ratones de tipo silvestre, Pb-Cre, Pten^{fl/fl} y Jnk1^{fl/fl}/Jnk2^{-/-} actúa como control. Se evaluarán secciones tumorales usando microscopía confocal e imágenes fluorescentes analizadas con respecto a diferencias estadísticas usando software Image Pro Plus®.

Análisis de expresión génica de tumor de próstata humano

Se obtienen muestras de ensayo tumorales del banco tisular de UMMS y representan diversos grados de gravedad tumoral basándose en las puntuaciones de Gleason. Se aísla el ARN de muestras tumorales y se explora con respecto a la expresión de DKK3b, DKK3a, β -catenina, Pten, Mkk4, Mkk7 y Jnk usando ensayos de qPCR y los resultados se confirman usando inmunotransferencia y/o inmunocitoquímica para detectar expresión de proteínas. Estos experimentos establecen, por primera vez, una conexión correlativa entre DKK3b, la ruta de JNK y la gravedad del cáncer de próstata. Los inventores esperan que una puntuación de Gleason creciente esté correlacionada positivamente con la pérdida de expresión génica tanto de Dkk3b como de Mkk4. Como alternativa, la inactivación mutacional podría suprimir funcionalmente las actividades de DKK3b y MKK4. Por lo tanto, los genes de Dkk3b y Mkk4/7 se secuencian para identificar posibles mutaciones inactivadoras que no afectan a la expresión general.

Modelos de ratón de cáncer de próstata

Los modelos murinos novedosos de los inventores de cáncer de próstata se cruzan con una cepa de ratón indicadora de luciferasa específica de próstata y la descendencia se usa para estos estudios. La expresión de luciferasa específica de próstata se dirige por un transgén que expresa el gen de luciferasa de luciérnaga bajo el control de un promotor de probasina modificado para incluir dos elementos de respuesta a andrógenos (ARR2-Pb-Lux, (Ellwood-Yen, *et al.* 2006 *Cancer Res* 66(21):10513-10516), en lo sucesivo en el presente documento Lux). Los ratones indicadores de Lux se cruzan con los ratones condicionales de los inventores que carecen de expresión de PTEN (Δ Pten) o PTEN y JNK (Δ Pten/ Δ Jnk) en la próstata, generando cepas tanto Lux- Δ Pten como Lux- Δ Pten/ Δ Jnk para estudios de captura de imágenes de animales vivos.

Construcción y uso de sistema de suministro lentivírico, específico de próstata

Las construcciones lentivíricas para expresión específica de próstata de JNK, JNK constitutivamente activa (una fusión entre el activador de JNK corriente arriba MKK7 y JNK, MKK7-JNK), un inhibidor de JNK específico TAT-JBD (una proteína de fusión del dominio de unión de JNK (JBD) de la proteína de armazón JIP1 unida a la secuencia de TAT del VIH) y DKK3b se construyen como se detalla en el presente documento. La expresión de todas las construcciones está conducida por el promotor de ARR2-Pb para asegurar la expresión específica de próstata e incluye un marcador epítópico para facilitar la detección de proteínas expresadas. Se administran sobrenadantes lentivíricos a animales vivos bien mediante inyección en la vena de la cola o, como alternativa, por inyección intratumoral directa. Se realizan experimentos de control preliminares usando ratones de tipo silvestre para optimizar el porcentaje de células de próstata infectadas mediante uno de los modos de inyección usando análisis microscópico inmunofluorescente de secciones de próstata teñidas con anticuerpos específicos de epítipo.

Cuantificación del crecimiento tumoral en animales vivos

Las cepas de ratón Lux- Δ Pten y Lux- Δ Pten/ Δ Jnk desarrollan tumores de próstata que expresan el gen indicador de luciferasa de luciérnaga, permitiendo a los inventores supervisar la tumorigénesis en animales vivos. Se inyecta en ratones sedados el sustrato de luciferasa, luciferina, y se mide la luz emitida usando el sistema de captura de imágenes IVIS de Xenogen®. Usando este sistema se pueden visualizar tanto lesiones primarias de estadio temprano como metástasis que se han propagado a otros órganos. Se usan ratones Pb-Lux de tipo silvestre que carecen de tumores como controles negativos. Se capturan imágenes de ratones con gen específico reemplazado (DKK3b, MKK7-JNK y TAT-JBD) antes de infección vírica para establecer una línea basal para el tamaño tumoral. Se recogen imágenes posteriores semanalmente durante cuatro semanas para determinar el efecto o los efectos de la modulación de las rutas de DKK3b y JNK en el crecimiento tumoral. Se han realizado estudios de control iniciales para optimizar el tiempo entre interyecciones de luciferina y captura de imágenes de animales vivos. Los estudios de control adicionales incluyen la inyección de una construcción lentivírica vacía.

Producción y suministro de lentivirus

Se realiza producción y validación de sobrenadantes lentivíricos concentrados usando protocolos convencionales establecidos en los laboratorios de los inventores. Los títulos víricos se determinan por dilución limitante y la expresión de las proteínas marcadas con epítomos específicos se determinará mediante técnicas de inmunofluorescencia. Se realiza administración de partículas lentivíricas mediante inyección en la vena de la cola de ratones dos veces durante dos días. Como alternativa, se realiza suministro directo de partículas lentivíricas a la próstata de ratones anestesiados mediante una incisión pequeña en el peritoneo en el abdomen inferior. Se inyectan aproximadamente 10-20 μ l de reserva lentivírica concentrada (~108 partículas) en la próstata y la herida se cierra usando suturas quirúrgicas. La recuperación quirúrgica de los animales se supervisa cuidadosamente con respecto a señales de infección u otras complicaciones. Los controles incluyen animales inyectados con PBS o lentiviriones vacíos.

Evaluación de lesiones de neoplasia intraepitelial prostática (PIN)

Se emplean técnicas de tinción inmunológica e histoquímica convencionales para evaluar el desarrollo de lesión de PIN en los modelos murinos de los inventores de cáncer de próstata. La próstata se recoge en puntos temporales que abarcan desde la aparición de la enfermedad hasta el comienzo de la formación tumoral. Se reparan secciones en serie de tejido prostático a partir de bloques tisulares congelados o incluidos en parafina. Una sección se tiñe con hematoxilina y eosina para identificar las alteraciones morfológicas que caracterizan las lesiones de PIN y se usan las secciones adyacentes para detección inmunológica de productos génicos suministrados por lentivirus usando anticuerpos marcados con epítomos. El número total de lesiones de PIN y el porcentaje de lesiones de PIN (si las hubiera) que expresan una construcción o construcciones génicas suministradas por lentivirus se determinan a partir de al menos cinco ratones en cada punto temporal.

Análisis de punto final de tejido de próstata

Para todos los experimentos que implican ratones, se recoge tejido de próstata en el momento del sacrificio del animal. Se procesa el tejido de próstata fijado en paraformaldehído para generar secciones tisulares en parafina y congeladas para análisis de lesiones de PIN, expresión génica medida por lentivirus y actividad luciferasa. Se usa tejido de próstata no fijado de ratones adicionales para análisis de transcritos usando QPCR y para determinación de la expresión de proteínas por ensayos de inmunotransferencia o ELISA múltiple (luminex). Las próstatas de pequeño tamaño en ratones que actúan como controles negativos están en estadios tempranos de la enfermedad y requieren tejido agrupado para generar suficiente material para todos los análisis.

Estadística y análisis de potencia

El número de ratones en cada grupo se determina por la potencia estadística requerida para detectar diferencias biológicamente relevantes, significativas. Puede detectarse una diferencia significativa en las medias entre grupos

usando ensayo de t suponiendo la normalidad. La diferencia en las medias se expresa en unidades de desviación típica (que expresa la magnitud de variabilidad entre animales). Con 8-10 ratones en cada grupo, pueden detectarse diferencias entre las medias que son mayores de 1,25 DT (ya que diferencias menores probablemente no sean biológicamente relevantes) a un nivel de significación de 0,05. Se anticipa que el aumento de la expresión de Dk3b dará como resultado retardo del crecimiento tumoral estadísticamente significativo.

La mayoría de los tumores establecidos independientemente del origen tisular muestran pruebas de inestabilidad genética. Aunque es probable que los tumores de ratones Δ Pten/ Δ Jnk sean genéticamente inestables, es el análisis de los acontecimientos más tempranos en la tumorigénesis, la formación de lesiones de PIN, lo que demuestra ser fructífero con respecto a causa y efecto. Para superar las limitaciones analíticas debidas al pequeño tamaño de lesiones de PIN tempranas, los inventores usan citometría y exploración por láser. Una ventaja primaria de la citometría de exploración por láser es la conservación de la arquitectura tisular que permite la identificación de lesiones de PIN basándose en la morfología en lugar de la expresión de antígeno o antígenos tumorales. Este enfoque también supera la salvedad de que pueden producirse diferencias en la expresión de cadherina en lesiones de PIN tempranas y/o que la expresión de cadherina diferencial puede requerir transcripción mediada por AP-1 dependiente de JNK. Debido a que la arquitectura tisular se conserva en citometría de exploración por láser, pueden usarse otros criterios tales como expresión de receptor de andrógenos (RA) para identificar lesiones de PIN: el tejido de próstata normal muestra una expresión bien definida de RA en una única capa de células epiteliales, mientras que las lesiones de PIN muestran expresión de RA multicapa, desorganizada.

El análisis de roturas de cadenas de ADN en lesiones de PIN tempranas, así como tumores de estadio tardío usando inmunocitoquímica y SKY, respectivamente, permite conectar el daño de ADN aumentado en lesiones de PIN con translocaciones cromosómicas aumentadas en tumores de estadio tardío. Aunque es posible que no se encuentren diferencias en la inestabilidad genética entre tumores Δ Pten y Δ Pten/ Δ Jnk por célula, los datos obtenidos proporcionarán información valiosa porque la frecuencia y apariencia en lugar del grado de inestabilidad de las células afectadas pueden ser el motor que conduzca a formación de tumor de próstata aumentada en animales Δ Pten/ Δ Jnk. Dicho resultado destaca el papel de la ruta de JNK en el mantenimiento de la integridad genética.

Otra preocupación potencial es que las limitaciones/los defectos en activadores corriente arriba de JNK pueden evitar que la expresión de JNK aumentada afecte al crecimiento tumoral. Para abordar esto, los inventores usan el sistema de suministro lentivírico para expresar una proteína de fusión MKK7-JNK activa de forma constitutiva que evita la necesidad de quinasas activadoras corriente arriba. Eso sirve a un ensayo de prueba de concepto importante de la hipótesis de los inventores de que el aumento de los niveles de actividad de JNK inhibe el crecimiento tumoral, y pone las bases para experimentos adicionales que busquen aumentar la actividad de JNK endógena en tumores modulando la ruta de JNK.

Aunque los inventores proponen que DKK3b bloquea el crecimiento de células cancerosas, en parte, mediante un proceso dependiente de JNK, es igualmente posible que DKK3b también actúe mediante mecanismos independientes de JNK para inhibir el crecimiento de células cancerosas. Esta posibilidad puede ensayarse expresando DKK3b en tumores de ratones de Δ Pten/ Δ Jnk. Si no se produce ningún cambio en el estado tumoral, entonces la función protectora de DKK3b requiere JNK. Como alternativa, DKK3b puede inducir una inhibición parcial del crecimiento tumoral en ausencia de JNK lo que sugiere la existencia de rutas independientes de JNK alternativas que controlan el crecimiento tumoral.

Finalmente, el suministro mediado por lentivirus de DKK3b y JNK a tejido de próstata presenta problemas potenciales. Si el suministro por la vena de la cola de partículas lentivíricas no consigue niveles de infección necesarios para afectar al crecimiento tumoral usando el virus, las células tumorales no infectadas continuarán proliferando y podrían, si están presentes en números suficientes, enmascarar cualquier inhibición del crecimiento proporcionada por DKK3b/JNK. Este peligro es particularmente preocupante para experimentos diseñados para provocar la regresión de tumores establecidos. Para abordar este problema, se realizan estudios piloto usando un virus indicador de GFP para determinar si la inyección en la vena de la cola produce suficientes tasas de infección de próstata. Si la inyección por la vena de la cola de partículas víricas resulta ser ineficaz, se inyectan partículas víricas directamente en la próstata de ratones anestesiados mediante una pequeña incisión realizada en el abdomen. Los estudios de control iniciales determinarán el volumen/la concentración de partículas víricas y el grado de expresión de proteínas exógenas. Los ratones inyectados con PBS y partículas antivíricas vacías se procesan en paralelo como controles adicionales para estos experimentos.

Relación entre DKK3b y fenotipos de tumor de mama triples negativos

Como otros cánceres epiteliales, la expresión de DKK3b está alterada en los tumores mamarios en el modelo de ratón de los inventores (**FIG. 6**) y muestra una relación inversa, específica de célula, con β -catenina y citoplasmática. Esta heterogeneidad de la expresión de DKK3b y β -catenina se mantuvo en líneas celulares derivadas de tumores lo que indica que pueden aislarse diferentes cohortes de células residentes en tumores y su defecto o sus defectos moleculares caracterizados *ex vivo* (**FIG. 7**).

La pérdida de DKK3 puede desempeñar un papel importante en la formación y el mantenimiento de los denominados cánceres de mama “triples negativos” (TNBC). Los cánceres de mama triples negativos ER, PR, Her2 son una clase de tumores agresivos con pocas, o ninguna, opciones de tratamiento. Para examinar esto, se emplean dos modelos de ratón para explorar la evolución de estos tumores y los detalles moleculares que contribuyen a su naturaleza agresiva. El primero es el modelo de ratón novedoso de los inventores (TBP) que imita a TNBC debido a la pérdida de tres rutas supresoras de tumores críticas: Rb; BRCA1; y p53 que están afectadas en TNBC humano. (Simin, *et al.* **2005** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70:283-290; Kumar, *et al.* **2012** *PLoS Genet.* 8(11) e1003027; D'Amato, *et al.* **2011** *PLoS One* 7(9) e45684; Herschkowitz, *et al.* **2007** *Genome Biol* 8(5):R76). La consulta de expresión génica global de 13 modelos de ratón de los inventores reveló que el ratón TBP imitaba a TNBC humano. El segundo modelo, MMTV-Wnt1, es un modelo bien establecido de cáncer de mama que también se asemeja a TNBC, y se aprovechó para estudiar células iniciadoras de tumor. Los inventores plantean la hipótesis de que la actividad de Wnt regulada por dys contribuye al fenotipo tumoral, y la dirección a esta ruta de DKK3b bloqueará la progresión tumoral, lo que se traducirá en beneficios técnicos significativos para pacientes con cáncer de mama.

DKK3b suprime la tumorigénesis, en parte, limitando la función de células iniciadoras de tumor dependientes de Wnt y esto es novedoso y significativo. El hallazgo de los inventores de que DKK3b muestra una relación inversa con β -catenina citoplasmática en tumores mamarios no tiene precedentes y claramente cambia el paradigma terapéutico con respecto a cómo actúa DKK3b para detener el crecimiento de células tumorales. La caracterización de las propiedades antitumorales de DKK3b ofrece una nueva diana terapéutica con la posibilidad de desarrollar un tratamiento racional eficaz de una clase letal de tumores mamarios agresivos.

Evaluar la contribución de la expresión de DKK3b a la tumorigénesis mamaria

El ligando de Wnt es un morfógeno y mitógeno potente que promueve la progresión tumoral y la malignidad de tumores TBP en múltiples estadios del desarrollo. La evolución temporal de la expresión tanto de β -catenina como de DKK3b se definen en secciones tisulares de tumores mamarios, metástasis pulmonares y MIN (neoplasias intraepiteliales mamarias) de ratones TBP y Wnt1. Se evalúan los patrones normales de expresión de β -catenina y DKK3b en tejidos de control de tipo silvestre. Las muestras tisulares se examinan usando inmunofluorescencia, hibridación in situ y ELISA múltiple de células residentes en tumores aisladas.

Se usan paradigmas de clasificación de células para enriquecer subconjuntos específicos de la población de tumores heterogénea usando los marcadores de superficie celular CD49f, CD24 y CD61 que marcan células iniciadoras de tumores. Como alternativa, se usa microdissección de captura por láser para aislar poblaciones celulares morfológicamente definidas de tumores TNBC. Las células se aíslan por clasificación de microdissección y se caracterizan por qPCR, ELISA múltiple, inmunotransferencia y el ensayo de DK3RA. Se examinan sistemáticamente un mínimo de 24 tumores TBP y 24 Wnt1 para establecer la expresión coincidente o mutuamente excluyente de β -catenina y DKK3b. Los resultados iniciales de los inventores mostraron que altos niveles de DKK3b se asocian con bajos niveles de β -catenina citoplasmática dentro de una única célula. La relevancia clínica de estas dianas tumorales se corrobora evaluando muestras de ensayo obtenidas de pacientes. Los tumores se examinan clasificando según el grado y el estado de marcador clínico, usando suficientes números para establecer asociaciones estadísticamente significativas, como han publicado previamente los inventores (46-49) para definir el fenotipo o los fenotipos de diferentes células residentes en tumores en tumores TNBC.

Examinar los efectos de DKK3b alterada en el inicio del tumor mamario

Los efectos de la expresión de DKK3b alterada en el inicio del tumor se determinan usando células epiteliales mamarias de ratón immortalizadas, transformadas con Wnt1, NMuMG. DKK3a no consiguió alterar la proliferación de células NMuMG, como células PC3 y DU145, mientras que DKK3b ralentizó el crecimiento celular (**FIG. 8**). Las células NMuMG que expresan la DKK3b inducible por tet se transforman por Wnt1 y los efectos del aumento de DKK3b en el inicio de tumor dependiente de Wnt1 se evalúan usando cultivos de agar blando y ensayos de formación de tumorosferas.

Las células NMuMG no forman tumores a no ser que se transformen mediante señales oncogénicas tales como el ligando de Wnt. Los trasplantes ortotópicos de células NMuMG que expresan DKK3b, inducibles por tet, en ratones NOD/SCID experimentan transformación y el efecto o los efectos de DKK3b en tumorigénesis evaluada *in vivo*. Los tumores resultantes se recogen y los cambios dependientes de DKK3b se caracterizan mediante morfología (H&E), proliferación (Ki67), apoptosis (TUNEL), patrones de distribución de β -catenina (células totales y relación citoplasmática/nuclear) y genes diana regulados por LEF/TCF tales como E-Cadherina, N-Cadherina, AXIN2, Ciclina D1 y C-Myc. Ya que las células iniciadoras de tumores están enriquecidas por estimulación con Wnt1, se usa FACS (CD49^{alto}, CD24^{bajo}, CD61⁺) para aislar y cuantificar poblaciones de células iniciadoras de tumores. (Cho, *et al.* **2008** *Stem Cells* 26(2):364-371; Vaillant, *et al.* **2008** *Cancer Res* 68(19):7711-7717). Se espera que niveles aumentados de DKK3b atenúen tanto el inicio del tumor como el mantenimiento del tumor.

Establecer la influencia de DKK3b endógena en la tumorigénesis mamaria inducida por Wnt1 *in vivo*

El ratón indicador de Dkk3b^{CFP/CFP} con pérdida de función, condicional, se aparea con ratones MMTV-Wnt1 (JAX). Es importante que la supresión condicional de DKK3b puede invertirse por coexpresión de Cre recombinasas (MMTV-, BLG-, WAP-) dirigidas a glándulas mamarias. La hipótesis de los inventores es que niveles de DKK3b reducidos agravarán el desarrollo tumoral inducido por Wnt1 debido al aumento descontrolado de β -catenina citoplasmática. La latencia tumoral y los fenotipos tumorales del Dkk3b^{CFP/CFP} parental (con inactivación génica de Dkk3b), MMTV-WNT1 (expresor de Dkk3b) y Dkk3b^{CFP/CFP}/MMTV-WNT1 cruzado (con inactivación génica de Dkk3b, productores de tumores) y Dkk3b^{CFP/CFP}/MMTV- WNT1/MMTV-Cre (restauración de Dkk3b, productor de tumores) se comparan. (Simin, *et al.* **2005** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70:283-290; Herschkowitz, *et al.* **2007** *Genome Biol* 8(5):R76; Lu, *et al.* **2011** *Mol Cancer Res* 9(4):430-439; Simin, *et al.* **2004** *PLoS Biol* 2(2):E22). En el análisis más sencillo, los inventores anticipan que ratones que carezcan de DKK3b tendrán más tumores con aparición más rápida, y los animales reparados por Cre que expresan DKK3b tendrán menos tumores con aparición más lenta.

Determinar los efectos de DKK3b alterada en la función de células iniciadoras de tumores mamarios

Las células primarias derivadas de tumores mamarios en el ratón TBP con patrones de expresión de DKK3b^{alto} (MMTVWnt1: Dkk3b^{+ /CFP}) y DKK3b^{bajo} (MMTV-Wnt1:Dkk3b^{CFP/CFP}) proporcionan un recurso único para evaluar el efecto de la actividad de DKK3b en células iniciadoras de tumores. Usando grupos seleccionados por FACS de células que expresan DKK3b alta y baja de tumores primarios, se examina la influencia de DKK3b en las capacidades iniciadoras de tumores por ensayos *ex vivo* e *in vivo*. Se espera que células con DKK3b alta supriman la señalización de Wnt al nivel de su transductor intracelular, β -catenina, y reduzcan de este modo el inicio del tumor. En estudios preliminares, los inventores han descubierto que la inhibición de la ruta de Wnt redujo notablemente la formación de tumorosfera en cinco líneas celulares derivadas de tumor independientes (**FIG. 9**).

La relación entre los niveles de expresión de DKK3b y el número de células que muestran el fenotipo celular iniciador de tumor (CD49f^{alto}, CD24^{bajo}, CD61⁺) en tumores se usan para identificar la influencia de DKK3b en células iniciadoras de tumores del ratón TBP. Los niveles de DKK3b y β -catenina en células clasificadas por flujo se ensayan mediante qPCR e inmunotransferencia. Se espera que las células iniciadoras de tumores tengan niveles menores de expresión de DKK3b que la población celular restante.

A continuación, se establecerá la capacidad iniciadora del tumor basal de células tumorales epiteliales humanas primarias clasificadas (CD49f⁺, CD44⁺, CD24⁻, EpCAM⁺). Las células se prepararán a partir de muestras tumorales humanas recién recogidas (banco tumoral Umass) y se realizarán ensayos *in vitro* (agar blando/tumorosfera) e *in vivo* (trasplante) como se ha detallado anteriormente. Las poblaciones de células clasificadas se manipularán mediante suministro vírico de ADNC de Dkk3b (sobreexpresión) o ARNi (atenuación) y la expresión de DKK3b alterada por influencia en tumorigénesis se determinará sistemáticamente.

Demostrar que la expresión de DKK3b exógena en tumores establecidos provoca regresión tumoral

El modelo murino de los inventores de cáncer trasplantado se modifica para incluir células tumorales derivadas de TBP que expresan TOPFlash conducido por TCF y una DKK3b inducible por tet. Estas células indicadoras permiten visualizar el crecimiento tumoral estimulado por Wnt en un ratón vivo. Se induce la expresión de DKK3b mediante inyección tumoral oral, IP o directa de tetraciclina en diferentes estadios del crecimiento tumoral y el tamaño tumoral se supervisa por captura de imágenes de animal vivo usando el sistema de captura de imágenes IVIS de Xenogen®. Usando este enfoque, se puede relacionar directamente la expresión de DKK3b con cambios específicos de ruta en la señalización de Wnt de células tumorales y regresión tumoral. Los estudios piloto *in vitro* muestran que la expresión de luciferasa dependiente de Wnt se reprimió bloqueando la señalización de TCF (**FIG. 10**).

Métodos y procedimientos

Histología: Se usan técnicas inmunohistoquímicas e inmunofluorescentes convencionales para analizar la morfología del tejido mamario como se detalla en el presente documento.

FACS. Se han presentado marcadores de células iniciadoras de tumores para ratones (CD49f^{alto}, CD24^{bajo}, CD61⁺) y cánceres de mama humanos (CD49f⁺, CD44⁺, CD24⁻, EpCAM⁺). Todos los anticuerpos están disponibles en el mercado.

Ensayo de tumorosfera. Las células tumorales se cultivan en condiciones no adherentes (placas de unión ultra baja, Corning) en medio definido que contiene EGF y FGF. Se determinan las unidades formadoras de tumorosfera (UFT) de ratón por recuento. (Liu, *et al.* **2007** *Cancer research* 67(18):8671- 8681). El tiempo hasta la generación y el número total de tumorosferas son los dos parámetros usados como la lectura de ensayo.

Suspensión y trasplante de células. Para explorar la capacidad de DKK3b para provocar la regresión de tumores establecidos, una propiedad clave de cualquier diana terapéutica, se generan células TBP que albergan un indicador TOPFlash conducido por TCF que expresan DKK3b o GFP (control) bajo el control de un promotor inducible por

tetraciclina. Las células se inyectan en los panículos adiposos mamarios de ratones receptores singénicos (FVB). También se produce una línea celular TPB que también porta un indicador de luciferasa TOPFlash integrado de forma estable (M50 Super 8xTOPFlash), conducido por ocho copias del elemento de unión a TCF optimizado (**FIG. 10**).

Para el trasplante, se mezclan 1×10^6 células 1:1 con Matrigel y se inyectan en la glándula mamaria n.º 2 de ratones FVB de 7-8 semanas de edad receptores. Se proporciona tetraciclina por el agua para beber, inyección IP, inyección tumoral directa, basándose en el método de suministro óptimo, cuando los tumores alcancen 0,5 cm de diámetro como se mide usando calibradores. El crecimiento tumoral se supervisa semanalmente mediante el sistema de captura de imágenes IVIS de Xenogen® como se detalla en el presente documento. Cuando los tumores de control alcancen ~1,5 cm de diámetro, los tumores se escindirán y se caracterizarán las rutas de señalización afectadas por DKK3b. Los cálculos de potencia indicaron que los grupos de 10-11 ratones inyectados para cada línea celular son suficientes para conseguir resultados estadísticamente significativos.

Estadística y análisis de potencia. Los métodos estadísticos y los análisis de potencia se describen en el presente documento.

La interrupción de la señalización de Wnt reduciendo el factor de cambio de β -catenina citoplasmática tiene importantes implicaciones en la traducción como una nueva ruta reguladora que puede detener la expansión de la célula iniciadora de tumor mamario. Desde este punto de vista, la reexpresión de DKK3b, bien mediante activación in situ a través de su promotor nativo o bien mediante transfección de ADNc de Dkk3b atenuará el crecimiento independiente del anclaje de células epiteliales mamarias y bloqueará la formación de tumorosferas, una propiedad correlacionada con la capacidad de inicio de tumor *in vivo*. (Liu, *et al.* **2007** *Cancer research* 67(18):8671-8681). Los experimentos descritos son sencillos en su diseño, validados por ensayo y proporcionan la base experimental para la aplicación terapéutica de DKK3b para la regresión tumoral. En los experimentos *in vivo*, se espera que la pérdida de DKK3b agrave la tumorigénesis de Wnt1, pero eso requiere inactivación de ambos alelos lo que puede tener consecuencias desafortunadas. Para evitar esto, se realiza atenuación de DKK3b específica de tumor mediante suministro tumoral de ARNip lentivírico, un medio para generar mutantes de expresión de DKK3b dirigidos a tejido para análisis de evolución tumoral basada en Wnt1.

Edición génica basada en ZFN en la producción de ratón indicador de DKK3b y cualquier estudio de función de promotor

Se usa el enfoque de edición génica basada en nucleasa de dedo de zinc (ZFN) para producir un ratón identificador de *Dkk3b* redirigiendo el promotor de DKK3b para conducir la expresión de un indicador fluorescente (**FIG. 4**).

Durante la validación de los pares de ZFN, se generan por defecto células CFP C8 conducidas por promotor de *Dkk3b*, con genes editados, de pares de ZFN (*C8Dkk3b^{CFP+/-}*). El astrocito C8 es una línea celular inmortal con expresión génica de *Dkk3* suprimida y puede usarse para explorar el acontecimiento o los acontecimientos celulares influidos por DKK3b sin la influencia confusa de aneuploidía/poliploidía y la inestabilidad genética inherente en líneas celulares tumorales. Además, esta línea celular es un recurso inestimable para estudios de la función de promotor. Se realiza análisis funcional sistemático del promotor de *Dkk3b* para identificar elementos promotores de *Dkk3b* individuales usando expresión de CFP como el criterio de valoración y análisis por ordenador (TranFac, algoritmos de Genomatrix) de elemento o elementos promotores. Uno o más moduladores promotores que aumentan la transcripción de este locus se identifican usando este enfoque de vigilancia de promotores.

El locus de *Dkk3b* de gen editado está notablemente “silenciado” por hipermetilación en las células C8 inmortalizadas. Se usaron inhibidores de metilasa y activadores de desacetilación para aumentar la expresión de este promotor. Como se muestra en la figura 12, las células *C8^{Dkk3bCFP+/-}* con genes editados expresaron señales de CFP débiles, mientras que la inhibición de la metilación aumentó notablemente la expresión del indicador. Estos datos validan la estrategia de dirección a ZFN, confirman la inserción de CFP y muestran que los inhibidores de metilasa pueden desreprimir el promotor de DKK3 “silenciado”.

Proteína de fusión de DKK3b y efectos en la expresión génica dependiente de β -catenina, proliferación celular y metástasis

Se fusionan dominios de transducción de membrana pequeños (MTD) con el extremo N-terminal de DKK3b para producir una proteína de fusión biodisponible usando métodos publicados (Nagahara, *et al.* **1998** *Nature medicine* 4(12): 1449-52). Se ensambló una construcción de fusión de TAT-DKK3b y se purificó la proteína de fusión a partir de lisados bacterianos desnaturalizados por urea usando resinas Ni-NTA. La **FIG. 13A** muestra los dominios epitópicos de la proteína de fusión de TAT-DKK3b. Como se muestra en la **FIG. 13B**, un tratamiento de 5 minutos de células NMuMG y HEK293T estimuladas por Wnt con TAT-DKK3b (>40 fg/célula) silenció la expresión génica conducida por TCF, E2F y RelA dependiente de β -catenina y restauró la expresión de marcadores suprimidos por β -catenina de diferenciación celular, E-cadherina y E1f3 (**FIG. 13B**). Los datos en la **FIG. 14** muestran que el tratamiento con TAT-DKK3b no tuvo ningún efecto en células NMuMG no transformadas, pero detuvo la proliferación celular de células estimuladas por Wnt. TAT-DKK3b también bloqueó la migración de las células de cáncer de mama

MDA-MB-231 humano altamente invasivo. Estos datos muestran que la DKK3b que permea en membrana, expresada en bacterias, conserva todas las propiedades antineoplásicas de la DKK3b nativa.

La proteína de fusión de TAT-HA-DKK3b en estudios iniciales incluyó marcadores epitópicos y secuencia complementaria que comprendía casi el 25 % de la proteína de fusión y no son deseables en un producto terapéutico. Para reducir la antigenicidad y eliminar la secuencia innecesaria, el casete de TAT-HA se reemplaza con un MTD sintético de 11 restos de longitud que se ha indicado que aumenta la permeabilidad de membrana en >30 veces, elimina/reduce la antigenicidad y extiende la semivida biológica de la proteína de fusión codificada. La MTD-DKK3b optimizada conservará el marcador de polihistidina para purificación de la MTD-DKK3b en condiciones desnaturalizantes.

Optimizar condiciones para producción de MTD-DKK3b en bacterias. Se preparan cultivos pequeños de las construcciones de pMTD-DKK3b individuales en *E. coli* que expresan polimerasa T7 inducible por IPTG. Se seleccionan las condiciones de crecimiento/inducción de IPTG de modo que >90 % de la MTD-DKK3b se localice en cuerpos de inclusión. Las células bacterianas se extraen con urea, se purifica de ellas MTD-DKK3b mediante aislamiento de afinidad por Ni⁺⁺ y después se formulan sin urea. Los niveles de expresión de MTD-DKK3b se evalúan mediante análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos anti poliHis o anti DKK3b. Las MTD-DKK3b candidatas purificadas se ensayan con respecto a pureza mediante SDS-PAGE y SEC-HPLC y con respecto a bioactividad usando líneas celulares indicadoras que secretan indicadores dependientes de β -catenina al medio de cultivo (véase posteriormente). El clon óptimo se usa para producir un banco celular maestro para futuro desarrollo clínico.

Desarrollar esquema de purificación para MTD-DKK3b desplegada usando patrones de GMP. La lisis de células bacterianas y aislamiento de MTD-DKK3b de cuerpos de inclusión se optimizan sistemáticamente. La concentración de desnaturalizantes, urea y/o sales caotrópicas, condiciones líticas y etapas de limpieza se examinan de forma sistémica. Las concentraciones de urea se optimizan para máxima recuperación de la proteína de fusión minimizando al mismo tiempo el contenido de urea de los tampones de extracción para facilitar el cambio de escala de la purificación.

Las proteínas extraídas con urea se purifican por afinidad en resina de Ni⁺⁺ y se eluyen con imidazol en urea tamponada. La urea se retira después rápidamente para minimizar el replegamiento de la proteína de fusión MTD-DKK3b. LA optimización de la purificación en este estadio implica principalmente investigación de las etapas de lavado mientras que la proteína está unida a la resina de Ni⁺⁺ con concentraciones de imidazol y pH de tampón de lavado variables. Un parámetro clave en este estadio es la reducción de la contaminación. La bioactividad de la MTD-DKK3b purificada se evalúa en líneas celulares indicadores dependientes de β -catenina. El replegamiento y la agregación se supervisan mediante unión con colorante fluorescente.

Se proporciona información adicional sobre el ensamblaje de TAT/PTD DKK3b en las **FIG. 15-22**.

En esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias plurales, a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa.

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la materia. Aunque puede usarse también cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente divulgación, se describen ahora los métodos y materiales preferidos. Los métodos enumerados en el presente documento pueden llevarse a cabo en cualquier orden que sea lógicamente posible, además de un orden particular desvelado.

REIVINDICACIONES

1. Una forma truncada de una proteína Dickkopf 3 (DKK3) humana aislada, que está codificada por los exones 3-8 del locus génico de DKK3.
2. Una célula hospedadora transformada con una forma truncada de una proteína Dickkopf 3 (DKK3) humana recombinante aislada, que está codificada por los exones 3-8 del locus génico de DKK3.
3. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una forma truncada de proteína Dickkopf 3 (DKK3) humana, que está codificada por los exones 3-8 del locus génico de DKK3.
4. Un virus recombinante modificado genéticamente para expresar una forma truncada de proteína Dickkopf 3 (DKK3) humana, que está codificada por los exones 3-8 del locus génico de DKK3.
5. Un transgén recombinante que comprende un polinucleótido que codifica una forma truncada de proteína Dickkopf 3 (DKK3) humana, que está codificada por los exones 3-8 del locus génico de DKK3.
6. Una composición farmacéutica que comprende un virus recombinante modificado genéticamente para expresar una forma truncada de proteína Dickkopf 3 (DKK3) humana, que está codificada por los exones 3-8 del locus génico de DKK3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Una composición farmacéutica que comprende un virus recombinante modificado genéticamente para expresar una forma truncada de proteína Dickkopf 3 (DKK3) humana, que está codificada por los exones 3-8 del locus génico de DKK3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento del cáncer o en la inhibición de la progresión tumoral.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento del cáncer o en la inhibición de la progresión tumoral, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, liposarcoma, tumor neuroendocrino, mesotelioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma, leucemia, tumor maligno linfóide, cáncer de células escamosas, cáncer de células escamosas epiteliales, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, cáncer testicular, cáncer esofágico, un tumor del tracto biliar y cáncer de cabeza y cuello.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8 para su uso en el tratamiento del cáncer o inhibición de la progresión tumoral, en la que el cáncer o el tumor es el de mama o el de próstata.
10. Una composición farmacéutica que comprende una forma truncada de proteína Dickkopf 3 (DKK3) humana, que está codificada por los exones 3-8 del locus génico de DKK3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Una composición farmacéutica que comprende una forma truncada de proteína Dickkopf 3 (DKK3) humana, que está codificada por los exones 3-8 del locus génico de DKK3 para su uso en el tratamiento del cáncer o en la inhibición de la progresión tumoral.
12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento del cáncer o en la inhibición de la progresión tumoral, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, liposarcoma, tumor neuroendocrino, mesotelioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma, leucemia, tumor maligno linfóide, cáncer de células escamosas, cáncer de células escamosas epiteliales, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, cáncer testicular, cáncer esofágico, un tumor del tracto biliar y cáncer de cabeza y cuello.
13. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento del cáncer o en la inhibición de la progresión tumoral, en la que el cáncer o el tumor es el de mama o el de próstata.
14. Una composición farmacéutica que comprende una forma truncada de proteína Dickkopf 3 (DKK3) humana, que está codificada por los exones 3-8 del locus génico de DKK3 para su uso en la inducción de un efecto de supresión tumoral.

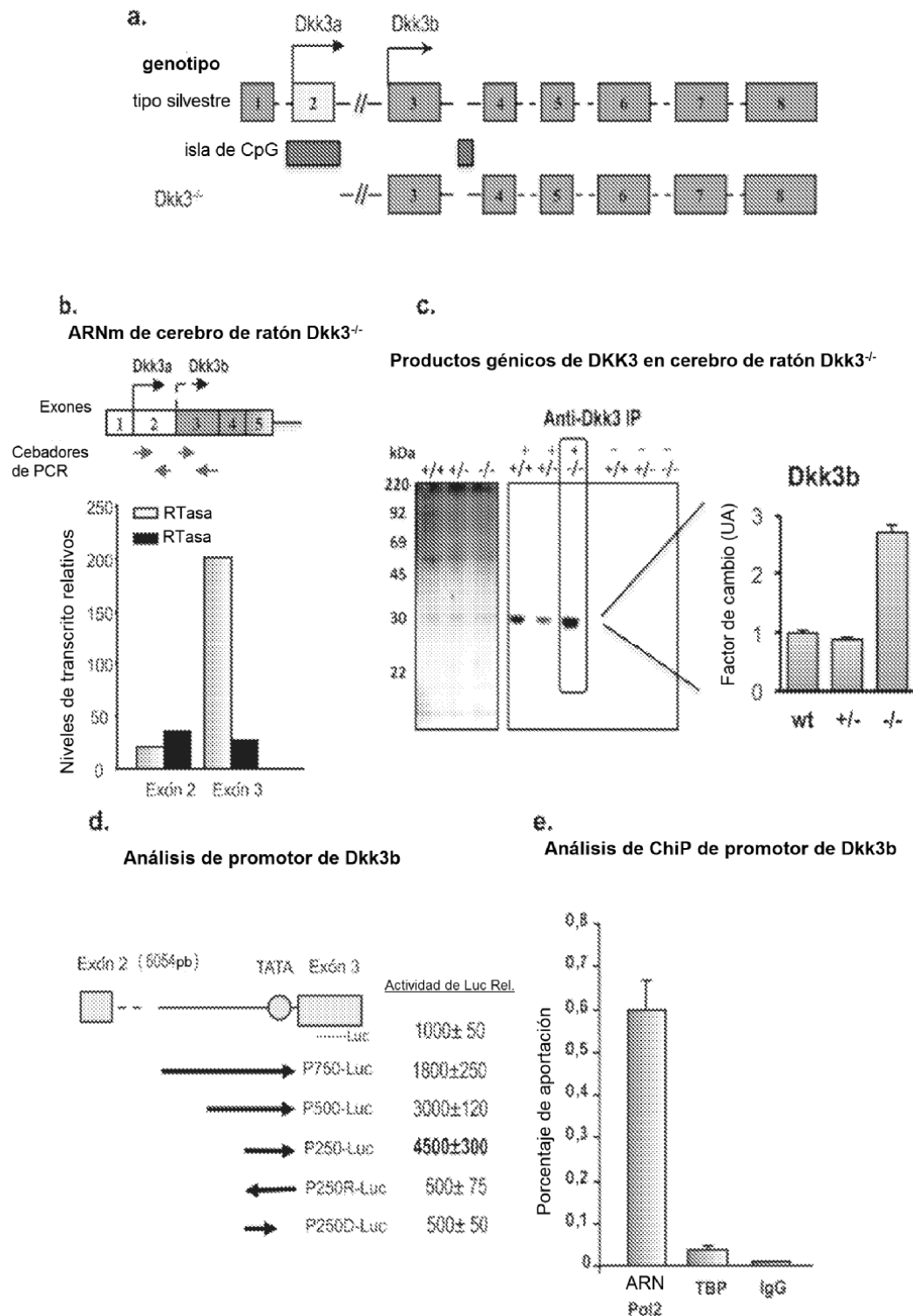


FIG. 1. Caracterización del gen de Dkk3 de ratón.

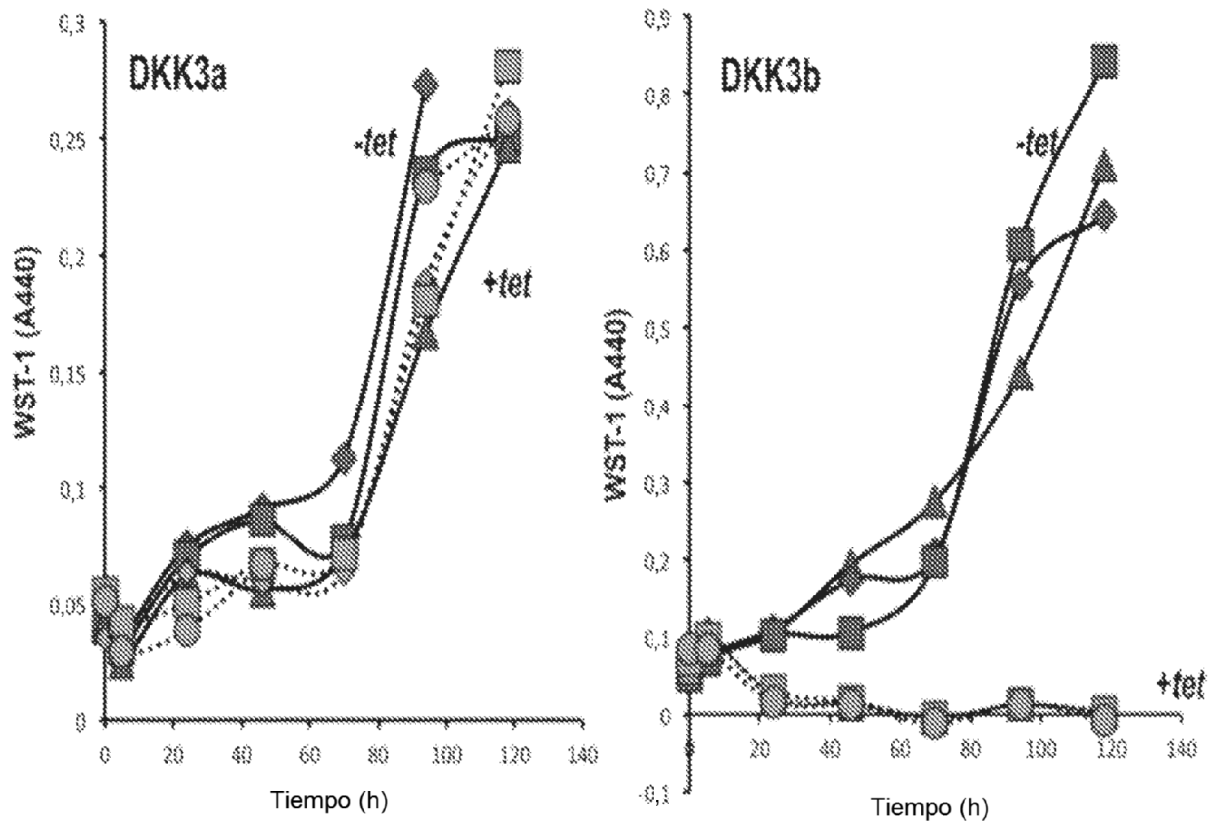


FIG. 2. Efectos de DKK3a y DKK3b en la proliferación de células PC3. Se sembraron líneas celulares PC3 que albergaban la DKK3a regulada por tet o DKK3b regulada por tet en placas de microtitulación de 96 pocillos. Al inicio del experimento, se alimentaron pocillos repetidos (n=5) con medio de cultivo $\pm$ 100 ng/ml de tet y se determinó el número de células usando el reactivo WST-1. Cada punto de datos representa la media de repeticiones quintuples; se muestran tres experimentos de ciclo temporal repetidos.

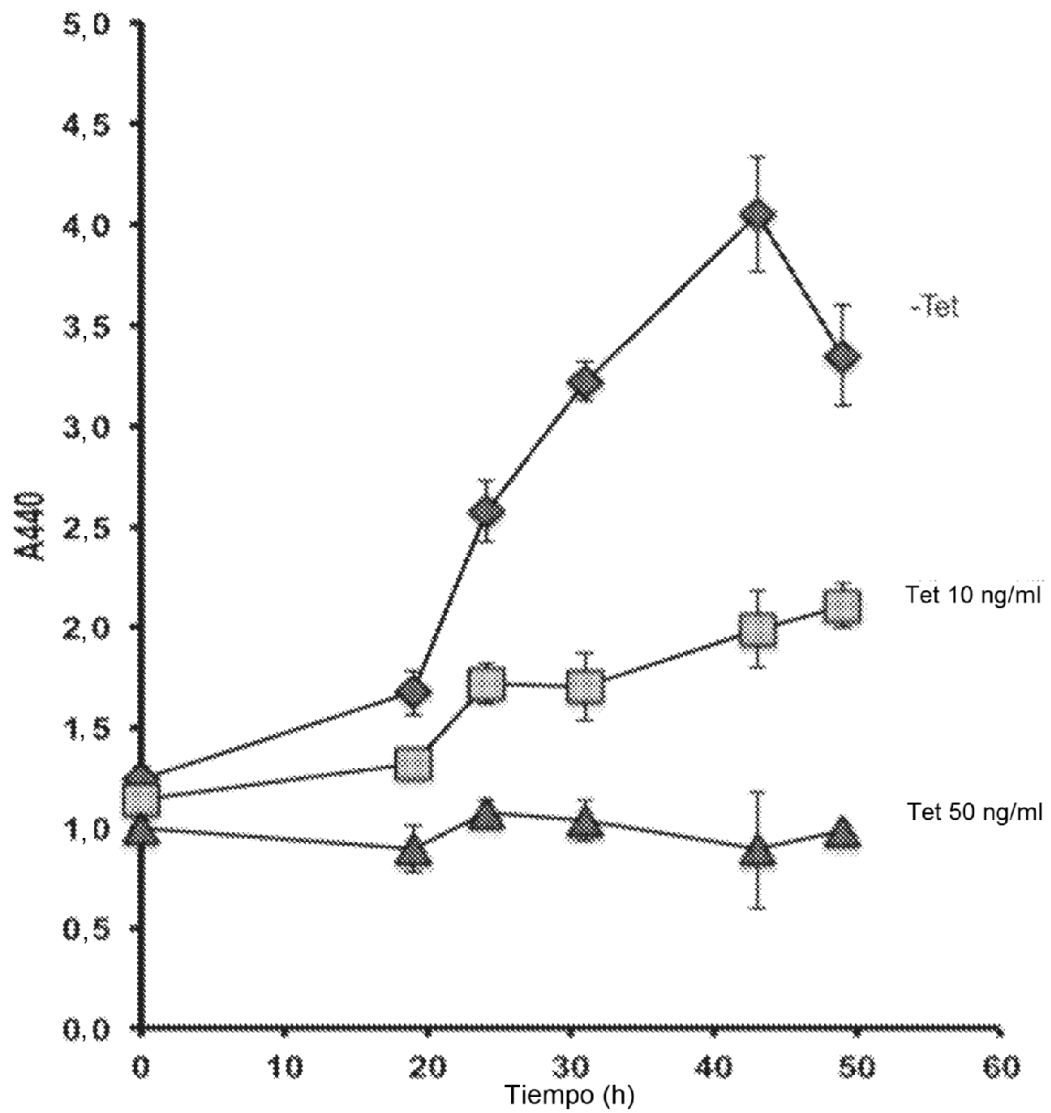


FIG. 3. Efectos del aumento de DKK3b en la proliferación celular en células Du145. Se sembraron células DU145 que portaban la DKK3b inducible por tet en placas de microtitulación de 96 pocillos. A t=0 se añadió tet como se indica y se midió la proliferación celular usando WST-1. Los datos son las medias, n=5.

Construcción de inserción de CFP por RH

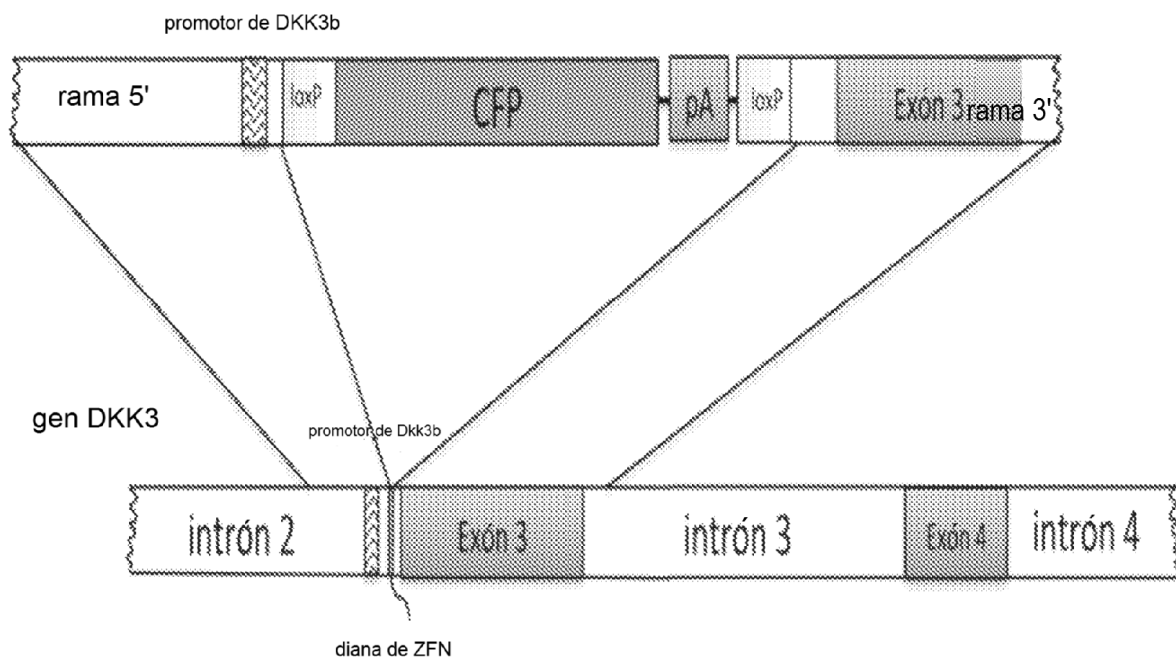


FIG. 4. Esquema de edición génica para el promotor de Dkk3b.

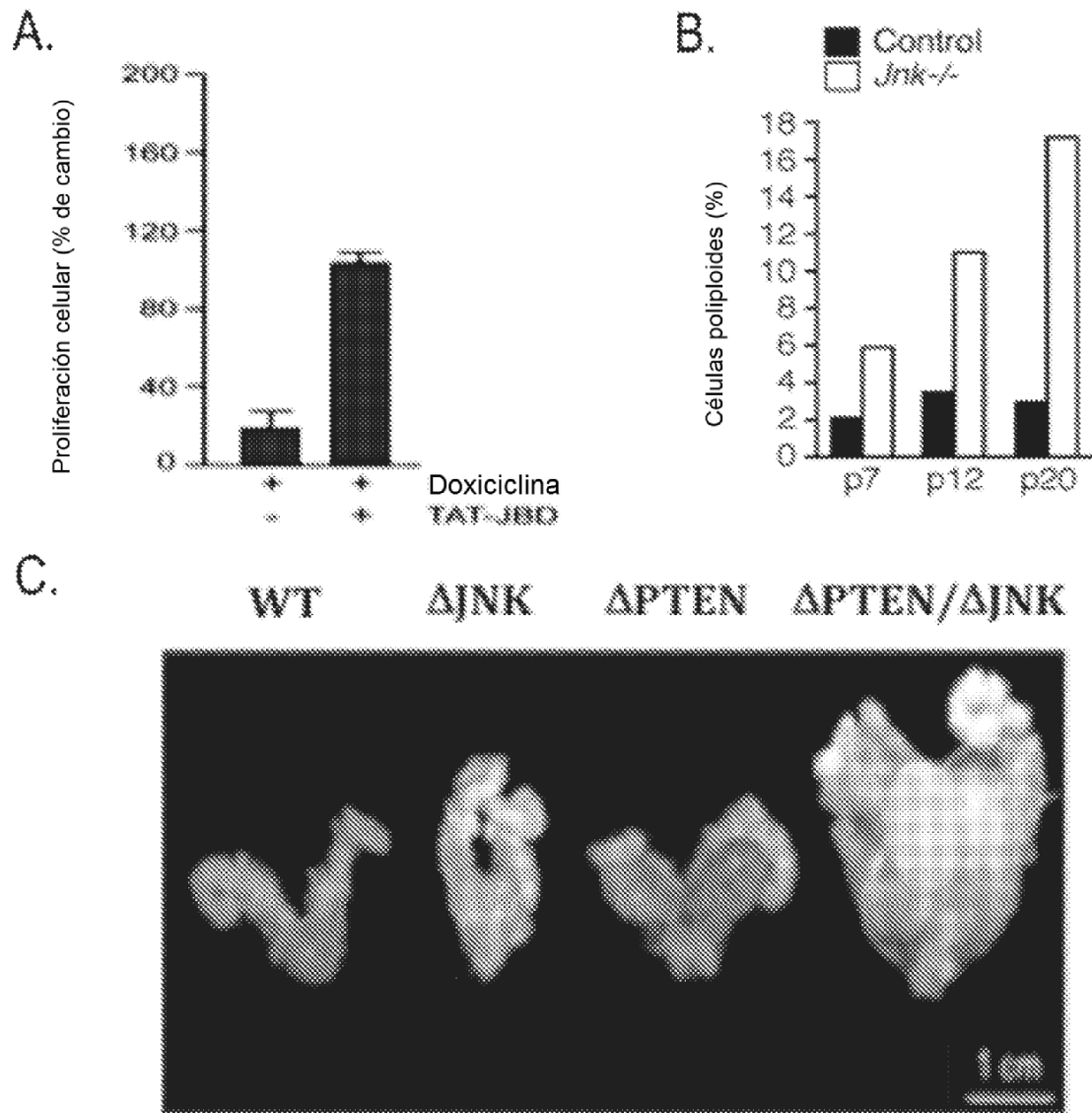
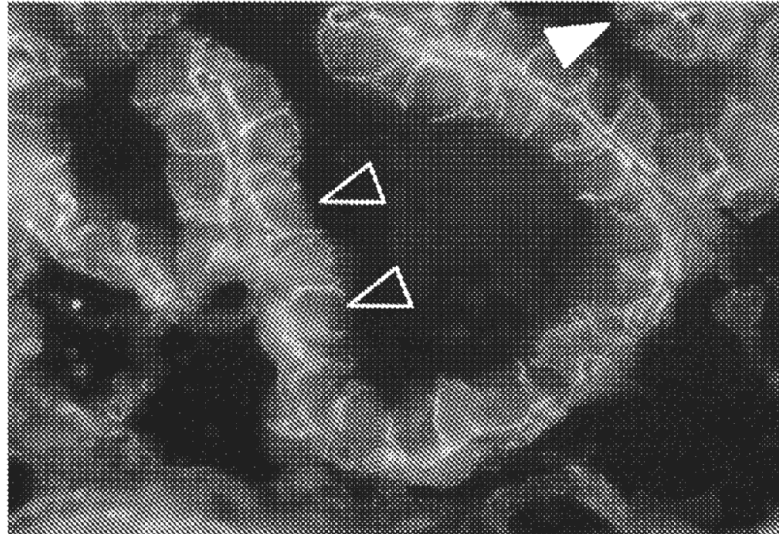


FIG. 5. A. Efecto de la inhibición de JNK en la pérdida celular inducida por DKK3b; B. Análisis de ploidía en MEF de control y Δ Jnk; y, C. Morfología global de tumores de próstata en ratones de tipo silvestre, Δ Jnk, Δ Pten y Δ Pten/ Δ Jnk. A. Las células DU145 que expresaban DKK3b se trataron sin o con el inhibidor de JNK TAT-JBD durante 48 horas. Proliferación celular determinada como en la **FIG. 2**. B. Datos de FACS con >30 000 células teñidas con PI seleccionadas en >4n células; p=número de pases. C. Próstatas recogidas a las 20 semanas de vida.

Alvéolos



Tumor primario

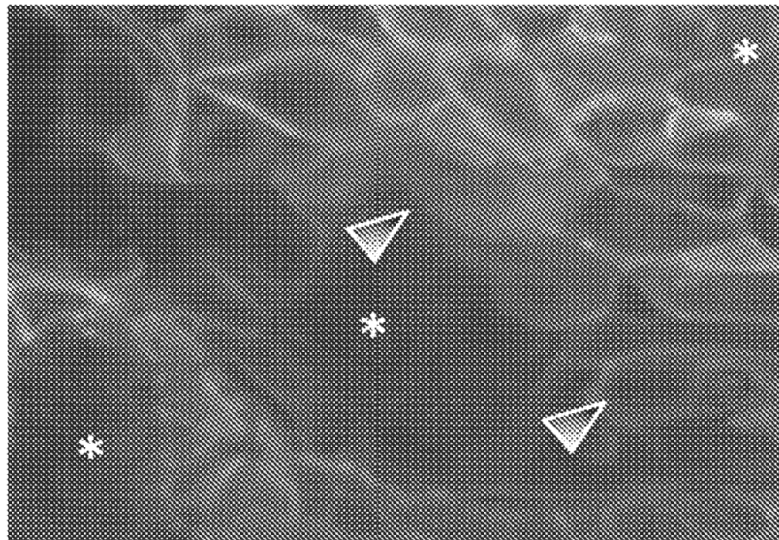


FIG. 6. Expresión de DKK3b y β -catenina en estadios tempranos y tardíos de formación de tumores mamarios en ratones TBP. Flecha vacía, epitelio normal; flecha sólida, células tumorales tempranas; flecha sombreada, β -catenina alta/DKK3b baja; asterisco, DKK3b alta/ β -catenina baja.

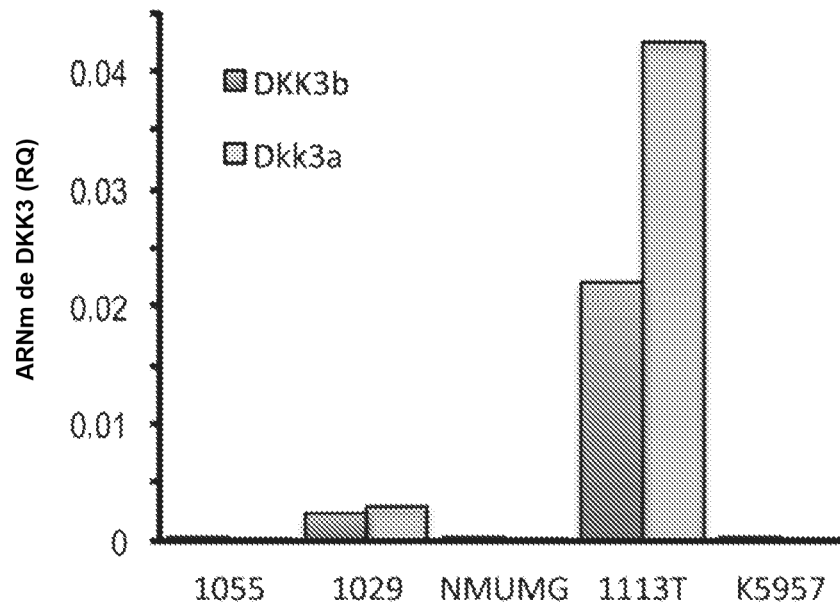


FIG. 7. Dkk3b muestra expresión variable entre líneas celulares derivadas de tumor de ratón. Las líneas celulares 1055, 1029, 1113T y K5957 se obtuvieron de tumores primarios del ratón con TBP inactivado. NMUMG son epitelio mamario normal inmortalizado.

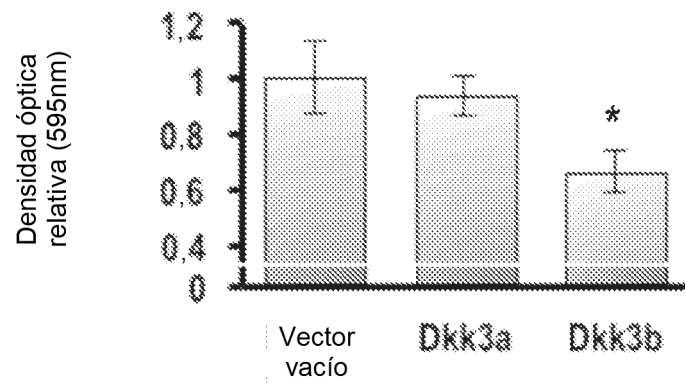


FIG. 8. Dkk3b exógeno pero no Dkk3a suprime la proliferación de células mamarias de ratón NMuMG inmortalizadas ($p < 0,002$).

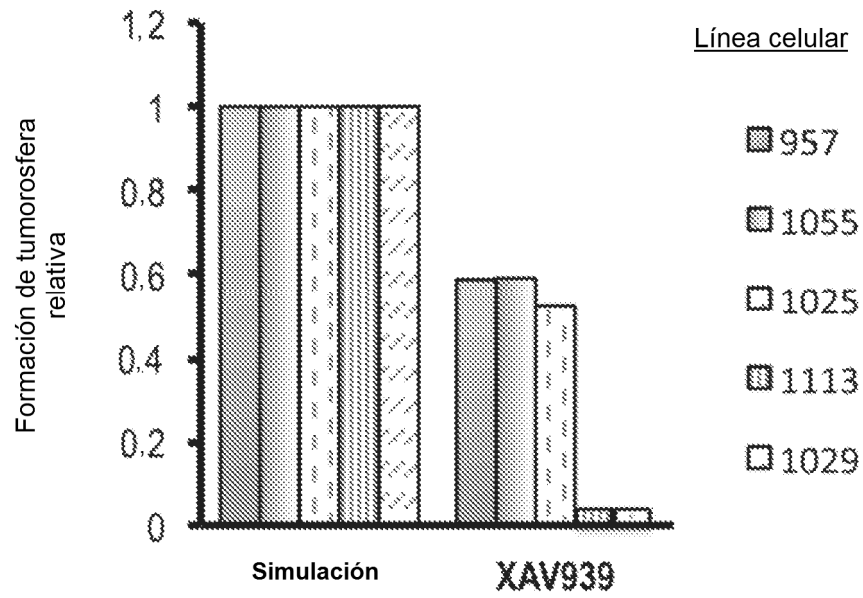


FIG. 9. El inhibidor de la ruta de Wnt, XAV939, suprimió la formación de tumorosferas de cinco líneas celulares derivadas de tumor TBP independientes, lo que indica la necesidad de señalización de Wnt.

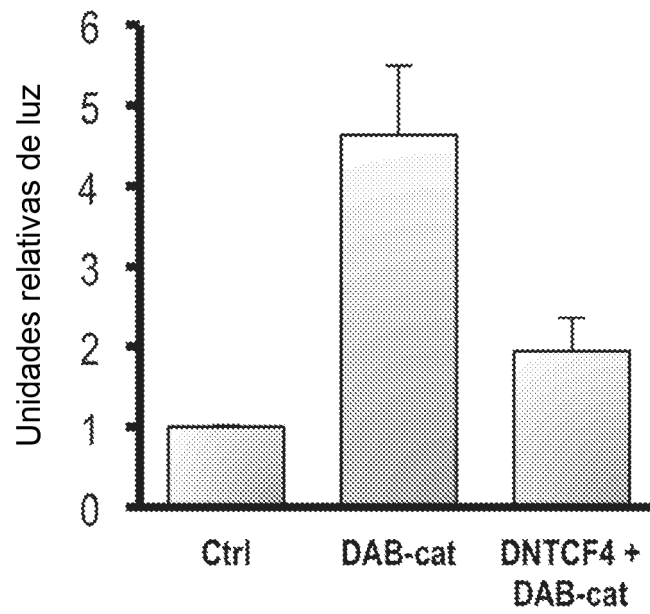


FIG. 10. β -catenina activa de forma dominante (DA-cat) induce actividad TOPFLASH en células derivadas de tumor de ratón (línea 1029) y se reprime por efector negativo dominante, TCF4 (DNTCF4).

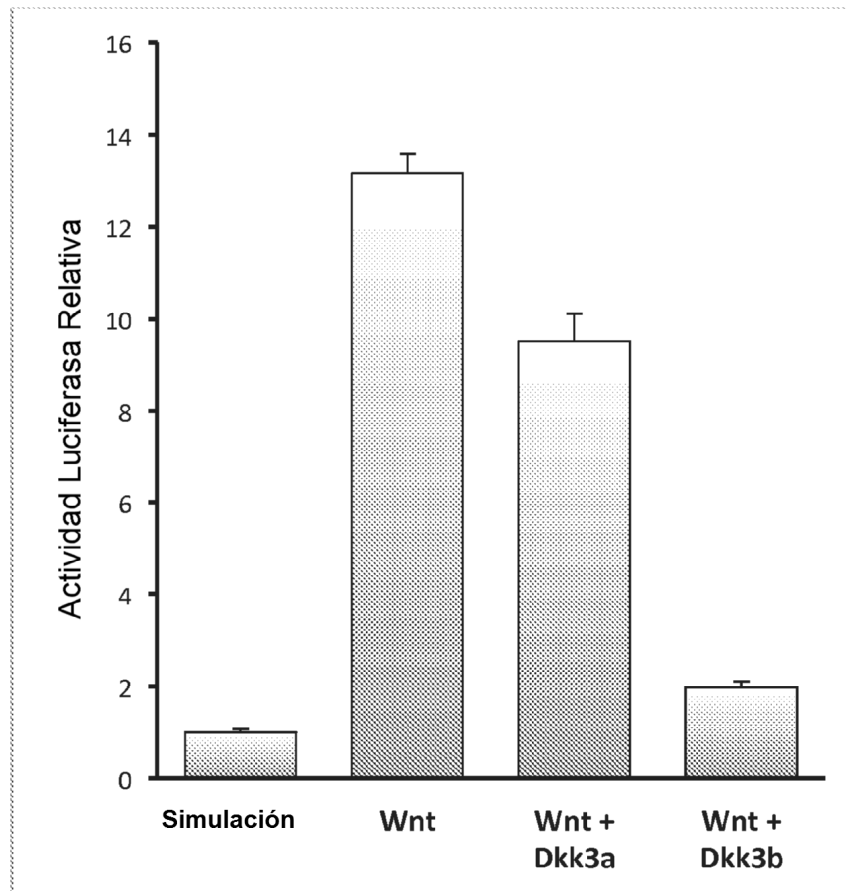
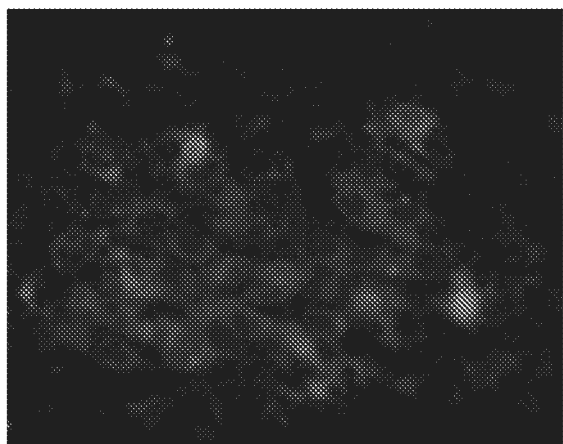


FIG. 11. Se transfectaron células NMuMG con Wnt7a, DKK3a y DKK3b y se cultivaron durante 48 horas. Se prepararon lisados celulares por triplicado y se determinó la expresión de luciferasa usando métodos de laboratorio convencionales.

control



5' azacitidina

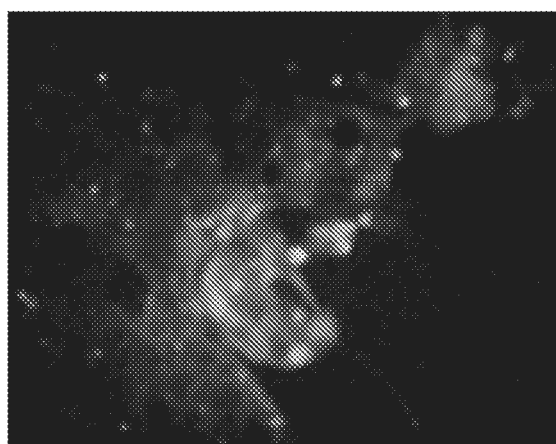


FIG. 12. Células C8DKK3b^{CFP+/-} cultivadas durante 72 horas con el inhibidor de metilasa 5' azacitidina.

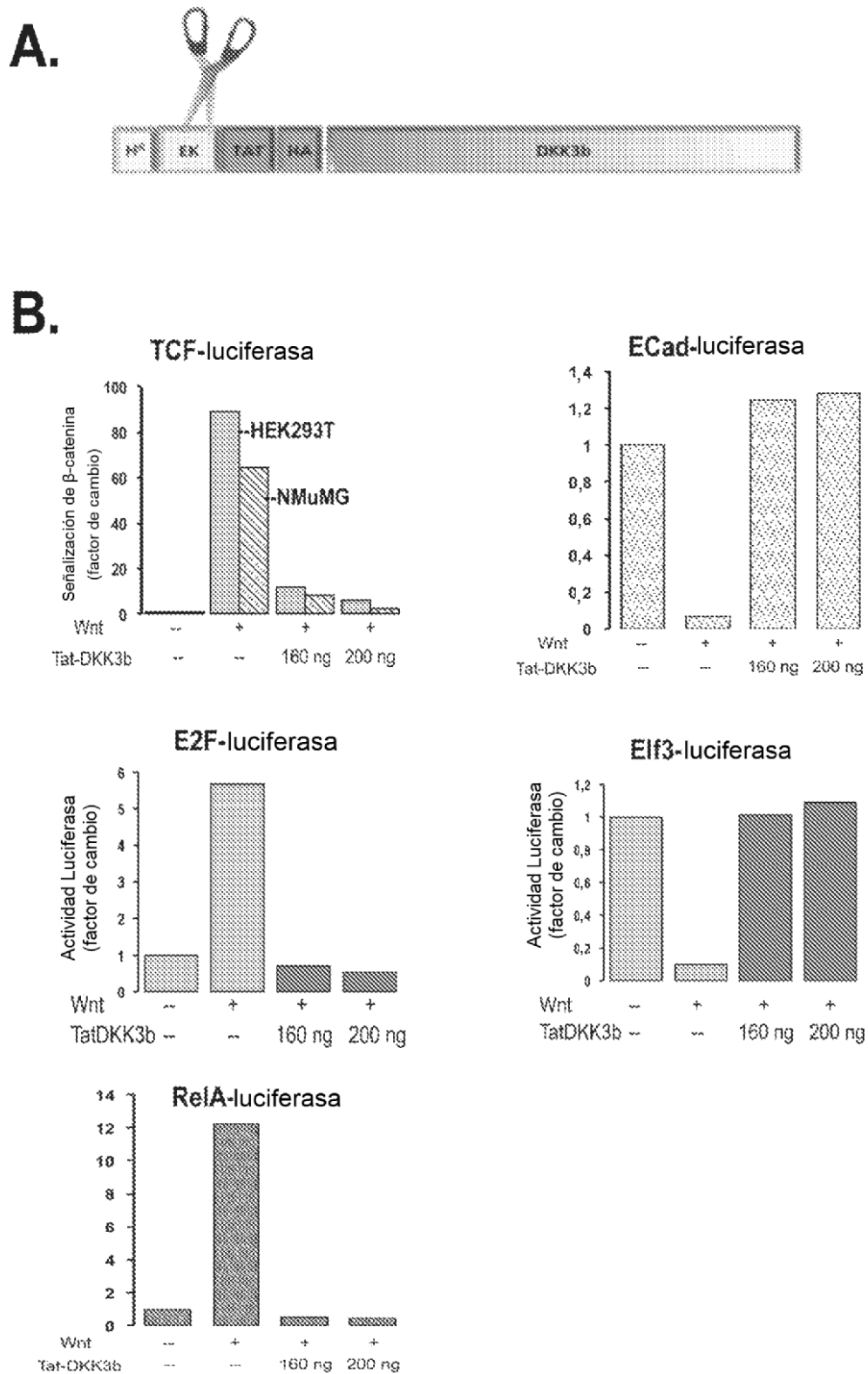


FIG. 13. A. Organización de dominios de la proteína de fusión TAT-DKK3b. B. Efectos de TAT-DKK3b en la expresión génica dependiente de β -catenina en células HEK293T o NMuMG tratadas con Wnt. Las células se transfectaron con cócteles de plásmidos que contenían Wnt, promotor-luciferasa y un control de transfección, pRhuc. Las células se expusieron a TAT-DKK3b durante 5 minutos y se cultivaron durante 24 horas; se prepararon lisados y se determinó la actividad luciferasa.

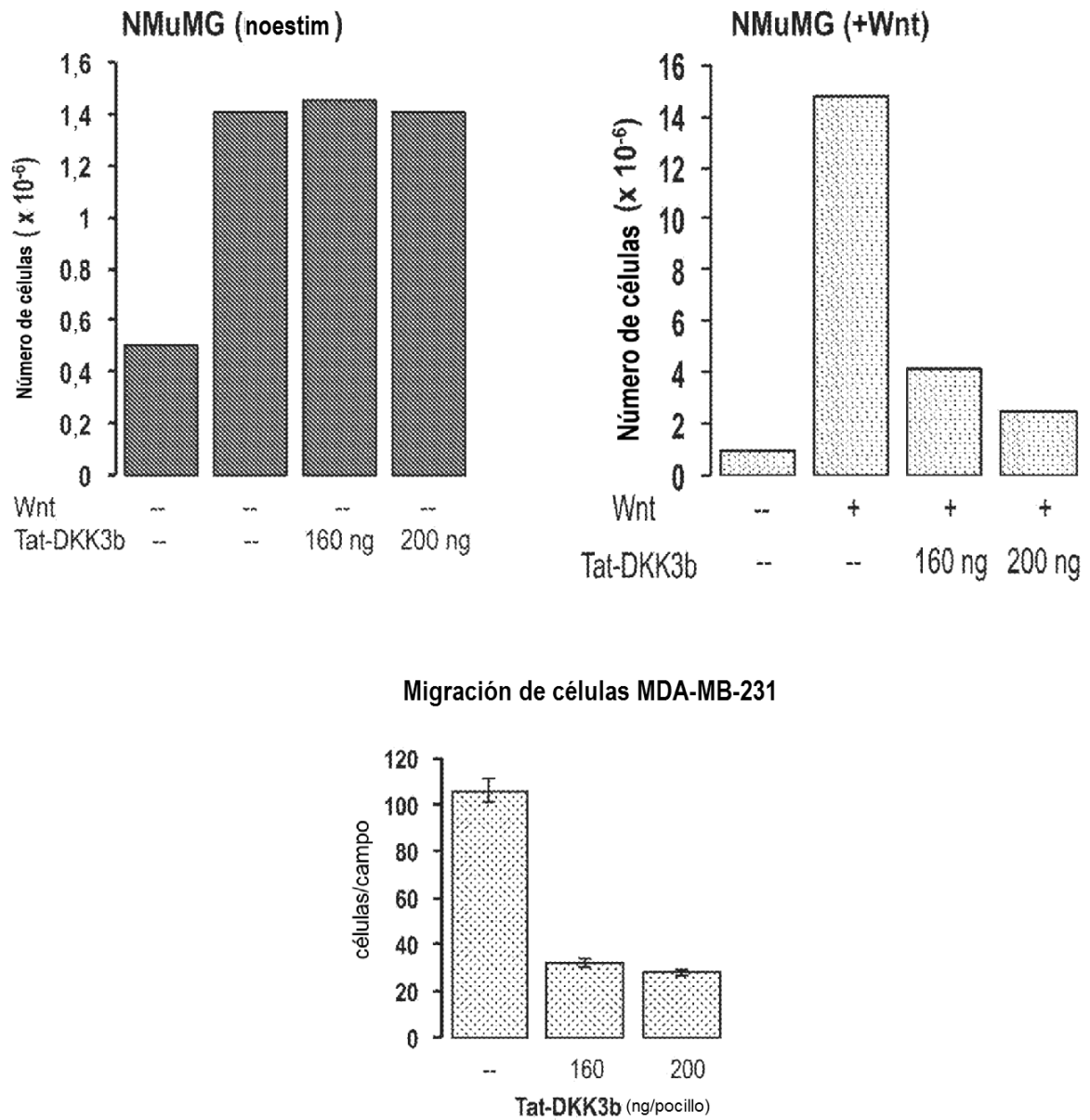


FIG. 14. Efectos de TAT-DKK3b en la proliferación celular y en la metástasis.

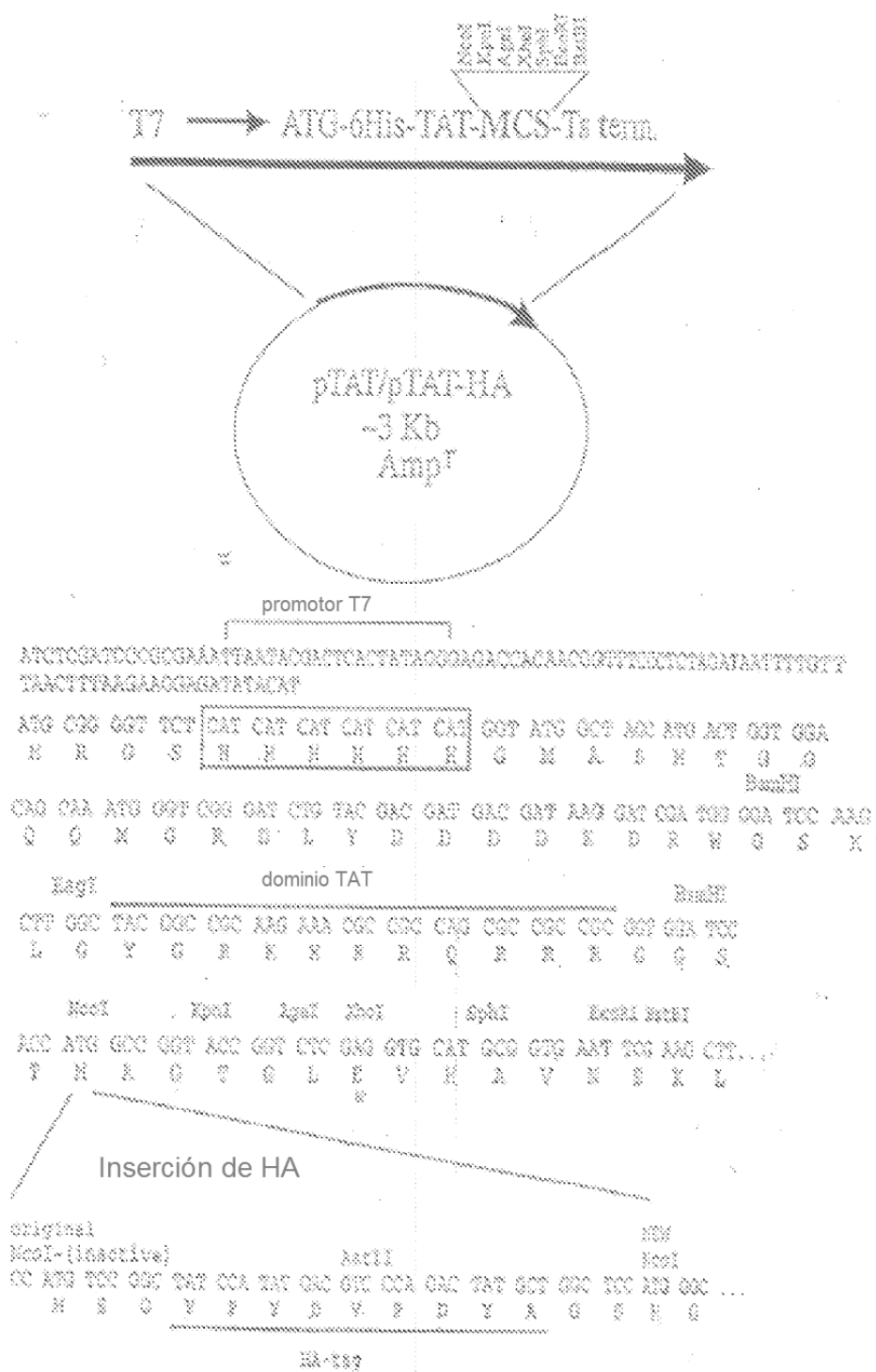


FIG. 15

Nagahara *et al* 1998 *Nat Med*. 12:1449-52

Lea *et al.* **2003** *J. Biochem. Biophys. Methods* 55 (2003) 251–258.

Cadena más PTD optimizada

ES 2 670 606 T3

5' -GATCCAAGCTTGGCTATGCTCGCGCTGCTGCTGCTCAGGCTCGCGCTGGTGGATCCAC-3'

Cadena menos PTD optimizada

5' -CATGGTGGATCCACCAGCGCGAGCCTGAGCAGCAGCAGCGCGAGCATAGCCAAGCTTG-3'

Secuencia: intervalo de secuencia de ADNc de dominio de PTD: 1 a 60

10	20	30	40	50	60
GATCCAAGCTTGGCTATGCTCGCGCTGCTGCTGCTCAGGCTCGCGCTGGTGGATCCAC					
GTTTGAACCGATACGAGCGCGACGACGACGAGTCCGAGCGCGACCACCTAGGTGGTAC					
S	K	L	G	Y	A
R	A	A	A	A	Q
A	R	A	G	G	S
T	M	>			

____ TRADUCCIÓN DE SECUENCIA DE ADNc DE DOMINIO PTD ____>

Dominio PTD hibridado a partir de cebadores sintetizados

GA	TCC	AAG	CTT	GGC	TAT	GCT	CGC	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	CGC	GCT	GGT	GGA	TCC	AC	NcoI	-3'
G	TTC	GAA	CCG	ATA	CGA	GCG	CGA	CGA	CGA	GTC	CGA	GCG	CGA	CCA	CCT	AGG	TGG	TAC		
BamHI	S	K	L	G	Y	A	R	A	A	A	A	Q	A	R	A	G	G	S	T	M

FIG. 16

ES 2 670 606 T3

0

Mapa del extremo N terminal de la proteína de fusión PTD-DKK3b "óptima". (El dominio PTD sintético está subrayado)

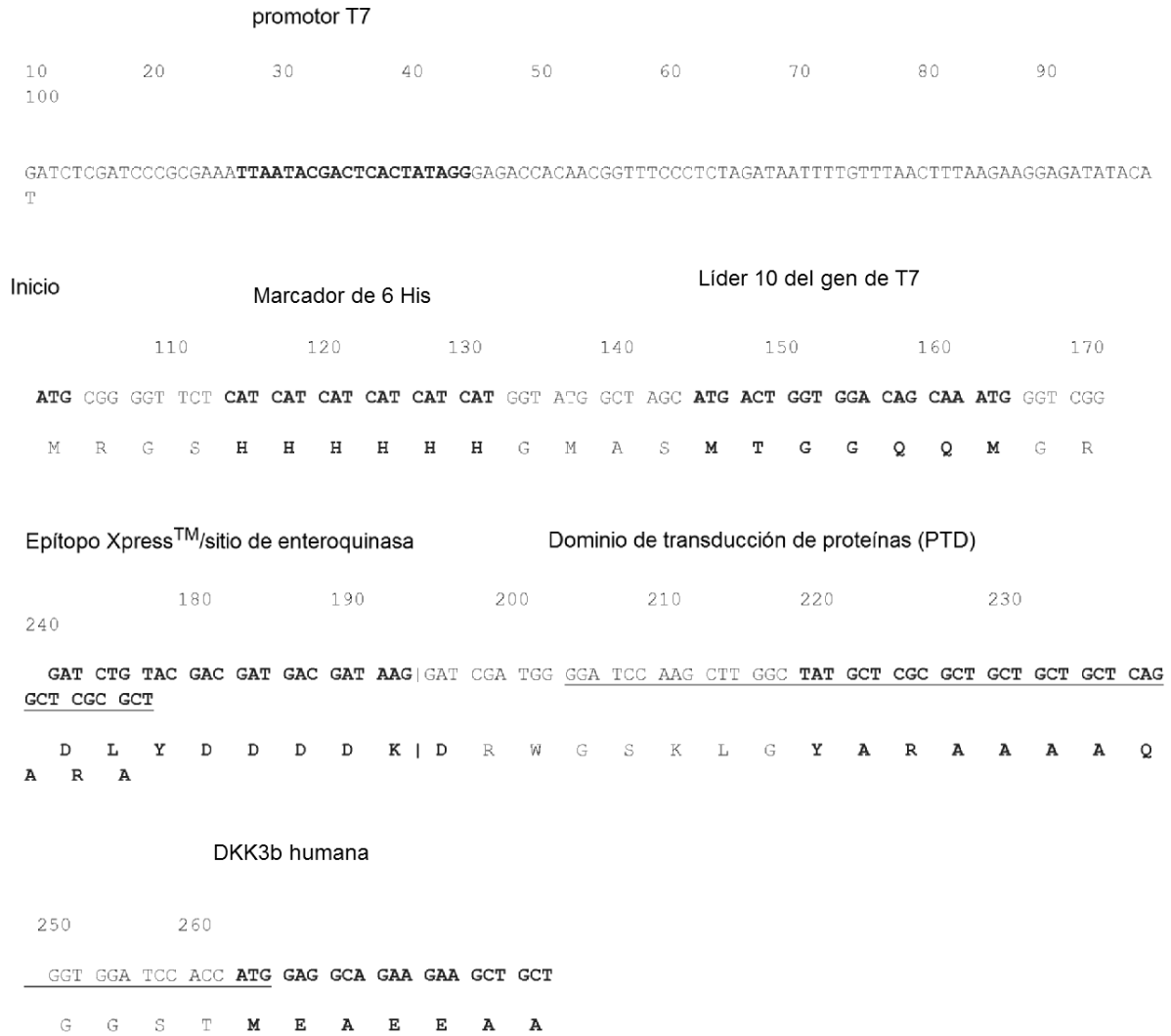


FIG. 17

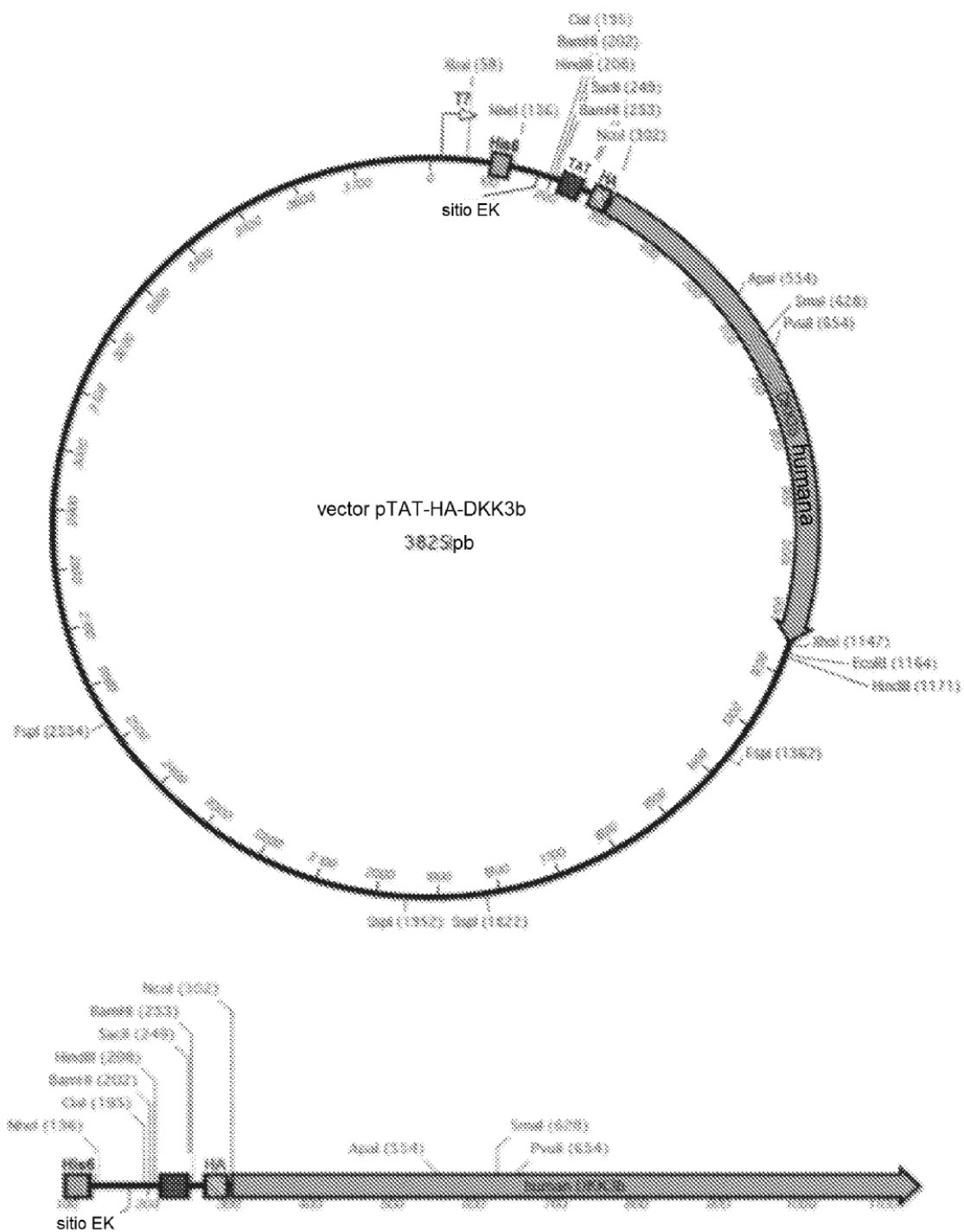


FIG. 18. Construcción de TAT-HA original

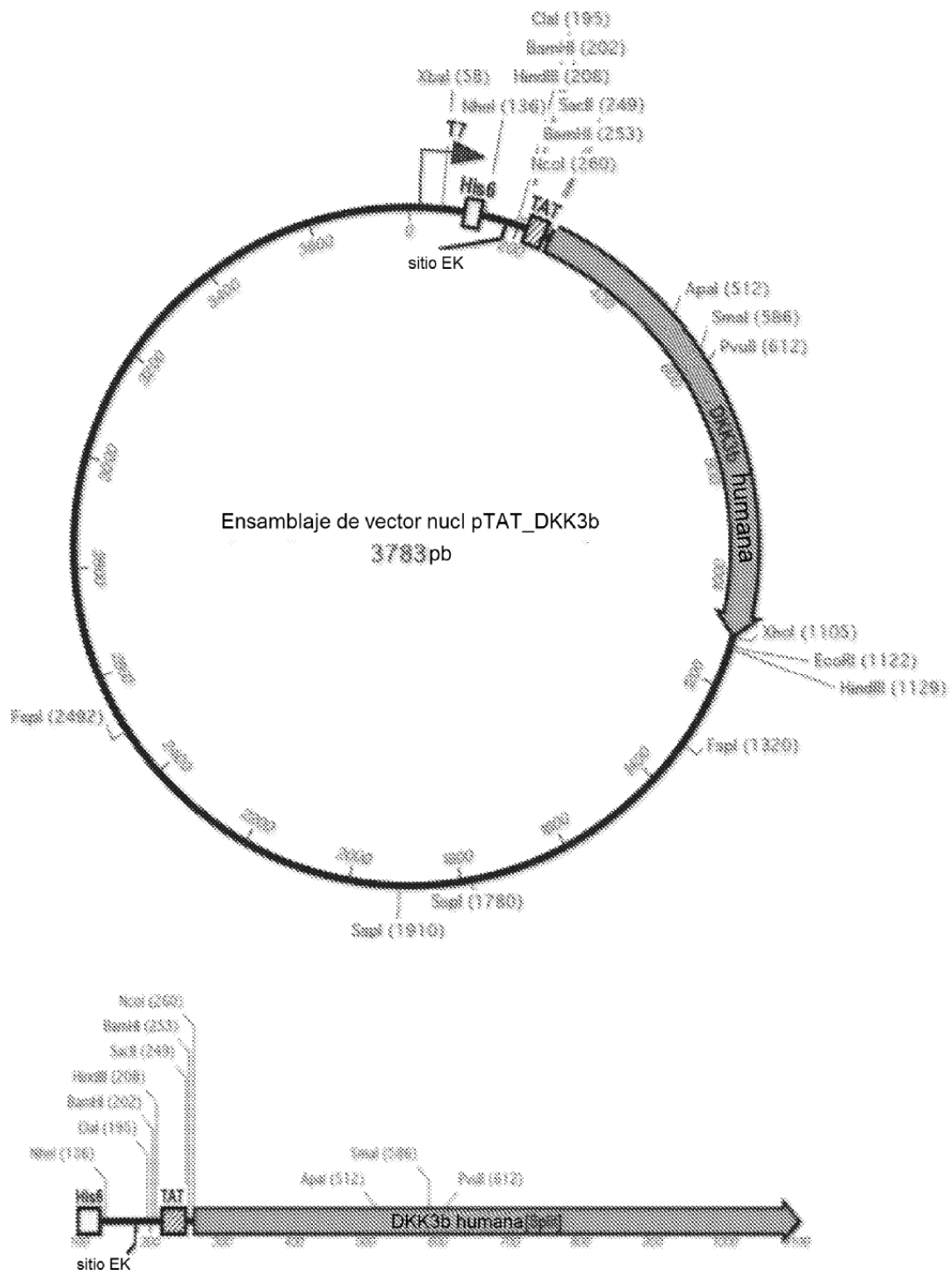


FIG. 19 TAT optimizado

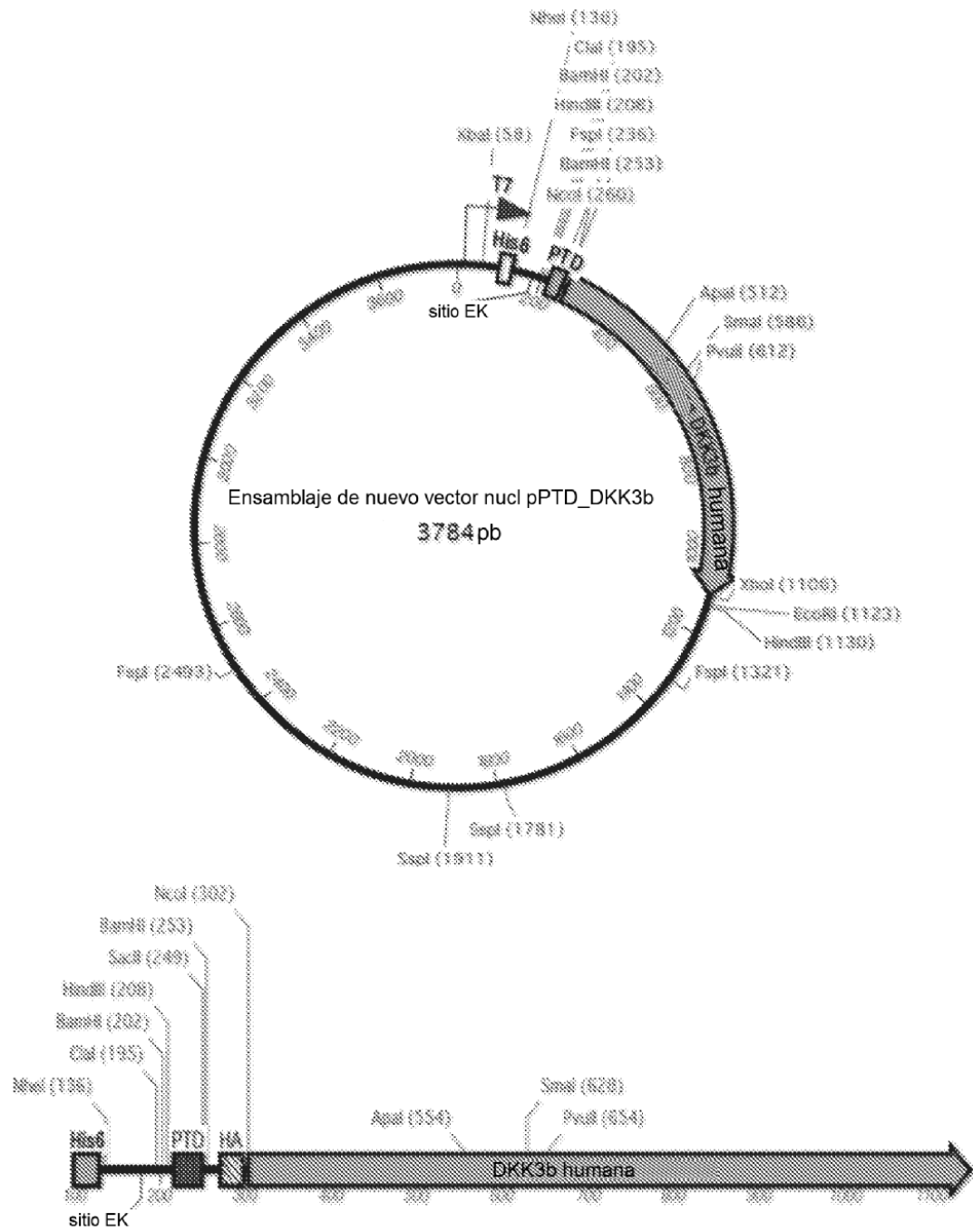


FIG. 20 Construcción de PTD optimizada

CEBADORES PARA CLONACIÓN EN FASE DE DKK3B (DE RATÓN Y SER HUMANO)

Extremo 5' del sitio NcoI de dkk3b para clonación en fase

Ratón dkk3b 5' GATCCTGA ACC ATG GAG GCG GAA GAA GCA G
Ser
humano dkk3b 5' GATCCTGA ACC ATG GAG GCA GAA GAA GCT G

Extremo 3' de sitio XhoI añadido a dkk3b para clonación

Ser
humano 5' GATCCTGACTCGAGTTACTAAATCTCTTCCCCTCCCAGCAGTG
en laboratorio

Ratón 5' GATCCTGACTCGAGTTACTAAATCTCCTCCTCTCCGCCTAG

FIG. 21

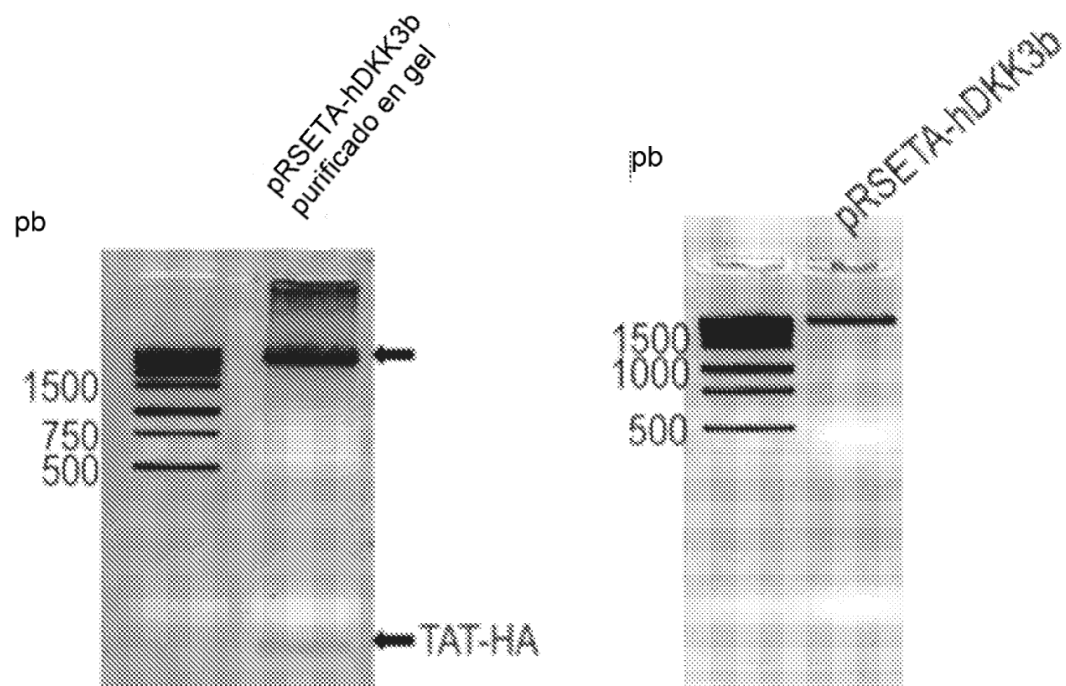


FIG. 22