



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 342 152**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02008650 .0**

96 Fecha de presentación : **17.04.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1355152**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2003**

54

Título: **Método para identificación de un compuesto para modulación de la cascada de señales Wnt.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.07.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.07.2010

73

Titular/es: **Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72

Inventor/es: **Niehrs, Christof y
Mao, Bingyu**

74

Agente: **Justo Bailey, Mario de**

ES 2 342 152 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

Método para identificación de un compuesto para modulación de la cascada de señales Wnt.

5 La presente invención se refiere a un método para identificación de un compuesto para modulación de la cascada de señales Wnt que está basado en la identificación de una pareja de fijación, activador/agonista o inhibidor/antagonista de Kremen 1 y/o Kremen 2.

10 La tumorigénesis representa un proceso complejo multietápico en el cual se cree que cambios genéticos y factores ambientales desregulan los procesos celulares que controlan la proliferación y diferenciación celular. Entre otras, la cascada de señales Wnt juega un papel crucial en lo que respecta a la regulación de la proliferación y diferenciación de las células durante la embriogénesis, como se muestra, v.g., en *Drosophila*, *Xenopus* y ratones (Nusse y Varmus, Cell 69 (1992), 1073-1087). Los genes Wnt codifican glicoproteínas secretoras que activan una cascada de señales bien caracterizada por la vía de un receptor Wnt denominado “frizzled (rizado)”. Ejemplos más notables de efectores de esta cascada de señales son beta-catenina y el gen supresor de tumores APC (Miller y Moon, Genes Dev. 10 (1996), 2527-2539). Varios estudios indican que una cascada de señales Wnt aberrante podría estar implicada en el desarrollo del cáncer de colon, el cáncer de mama y el melanoma (Pfeifer, Science, 275 (1997), 1752-1753; Polakis, Genes Dev. 14 (2000), 1837-1851). El primer gen codificante de una proteína de la cascada de señales Wnt, *int-1*, se aisló a partir del virus del tumor mamario del ratón (MMTV) y pudo demostrarse que se trata de un oncogén. Se supone que una regulación aberrante de la actividad de Wnt y/o componentes de la cascada de señales Wnt aguas abajo de la señal Wnt, v.g., beta-catenina y APC, están implicados en la tumorigénesis. En estudios recientes, pudo identificarse una nueva familia de genes, Dkk (“Dickkopf”), que actúan como inhibidores de Wnt.

25 DKK1 fija e inhibe el correceptor de Wnt LRP 5/6 (Zorn, Curr. Biol. 11 (2001), R592-595) pero por lo demás, se conoce acerca del mecanismo de modulación de la cascada de señales Wnt por Dkk.

30 WO 00/77239A describe una proteína (TANGO 202) que comprende 475 aminoácidos, siendo los primeros 473 aminoácidos idénticos a Kremen 1 sin describir función biológica alguna de esta proteína. WO 02/02603A describe una proteína (PMMM-6) que presenta cierta identidad con Kremen 2. Sin embargo, sin embargo, su función biológica no se describe.

35 De acuerdo con ello, medios para la terapia o diagnosis de enfermedades asociadas con una cascada de señales Wnt dis-regulada no estaban disponibles. Así, el uso de marcadores moleculares fiables de diagnóstico podrían ser útiles para una comprensión de la base molecular de enfermedades asociadas con una cascada de señales Wnt aberrante, v.g. tumores, v.g., para distinguir tejido benigno de tejido maligno. Adicionalmente, la señalización de Wnt está implicada en la fibrosis renal (Surendran, Am. J. Physiol Renal Physiol 282 (2002) 431-441), la enfermedad de riñón poliquístico (Saadi-Kheddoui, Oncogene 20 (2001) 5972-5981) y el receptor de Dkk LRP5 está implicado en el síndrome del trastorno autosómico recesivo osteoporosis-pseudoglioma (que afecta a los huesos y los ojos (OPPG; Gong, Cell (2001) 107, 513-523). Puede esperarse que tales marcadores sean útiles también para terapia y para el desarrollo de nuevas vías terapéuticas para el tratamiento de enfermedades dependientes de la cascada de señales Wnt, v.g. tumores o enfermedades de los riñones, huesos y ojos.

45 Así, el problema técnico que subyace en la presente invención es proporcionar un ensayo para identificar un compuesto útil para la terapia de enfermedades asociadas con una cascada aberrante.

50 La solución a dicho problema técnico se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Durante los experimentos que han conducido a la presente invención, pudieron identificarse dos genes, *Kremen 1* y *2*, cuyos productos se fijan con afinidad alta a los polipéptidos Dkk1 y Dkk2. Pudo demostrarse que esta fijación tiene importancia fisiológica dado que la cotransfección de células con *dkk1* así como *Kremen 1* y *2* da como resultado una inhibición sinérgica de la activación de la cascada de señales Wnt. Estos datos demuestran que Kremen (1 y 2) puede considerarse como un receptor para los polipéptidos Dkk y que la función biológica de *Kremen* es la mediación de la inhibición de la cascada de señales Wnt por polipéptidos Dkk. Los datos obtenidos proporcionan evidencia de que la expresión de *Kremen* es muy compleja y que los genes que codifican kremen están implicados en una diversidad de funciones biológicas y podrían tener actividad supresora de tumores. Así pues, Kremen es útil para la diagnosis y el desarrollo de terapias para enfermedades mediadas por Wnt. Puede esperarse que, v.g., la inhibición de la cascada de señales Wnt por aumento de la expresión de *kremen* y/o por estimulación de la actividad del polipéptido propiamente dicho podría tener efecto terapéutico. Por otra parte, el receptor Kremen (o el gen que codifica el mismo) puede considerarse como un fármaco diana que permite la identificación de compuestos útiles para terapia.

60 Breve descripción de los dibujos

65 Figura 1: Alineación multiseuencia de ácido nucleico de cDNAs que codifican *Kremen 1* (*kremen1*) y *2* (*kremen2*) de ratón y humanos

hkremen1 y 2 se deducen de la secuencia del genoma humano en bases de datos públicas. Los nucleótidos idénticos se hacen resaltar en negro.

ES 2 342 152 T3

Figura 2: Alineación multiseuencia de aminoácidos de proteínas Kremen 1 y 2 deducidas de cDNAs de ratón y humanos (véase Figura 1)

Los aminoácidos idénticos se hacen resaltar en negro, y los aminoácidos similares se representan en gris.

Figura 3: Kremen es un receptor de afinidad alta para Dkk1 y Dkk2

Se transfectaron células 293T con plásmidos de expresión dirigidos por el promotor del citomegalovirus (CMV) que codificaban *mkrm1* (superior) o *mkrm2* (inferior) como se indica, se incubaron con Dkk1-AP, Dkk2-AP o Dkk3-AP recombinantes, y se tiñeron respecto a actividad fijada de AP. ARRIBA: Curvas de fijación y análisis Scatchard de la fijación de proteínas de fusión DKK-AP a células *mkrm2* transfectadas. ABAJO: Curvas de fijación para la fijación de Dkk-APs a células *mkrm1* transfectadas. Se indican las constantes de disociación (K_d); a, c: Curvas de fijación; b, d, e: Análisis Scatchard.

Figura 4: Kremen y Dkk1 inhiben sinérgicamente la cascada de señales Wnt

Se transfectaron células de riñón 293 con el informador Wnt (TOP-FLASH) con o sin los genes indicados. Dos días después de la transfección, se determinó la actividad de luciferasa expresada. RLU: unidades relativas de luz (normalizadas contra luciferasa cotransfectada de *Renilla*). Xdkk1 = dkk1 de *Xenopus*; mkrm1,2 = Kremen 1,2 de ratón; wnt = Wnt1 de ratón, fz = frizzled8 de ratón; Irp6 = Irp6 humano.

Figura 5: Expresión de *kremen* en los ratones

La expresión de *kremen 1* y *kremen 2* se analizó por RT-PCR, en diversos tejidos de ratones adultos. Los resultados se normalizaron utilizando expresión constitutiva de la histona H4. Abreviaturas: -RT = muestra de control en la cual se omitió la transcriptasa inversa; sk muscle = músculo esquelético; mam. gland = glándula mamaria; H4 = Histona 4 como control de carga; mkrm1,2 = kremen 1,2 de ratón.

La presente invención se refiere a un método *in vitro* de identificación de un compuesto para modular la cascada de señales Wnt que está basado en la identificación de una pareja de fijación a un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 que comprende:

(a) poner en contacto dicho polipéptido con un compuesto a cribar; y

(b) determinar si el compuesto afecta a una actividad de dicho polipéptido o si se ha producido fijación del compuesto a dicho polipéptido.

Como se utiliza en esta memoria, el término “polipéptido Kremen 1” y “polipéptido Kremen 2” se refiere no sólo a polipéptidos codificados por la secuencia de nucleótidos que se representa en Figura 1 y/o 2 sino también a polipéptidos que difieren en secuencia de amino-ácidos debido a inserción, delección y/o sustitución de uno o más aminoácidos y que muestran al menos una actividad biológica de un receptor de Kremen 1 y/o Kremen 2, v.g. la capacidad de transducción de señales después de fijación de ligandos. Preferiblemente, los polipéptidos referidos son polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos exhibe una identidad de al menos 40%, en particular una identidad de al menos 65%, preferiblemente al menos 80% y, de modo particularmente preferido, al menos 90% con las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos codificados por las secuencias de nucleótidos que se muestran en Figura 1 ó 2.

El término “ligando”, como se utiliza en esta memoria, hace referencia a cualquier molécula que sea capaz de fijarse específicamente a Kremen 1 y/o Kremen 2, permitiendo así determinar el nivel de moléculas receptoras. Ejemplos de tales moléculas incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas o moléculas pequeñas. La molécula puede ser el ligando natural de Kremen, es decir Dkk1 o Dkk2, o puede estar estrechamente relacionada con dicho ligando, v.g. un fragmento del ligando, o un sustrato natural, un ligando, un mimético estructural o funcional; véase, v.g., Coligan, *Current Protocols in Immunology* 1 (2) (1991); capítulo 5. En cualquier caso, la molécula puede aislarse o diseñarse racionalmente utilizando técnicas conocidas; véase también abajo.

Preferiblemente, el ligando es un anticuerpo. El término “anticuerpo”, se refiere preferiblemente a anticuerpos que están constituidos esencialmente por anticuerpos monoclonales agrupados con especificidades epitópicas diferentes, así como preparaciones de anticuerpos monoclonales distintas. Los anticuerpos monoclonales se producen a partir de un antígeno que contiene fragmentos de Kremen 1 o Kremen 2 por métodos bien conocidos para los expertos en la técnica (véase, v.g., Köhler *et al.*, *Nature* 256 (1975), 495). Como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que el término “anticuerpo” (Ab) o “anticuerpo monoclonal” (Mab) incluye tanto moléculas intactas como fragmentos de anticuerpos (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂) que son capaces de fijarse específicamente a Kremen. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fe del anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos fijación de tejido inespecífica que un anticuerpo intacto. (Wahl *et al.*, *J. Nucl. Med.* 24: 316-325 (1983)). Así pues, se prefieren estos fragmentos, así como los productos de una biblioteca de expresión de FAB u otra inmunoglobulina. Además, los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, monocatenarios, y humanizados.

ES 2 342 152 T3

Para ciertos propósitos, v.g. métodos de diagnóstico, la molécula de ácido nucleico utilizada como sonda o el ligando, v.g., anticuerpo, puede marcarse detectablemente, por ejemplo, con un radioisótopo, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un quelato metálico, o una enzima.

5 Así, la presente invención se refiere a un método para identificar una pareja de fijación a un polipéptido Kremen 1 y/o 2 que comprende:

(a) poner en contacto dicho polipéptido con un compuesto a cribar; y

10 (b) determinar si el compuesto afecta a una actividad del polipéptido.

La invención incluye también un método de identificación de compuestos que se fijan a un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 que comprende los pasos de:

15 (a) incubar un compuesto de fijación candidato con dicho polipéptido; y

(b) determinar si se ha producido fijación.

20 Los polipéptidos Kremen 1 ó 2 pueden utilizarse para cribado en busca de proteínas u otros compuestos que se fijan a Kremen 1 ó 2 o en busca de proteínas u otros compuestos a los cuales se fijan Kremen 1 y 2. La fijación de Kremen 1 ó 2 y la molécula puede activar (agonista), aumentar, inhibir (antagonista), o reducir la actividad de Kremen 1 o Kremen 2 o la molécula fijada. Ejemplos de tales moléculas incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas (v.g., ligandos), o moléculas pequeñas.

25 Preferiblemente, la molécula está estrechamente relacionada con el ligando natural de Kremen 1 ó 2, v.g. un fragmento del ligando, o un sustrato natural, un ligando, un mimético estructural o funcional; véase, v.g., Coligan, *Current Protocols in Immunology* 1 (2) (1991); capítulo 5.

30 Preferiblemente, el cribado para estas moléculas implica la producción de células apropiadas que expresan Kremen 1 y/o 2, sea como una proteína secretada o en la membrana celular. Células preferidas incluyen células de mamíferos, levaduras, *Drosophila*, o *E. coli*. Las células que expresan Kremen 1 y/o 2 (o membrana celular que contiene el polipéptido expresado) se ponen en contacto luego preferiblemente con un compuesto de test que contiene potencialmente la molécula para observar la fijación, estimulación, o inhibición de la actividad de Kremen 1 y/o 2.

35 El ensayo puede testar simplemente la fijación de un compuesto candidato a Kremen 1 y/o 2, en donde la fijación es detectada por un marcador, o en un ensayo que implica competición con un competidor marcado. Adicionalmente, el ensayo puede testar si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por fijación a Kremen 1 y/o Kremen 2. Ensayos adecuados para analizar la actividad de Kremen 1 y/o 2 incluyen ensayos informadores de luciferasa inducibles por Wnt en células HEK 293 transfectadas, donde *dkk1* produce sinergia con Kremen 1 y/o 2 para inhibir una señal inducida por Wnt1, tal como se muestra en la Figura 4.

40 Alternativamente, el ensayo puede llevarse a cabo utilizando preparaciones exentas de células, polipéptido/molécula fijado a un soporte sólido, bibliotecas de productos químicos, o mezclas de productos naturales. El ensayo puede comprender también simplemente los pasos de mezclar un compuesto candidato con una solución que contiene Kremen 1 y/o Kremen 2, medir la actividad o fijación Kremen/molécula, y comparar la actividad o fijación Kremen/molécula con un estándar.

45 Preferiblemente, un ensayo ELISA puede medir el nivel de actividad de Kremen 1 y/o Kremen 2 en una muestra (v.g., muestra biológica) utilizando un anticuerpo monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede medir el nivel o la actividad de Kremen 1 y/o Kremen 2 por fijación, directa o indirecta, a Kremen 1 y/o Kremen 2 o por competición con Kremen 1 y/o Kremen 2 por un sustrato. La totalidad de estos ensayos anteriores pueden utilizarse como marcadores de diagnóstico o pronóstico. Las moléculas descubiertas utilizando estos ensayos pueden utilizarse para tratar enfermedades o para producir un resultado particular en un paciente (v.g., la eliminación de un tumor, soporte de procesos regenerativos, etc.) por modulación, preferiblemente activación de la molécula Kremen 1 y/o Kremen 2. Además, los ensayos pueden descubrir agentes que pueden inhibir o intensificar la producción de Kremen 1 y/o Kremen 2 por células o tejidos manipulados convenientemente.

Además, la invención incluye un método de identificación de activadores/agonistas o inhibidores/antagonistas de un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2, que comprende los pasos de:

60 (a) incubar un compuesto candidato con dicho polipéptido;

(b) ensayar una actividad biológica, y

65 (c) determinar si se ha alterado una actividad biológica de dicho polipéptido.

Ensayos adecuados incluyen análisis de la formación de un complejo ternario entre Kremen 1 o Kremen 2 con la proteína *Dkk1* recombinante y el dominio recombinante extracelular de LRP6.

ES 2 342 152 T3

Se describe adicionalmente un método de identificación y obtención de un fármaco candidato para terapia de enfermedades asociadas con (a) expresión aberrante de *Kremen 1* y/o *Kremen 2* y/o (b) actividades o cantidades aberrantes de un polipéptido *Kremen 1* y/o *Kremen 2*, que comprende los pasos de:

- 5 (a) poner en contacto un polipéptido *Kremen 1* y/o *Kremen 2* o una célula que expresa dicho polipéptido, y opcionalmente el o los ligandos correspondientes, en presencia de componentes capaces de proporcionar una señal detectable en respuesta a la fijación a dicho fármaco candidato a cribar; y
- 10 (b) detectar la presencia o ausencia de una señal o el aumento de la señal generada, en donde la presencia o aumento de la señal es indicativa de un fármaco supuesto.

15 Ensayos adecuados para analizar la actividad de *Kremen 1* y/o *2* incluyen ensayos informadores de luciferasa inducible por Wnt en células HEK 293 transfectadas, donde *dkk1* produce sinergia con *kremen 1* y/o *2* para inhibir una señal inducida por Wnt1, tal como se muestra en la Figura 4.

El compuesto candidato puede ser un compuesto simple o una pluralidad de compuestos. El término “pluralidad de compuestos” en un método de la invención debe entenderse como una pluralidad de sustancias que pueden ser o no idénticas.

20 Dicho compuesto o pluralidad de compuestos puede(n) sintetizarse químicamente o producirse microbiológicamente y/o pueden estar comprendidos, por ejemplo, en muestras, v.g., extractos de células de, v.g., plantas, animales o microorganismos. Adicionalmente, dicho o dichos compuestos pueden ser conocidos en la técnica, pero de los cuales no se conoce hasta ahora que sean capaces de suprimir o activar los polipéptidos *Kremen 1* y/o *Kremen 2*. La mezcla de reacción puede ser un extracto exento de células o puede comprender un cultivo de células o de tejido. Montajes
25 adecuados para el método de la invención son conocidos por las personas expertas en la técnica y se describen, por ejemplo, en líneas generales en Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, 3ª edición (1994) y en los ejemplos incluidos como apéndice. La pluralidad de compuestos puede añadirse, v.g. a la mezcla de reacción, al medio de cultivo, inyectarse en una célula o aplicarse de cualquier otro modo a un animal transgénico. La célula o tejido que puede emplearse en el método de la invención es preferiblemente una célula hospedadora, célula de mamífero o animal
30 transgénico no humano.

Si una muestra que contiene un compuesto o una pluralidad de compuestos se identifica en el método de la invención, entonces es posible o bien aislar el compuesto de la muestra original identificada por contener el compuesto capaz de suprimir o activar un polipéptido *Kremen 1* y/o *Kremen 2*, o subdividir ulteriormente la muestra original,
35 por ejemplo, si la misma está constituida por una pluralidad de compuestos diferentes, a fin de reducir el número de sustancias diferentes por muestra y repetir el método con las subdivisiones de la muestra original. Dependiendo de la complejidad de las muestras, los pasos arriba descritos pueden realizarse varias veces, preferiblemente hasta que la muestra identificada de acuerdo con el método de la invención comprende exclusivamente un número limitado de sustancias o solamente una sustancia. Preferiblemente, dicha muestra comprende sustancias de propiedades químicas
40 y/o físicas similares, y muy preferiblemente dichas sustancias son idénticas.

Se conocen varios métodos por las personas expertas en la técnica para producir y cribar grandes bibliotecas a fin de identificar compuestos que tengan afinidad específica para una diana. Estos métodos incluyen el método de presentación de fago en el cual péptidos aleatorizados son presentados por un fago y cribados mediante cromatografía
45 de afinidad a un receptor inmovilizado; véase, v.g., WO 91/17271, WO 92/01047, US-A-5.223.409. En otro enfoque, bibliotecas combinatorias de polímeros inmovilizados en un chip se sintetizan utilizando fotolitografía; véase, v.g., US-A-5.143.854, WO 90/15070 y WO 92/10092. Los polímeros inmovilizados se ponen en contacto con un receptor marcado y se escanean respecto al marcador para identificar polímeros que se fijan al receptor. La síntesis y el cribado de bibliotecas de péptidos sobre soportes continuos de membranas de celulosa que pueden utilizarse para identificación
50 de ligandos de fijación de los polipéptidos *Kremen 1* y/o *2*, por tanto, posibles inhibidores y activadores se describe, por ejemplo, en Kramer, *Methods Mol. Biol.* 87 (1998), 25-39. Este método puede utilizarse también, por ejemplo, para determinación de los sitios de fijación y los motivos de reconocimiento en el polipéptido *Kremen 1* y/o *2*. De modo análogo, se determinó la especificidad de sustrato de la chaperona DnaK y los sitios de contacto entre la interleuquina-6 humana y su receptor; véase Rudiger, *EMBO J.* 16 (1997), 1501-1507 y Weiergraber, *FEBS Lett.* 379 (1996), 122-
55 126, respectivamente. Adicionalmente, los métodos arriba mencionados pueden utilizarse para la construcción de supertopes de fijación derivados del polipéptido *Kremen 1* o *Kremen 2*. Un enfoque similar fue descrito con éxito para antígenos peptídicos del anticuerpo monoclonal anti-p24 (HIV-1); véase Kramer, *Cell* 91 (1997), 799-809. Una ruta general para análisis de la huella dactilar de interacciones péptido-anticuerpo utilizando la biblioteca de péptidos de aminoácidos arracimados se describió en Kramer, *Mol. Immunol.* 32 (1995), 459-465. Adicionalmente, antagonistas
60 de un polipéptido *Kremen 1* y/o *Kremen 2* pueden derivarse e identificarse a partir de anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con un polipéptido *Kremen 1* y/o *Kremen 2* de acuerdo con los métodos descritos en Doring, *Mol. Immunol.* 31 (1994), 1059-1067.

Todos estos métodos pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención para identificar activadores/agonistas e inhibidores/antagonistas de un polipéptido *Kremen 1* y/o *Kremen 2*.

Diversas fuentes para la estructura básica de un activador o inhibidor de este tipo pueden emplearse y comprenden, por ejemplo, análogos miméticos de un polipéptido *Kremen 1* y/o *Kremen 2*. Análogos miméticos de un polipéptido

Kremen 1 y/o Kremen 2 o fragmentos biológicamente activos del mismo pueden generarse mediante, por ejemplo, sustitución de los aminoácidos que se espera sean esenciales para la actividad biológica con, v.g., estereoisómeros, es decir D-aminoácidos; véase, v.g., Tsukida, J. Med. Chem. 40 (1997), 3534-3541. Adicionalmente, en el caso de que se utilicen fragmentos para el diseño de análogos biológicamente activos, pueden incorporarse componentes pro-miméticos en un péptido para restablecer al menos algunas de las propiedades estructurales que pueden haberse perdido durante la eliminación de parte del polipéptido original; véase, v.g., Nachman, Regul. Pept. 57 (1995), 359-370. Adicionalmente, puede utilizarse un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 para identificar miméticos sintéticos de péptidos químicos que se fijan a o pueden funcionar como un ligando, sustrato o pareja de fijación de dicho o dichos polipéptidos tan eficazmente como lo hace el polipéptido natural; véase, v.g., Engleman, J. Clin. Invest. 99 (1997), 2284-2292. Por ejemplo, pueden realizarse simulaciones de plegado y re diseño por computadora de motivos estructurales de un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 utilizando programas de computadora apropiados (Olszewski, Proteins 25 (1996), 286-299; Hoffman, Comput. Appl. Biosci. 11 (1995), 675-679). La modelización por computadora del plegado de las proteínas puede utilizarse para el análisis estructural y energético de modelos detallados de péptidos y proteínas (Monge, J. Mol. Biol. 247 (1995), 995-1012; Renouf, Adv. Exp. Med. Biol. 376 (1995), 37-45). En particular, pueden utilizarse los programas apropiados para la identificación de sitios interactivos de un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 y su ligando u otras proteínas interactivas por búsquedas asistidas por computadora para secuencias peptídicas complementarias (Fassina, Immunomethods 5 (1994), 114-120). Sistemas de computadora apropiados adicionales para el diseño de proteínas y péptidos se describen en la técnica anterior, por ejemplo en Beny, Biochem. Soc. Trans. 22 (1994), 1033-1036; Wodak, Ann. N. Y. Acad. Sci. 501 (1987), 1-13; Pabo, Biochemistry 25 (1986), 5987-5991. Los resultados obtenidos a partir de los análisis por computadora arriba descritos pueden utilizarse para, v.g., la preparación de miméticos peptídicos de un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 o fragmentos de los mismos. Tales análogos pseudo-peptídicos de la secuencia de aminoácidos natural de la proteína pueden mimetizar muy eficazmente la proteína parental (Benkirane, J. Biol. Chem. 271 (1996), 33218-33224). Por ejemplo, la incorporación de residuos de ω -aminoácidos aquirales fácilmente disponibles en un polipéptido Kremen 1 ó 2 o un fragmento del mismo da como resultado la sustitución de enlaces amídicos por unidades polimetileno de una cadena alifática, proporcionando con ello una estrategia conveniente para construir un mimético peptídico (Banerjee, Biopolymers 39 (1996), 769-777). Análogos peptidomiméticos superactivos de hormonas peptídicas pequeñas en otros sistemas se describen en la técnica anterior (Zhang, Biochem. Biophys. Res. Commun. 224 (1996), 327-331). Miméticos peptídicos apropiados de un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 pueden identificarse también por la síntesis de bibliotecas peptídicas miméticas combinatorias por alquilación sucesiva de amidas y testado de los compuestos resultantes, v.g., respecto a sus propiedades de fijación e inmunológicas. Métodos para la generación y uso de bibliotecas peptidomiméticas combinatorias se describen en la técnica anterior, por ejemplo en Ostresh, Methods in Enzymology 267 (1996), 220-234 y Domer, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 709-715. Adicionalmente, puede utilizarse una estructura tridimensional y/o cristalográfica de un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 para el diseño de inhibidores miméticos peptídicos de la actividad biológica del polipéptido (Rose, Biochemistry 35 (1996), 12933-12944; Rutenber, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 1545-1558).

Es también bien conocido por las personas expertas en la técnica que es posible diseñar, sintetizar y evaluar miméticos de pequeños compuestos orgánicos que, por ejemplo, pueden actuar como un sustrato o ligando para un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2. Por ejemplo, se ha descrito que miméticos de D-glucosa de hapalosina exhibían eficiencia similar a la de hapalosina en el antagonismo de proteínas asociadas de asistencia a la resistencia a multifármacos en citotoxicidad (sic); véase Dinh, J. Med. Chem. 41 (1998), 981-987.

La molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 puede servir también como diana para activadores e inhibidores. Los activadores pueden comprender, por ejemplo, proteínas que se fijan al mRNA de un gen codificante de un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2, estabilizando con ello la conformación nativa del mRNA y facilitando la transcripción y/o traducción, v.g., de manera análoga al modo en que la proteína Tat actúa sobre el RNA de HIV. Adicionalmente, se describen en la bibliografía métodos para identificación de moléculas de ácido nucleico tales como un fragmento de RNA que mimetiza la estructura de una molécula diana de RNA definida o no definida a la cual se fija un compuesto en el interior de una célula dando como resultado retardo del crecimiento celular o muerte celular; véase, v.g., WO 98/18947 y las referencias citadas en dicho lugar. Estas moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse para identificación de compuestos desconocidos de interés farmacéutico, y para identificación de dianas de RNA desconocidas para uso en el tratamiento de una enfermedad. Estos métodos y composiciones pueden utilizarse en el cribado para nuevos compuestos o para identificación de compuestos útiles para alterar los niveles de expresión de los polipéptidos codificados por una molécula de ácido nucleico. Alternativamente, por ejemplo, la estructura conformacional del fragmento de RNA que mimetiza el sitio de fijación puede emplearse en diseño racional de fármacos para modificar fármacos conocidos a fin de hacer que los mismos se fijen con mayor avidéz a la diana. Una metodología de este tipo es la resonancia magnética nuclear (NMR), que es útil para identificar fármacos y estructuras de conformación del RNA. Otros métodos adicionales son, por ejemplo, los métodos de diseño de fármacos que se describen en WO 95/35367, US-A-5.322.933, donde la estructura cristalina del fragmento de RNA puede deducirse y se utilizan programas de computadora para diseñar nuevos compuestos de fijación.

Los compuestos que pueden testarse e identificarse de acuerdo con un método de la invención pueden ser bibliotecas de expresión, v.g., bibliotecas de expresión de cDNA, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, compuestos orgánicos pequeños, hormonas, peptidomiméticos, PNAS o análogos (Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell 83 (1995), 237-245; Gibbs, Cell 79 (1994), 193-198 y las referencias arriba citadas). Adicionalmente, los genes que codifican un regulador supuesto de un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 y/o que ejercen sus defectos aguas arriba o aguas abajo de un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 pueden identificarse utilizando, por

ejemplo, mutagénesis de inserción que emplea, por ejemplo, vectores de direccionamiento de genes conocidos en la técnica. Dichos compuestos pueden ser también derivados funcionales o análogos de inhibidores o activadores conocidos. Tales compuestos útiles pueden ser por ejemplo factores de transacción que se fijan a un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 o secuencias reguladoras del gen que codifica el mismo. La identificación de factores de transacción puede llevarse a cabo utilizando métodos estándar en la técnica (véase, v.g., Sambrook, *supra*). Para determinar si una proteína se fija a la proteína propiamente dicha o secuencias reguladoras, pueden realizarse análisis estándar de desplazamiento del gel nativo. Con objeto de identificar un factor de transacción que se fija a la proteína o secuencia reguladora, puede utilizarse la proteína o secuencia reguladora como reactivo de afinidad en métodos estándar de fijación de proteínas, o como sonda para cribado de una biblioteca de expresión. La identificación de moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos que interaccionan con un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 arriba descrito puede conseguirse también, por ejemplo, como se describe en Scofield (Science 274 (1996), 2063-2065) por el uso del denominado sistema de levadura de “dos híbridos”. En este sistema, el polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 o una pequeña parte del mismo se enlaza al dominio de fijación de DNA del factor de transcripción GAL4. Una cepa de levadura que expresa este polipéptido de fusión y que comprende un gen informador lacZ dirigido por un promotor apropiado, que es reconocido por el factor de transcripción GAL4, se transforma con una biblioteca de cDNAs que expresan proteínas de plantas o péptidos de las mismas fusionados a un dominio de activación. Así, si un péptido codificado por uno de los cDNAs es capaz de interaccionar con el péptido de fusión que comprende un péptido de un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2, el complejo es capaz de dirigir la expresión del gen informador. De este modo, las moléculas de ácido nucleico que codifican Kremen 1 y Kremen 2, respectivamente, y el péptido codificado pueden utilizarse para identificar péptidos y proteínas que interaccionan con un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2.

Una vez que se ha identificado el factor de transacción, la modulación de su fijación a o regulación de la expresión de un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 puede continuarse, comenzando por ejemplo con el cribado para inhibidores contra la fijación del factor de transacción a un polipéptido Kremen 1 o Kremen 2. La activación o represión de un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 podría conseguirse entonces en animales por aplicación del factor de transacción (o su inhibidor) o el gen que codifica el mismo, v.g. en un vector de expresión. Adicionalmente, si la forma activa del factor de transacción es un dímero, podrían producirse mutantes dominantes negativos del factor de transacción a fin de inhibir su actividad. Ulteriormente, después de la identificación del factor de transacción, pueden identificarse luego componentes adicionales en la cascada de señales que conduce a la activación (v.g. transducción de señales) o represión de un gen implicado en el control de un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2. La modulación de las actividades de estos componentes puede continuarse, a fin de desarrollar fármacos y métodos adicionales para modular el metabolismo de degradación de las proteínas en los animales. Así, la presente invención se refiere también al uso del sistema de dos híbridos como se define arriba para la identificación de activadores o inhibidores de un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2.

Los compuestos aislados por los métodos anteriores sirven también como compuestos líder para desarrollo de compuestos análogos. Los análogos deben tener una configuración electrónica y conformación molecular estabilizada que permita que grupos funcionales clave sean presentados a un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 o su ligando sustancialmente del mismo modo que el compuesto líder. En particular, los compuestos análogos tienen propiedades electrónicas espaciales que son comparables a la región de fijación, pero pueden ser moléculas más pequeñas que el compuesto líder, que tienen frecuentemente un peso molecular inferior a aproximadamente 2 kD y preferiblemente inferior a aproximadamente 1 kD. La identificación de compuestos análogos puede realizarse mediante el uso de técnicas tales como análisis de campo autoconsistente (SCF), análisis de interacción de configuración (CI), y análisis de dinámica de modo normal. Programas de computadora para la implementación de estas técnicas están disponibles; v.g., Rein, Computer-Assisted Modeling of Receptor-Ligand Interactions (Alan Liss, Nueva York, 1989). Métodos para la preparación de derivados químicos y análogos son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Beilstein, Handbook of Organic Chemistry, Springer edition, Nueva York Inc., 175 Fifth Avenue, Nueva York, N.Y. 10010 EEUU, y Organic Synthesis, Wiley, Nueva York, EEUU. Adicionalmente, dichos derivados y análogos pueden testarse respecto a sus efectos de acuerdo con métodos conocidos en la técnica; véase también arriba. Adicionalmente, peptidomiméticos y/o el diseño ayudado por computadora de derivados apropiados y análogos pueden utilizarse, por ejemplo de acuerdo con los métodos arriba descritos.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

Ejemplo 1

Aislamiento de cDNAs que codifican Kremen 1 y 2, respectivamente

Se utilizó una biblioteca de cDNA de embrión de ratón de 13,5 días en el vector de expresión pCMV-SPORT2 (Gibco BRL) para preparar agrupaciones de aproximadamente 250 colonias, y el DNA plasmídico de cada agrupación se transfirió transitoriamente en células 293T en placas de 24 pocillos utilizando FuGENE6 (Roche). Después de 48 horas, se incubaron las células con medio que contenía proteína de fusión Dkk1-fosfatasa alcalina 1 nM (Dkk1-AP) (Mao *et al.*, Nature 411 (2001) 321-325) y se procesaron respecto a histoquímica de AP. A partir de 1500 agrupaciones, se identificaron dos agrupaciones positivas y se aislaron clones simples por selección de parientes. El análisis de secuenciación demostró que aquéllos representan aislados independientes de *mkrem2*. Se aisló un clon de ratón de longitud total *Kremen1* de la misma biblioteca por PCR utilizando datos publicados de secuencias de nucleótidos (Nakamura *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1518 (2001), 63-72). El marco de lectura abierto de *mkremen1* y -2 se

ES 2 342 152 T3

clonó en pCS2+ para generar pCS2-mkremen 1 y -2. Se construyó pCS-flag-mkrm2 por inserción de un epítipo flag (“bandera”) después del péptido señal y se utilizó como molde para generar el pCS-flag-mkrm2 Δ WSC por PCR.

5 Ejemplo 2

La fijación de Kremen 1 y 2 a Dkk1 y Dkk2 muestra afinidad alta y es fisiológicamente relevante

10 Para los ensayos de fijación, se transfectaron (T) células 293T con *mkrm1* o *mkrm2* como se ha indicado, se incubaron con la proteína de fusión recombinante Dkk1-fosfatasa alcalina (Dkk1-AP) o fosfatasa alcalina (AP) y se tiñeron para actividad fijada de AP. Los resultados se muestran en la Figura 3.

15 Como se muestra en la Figura 4, los ensayos informadores de Wnt de luciferasa en células 293T se realizan en placas de 96 pocillos al menos por triplicado como se ha descrito (Wu *et al.*, *Curr Biol* 10 (2000), 1611-1614). La actividad de luciferasa se normalizó contra la actividad de Renilla utilizando un kit comercial (Clontech). Xdkk1= *Xenopus dkk1* (Glinka, *et al.* *Nature* 391, (1998) 357-362); *mkrm1,2*= kremen 1,2 de ratón; *wnt*= *wnt1* de ratón; *fz*= *frizzled8* de ratón; *Irp6*= *Irp6* humano (Tamai, *et al.*, *Nature* 407 (2000) 530535); informada de luciferasa Wnt TOP-FLASH (Korinek *et al.* *Science* 275 (1997) 1784-1787).

20 Como se muestra en la Figura 3, la fijación de la proteína de fusión Dkk-fosfatasa alcalina a Kremen 2 y/o Kremen 1, respectivamente, muestra afinidad alta. Adicionalmente, pudo demostrarse que únicamente Dkk1 y Dkk2 se fijan a Kremen, pero no Dkk3.

25 En un experimento adicional, se transfectaron células 293 de riñón con el informador Wnt (TOP-FLASH) con o sin los genes indicados. Dos días después de la transfección, se determinó la actividad de luciferasa expresada. Como se muestra en la figura 4, la cotransfección de Wnt y su receptor, *frizzled* (*fz*) da como resultado la estimulación de la cascada de señales Wnt (véase Figura 4, pista 1 frente a pista 2) y la cotransfección de *dkk1* y *Kremen 1* y *Kremen 2* conduce a una inhibición sinérgica de esta activación de la cascada de señales Wnt. Este efecto es aún más acusado si se ha cotransfectado Wnt con su receptor *frizzled* (*fz*) y el correceptor *Irp6*. Puede observarse una activación muy fuerte de la cascada de señales Wnt (pista 8). Esta activación puede ser inhibida únicamente por cotransfección con *dkk1* y *Kremen 1,2* (pistas 12 y 13) pero no por transfección con los genes simples (*dkk1*, pista 9; *Kremen 2*, pista 10; *Kremen 1*, pista 11).

35 Ejemplo 3

Determinación del perfil de expresión de kremen 1 y 2 en diversos tejidos de ratón

40 La expresión de *Kremen 1* y *2* en diversos tejidos de ratones se estudió por RT-PCR. El aislamiento del RNA de órganos de ratón adulto y los ensayos RT-PCR se llevaron a cabo en la fase lineal de amplificación y con iniciadores de histona 4 como se ha descrito (Glinka *et al.*, *Nature* 389 (1997), 517-519). Otros iniciadores fueron: *mkrm1* (f, GTGCTTCACAGCCAACGGTGCA; r, CGTAGCACCAAGGGCTCACGT); *mkrm2* (f, AGGGAAACTGGTCGGC TC; r, AAGGCACGGAGTAGGTTGC). Los núms. de ciclos eran *H4*: 26 ciclos; *mkrm1*: 35 ciclos; *mkrm2*: 32 ciclos. Los resultados demuestran que ambos kremens se expresan en todos los tejidos de ratón testados, pero con nivel de expresión variable (Figura 5). Se obtuvieron resultados similares utilizando embriones de *Xenopus*.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método *in vitro* de identificación de un compuesto para modular la cascada de señales Wnt que está basado en la identificación de una pareja de fijación a un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2 que comprende:

- 10 (a) poner en contacto dicho polipéptido con un compuesto a cribar; y
(b) determinar si el compuesto afecta a una actividad de dicho polipéptido o si se ha producido fijación del compuesto a dicho polipéptido.

15 2. Un método *in vitro* para identificar un compuesto para modular la cascada de señales Wnt como un activador/agonista o inhibidor/antagonista de un polipéptido Kremen 1 y/o Kremen 2, que comprende los pasos de:

- 20 (a) incubar un compuesto candidato con dicho polipéptido;
(b) ensayar una actividad biológica, y
(c) determinar si se ha alterado una actividad biológica de dicho polipéptido.

25 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el compuesto candidato o el compuesto a cribar es un anticuerpo que reconoce Kremen 1 y/o Kremen 2.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el cual el compuesto candidato o compuesto a cribar es una molécula pequeña.

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el cual el compuesto candidato o compuesto a cribar es un ácido nucleico.

30 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el cribado implica células que expresan Kremen 1 y/o Kremen 2.

35 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el ensayo se lleva a cabo utilizando preparaciones exentas de células.

40

45

50

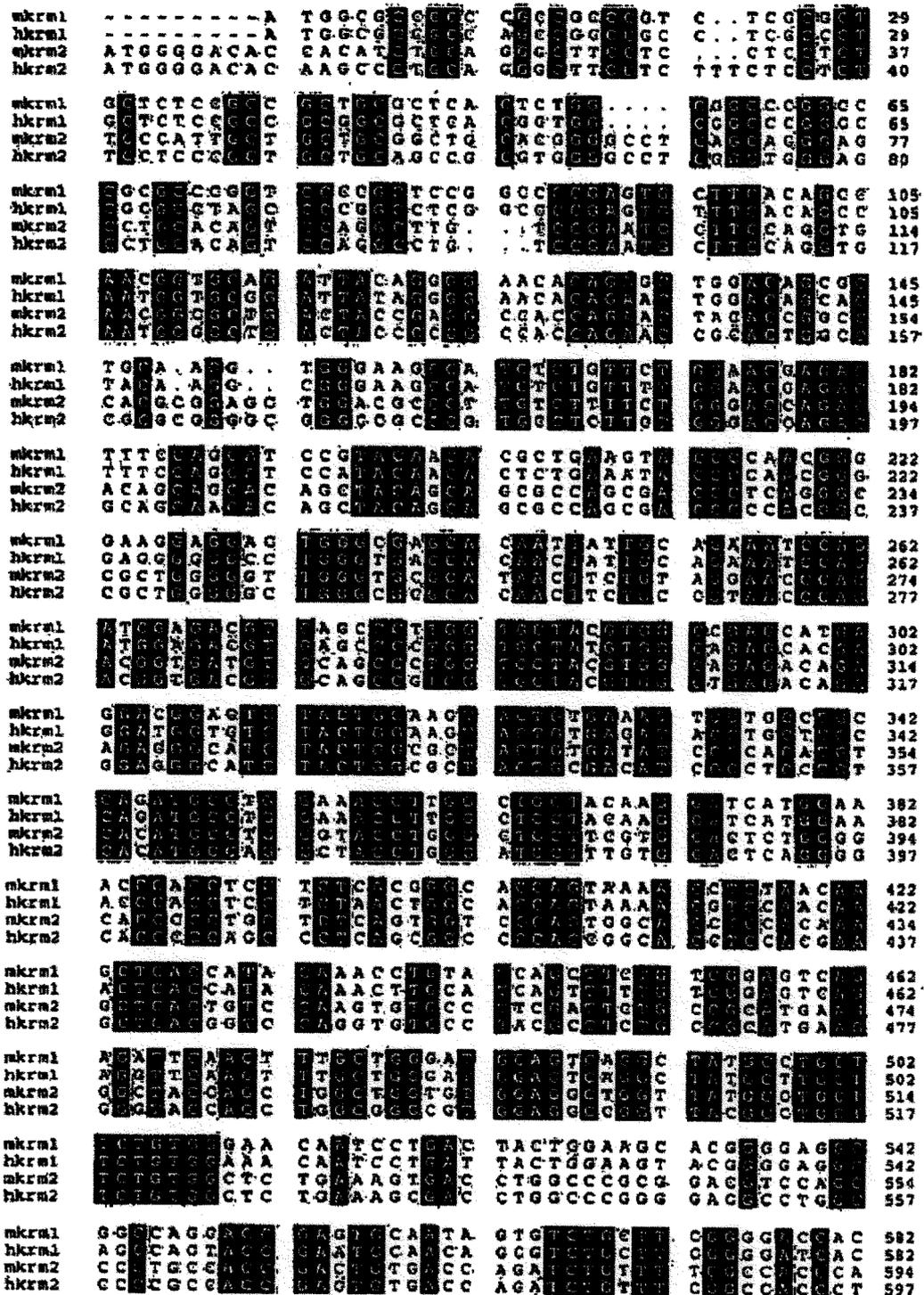
55

60

65

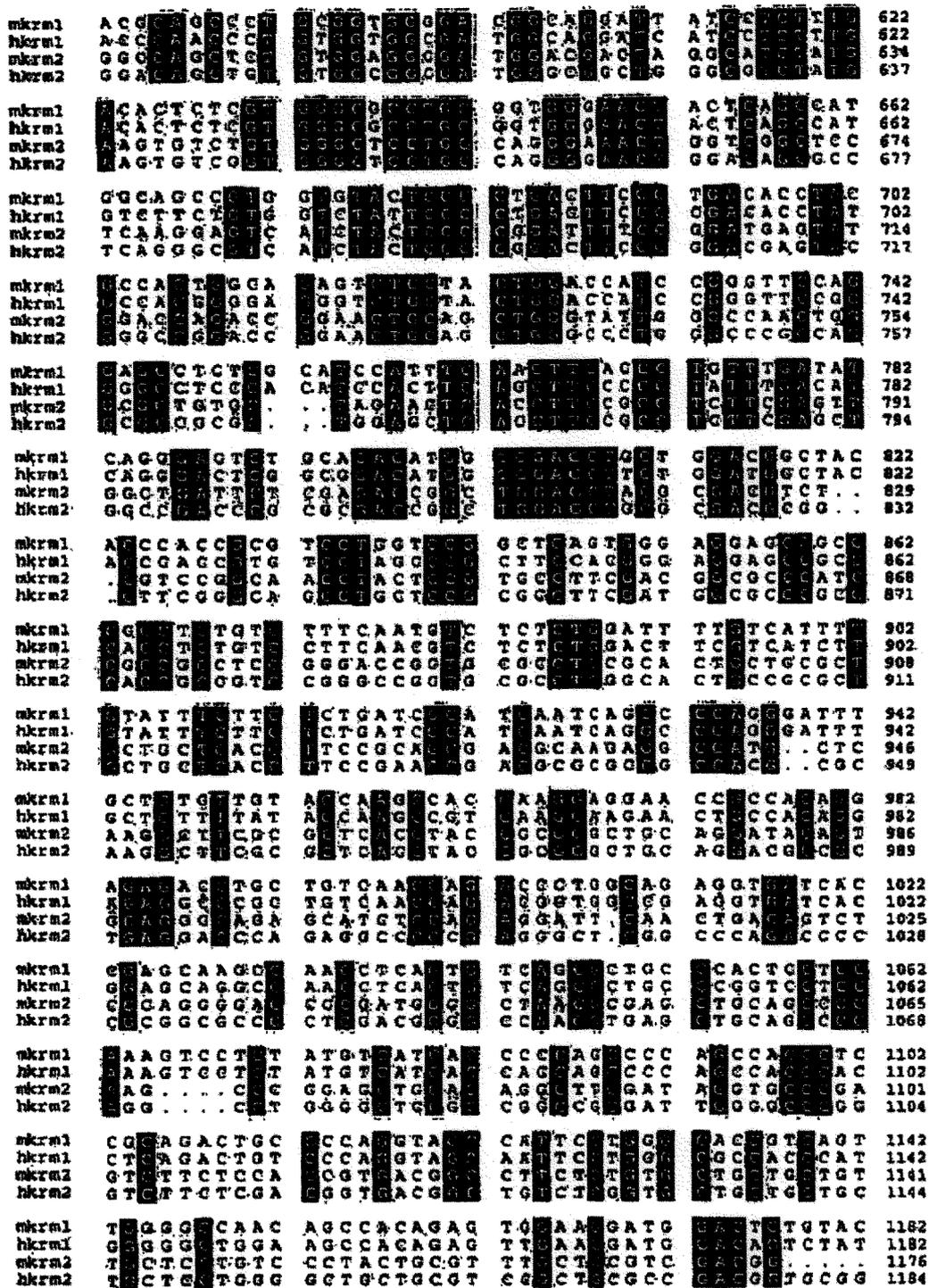
70

ES 2 342 152 T3



Alineación múltiple de DNAs kremen de ratón y humanos (3-1)

Fig. 1 a



Alineación múltiple de DNAs kremen de ratón y humanos (3-2)

Fig. 1 b

```

mkrn1  GGCCCTGGCGGA  CCCTCCCTGCAI  CCTCACAGTTC  ACAGCCAGT  1222
hkrn1  GGTCTTGGCCAA  CTCTCTCTGAT  CCTCACAGTTC  ACAGCCAT  1222
mkrn2  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  1181
hkrn2  GGCGCTGGGG  CAGGGECTGA  GGCGGA . CC  GGTTGGG  1223

mkrn1  GGGAAAA  TCTCTGCT  TCAGATTTA  AACCTCAT  1262
hkrn1  AGCAAA  TCTCTGCT  TCAGATTTC  AACCCCAT  1262
mkrn2  CTGCTG  CAGGAAA  TCCTCTCTGG  CAGGGGAC  1221
hkrn2  CTGCTG  CAGGAAA  GCCCCCGG  GCGGGGG  1263

mkrn1  AGTCCCT  TCTCTGCT  TCTCTGCT  TCTCTGCT  1302
hkrn1  TCTCTCT  TCTCTGCT  TCTCTGCT  TCTCTGCT  1302
mkrn2  TCCAGGG  CAGGAAA  CAGGAAA  CAGGAAA  1361
hkrn2  TCCAGGG  CAGGAAA  CAGGAAA  CAGGAAA  1303

mkrn1  GGGGTTCT  AGGTATC  GACGATTTTC  TATGAAG  1342
hkrn1  GGGGTTCT  AGGAAATC  GAGCATTTTT  TACAAGC  1342
mkrn2  GGGGTTCT  AGGTGCTC  GCTCTGCTCC  CAGGGGA  1301
hkrn2  AGGGTTCT  AGGTGCTC  GCTCTGCTCC  CCGGGGA  1343

mkrn1  C . . . . .  ATCTCATCT  TTAAGA  GAA  GTCAA  1380
hkrn1  C . . . . .  ATTTT  CATCT  TTAAGA  GAA  ATCAA  1380
mkrn2  TTAGGTTGAG  GGTCTTCTG  CCGGCT  CCG  TCCCT  1341
hkrn2  CTAGGTTGAG  GGTCTTCTG  CCGGCT  CCG  GCTCT  1383

mkrn1  CAGAGTCAA  AGATGA  CAATC  GGAGT  1420
hkrn1  CAGAGTCAA  AGATGA  CAATC  GGAGT  1420
mkrn2  GCCTCCAGG  AGAGCTCTT  SCGCT  G  GCTCT  1361
hkrn2  GCCTCCAGG  AGAGCTCTT  GGGCT  G  ACTTC  1423

mkrn1  GA - - -  1422
hkrn1  AA - - -  1422
mkrn2  TCTGA  1366
hkrn2  TCTGA  1428

```

Alineación múltiple de DNAs kremen de ratón y humanos (3-3)

Fig. 1 c

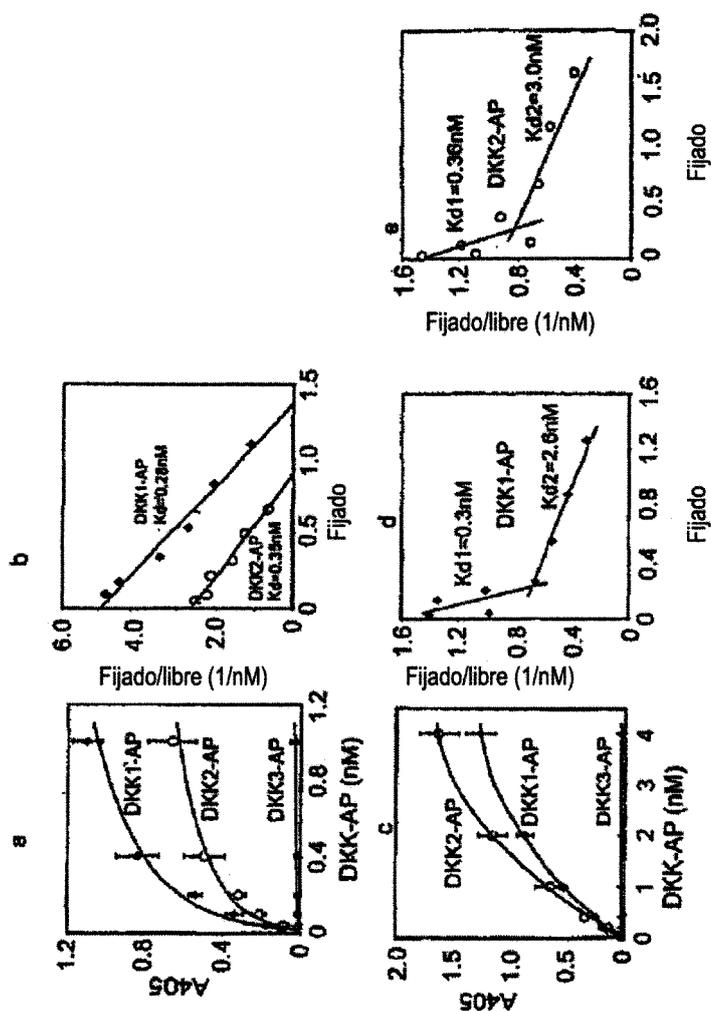


Fig. 3

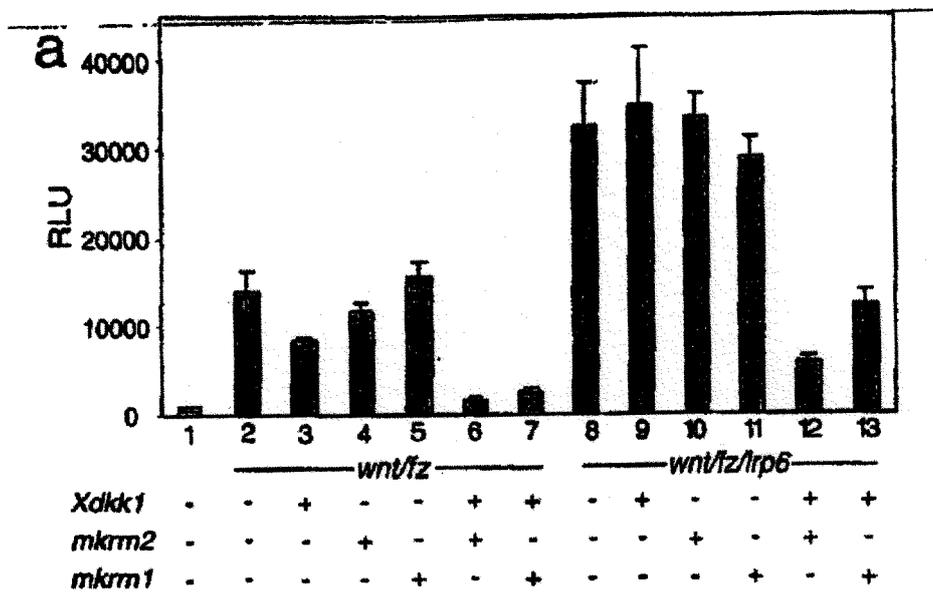


Fig. 4

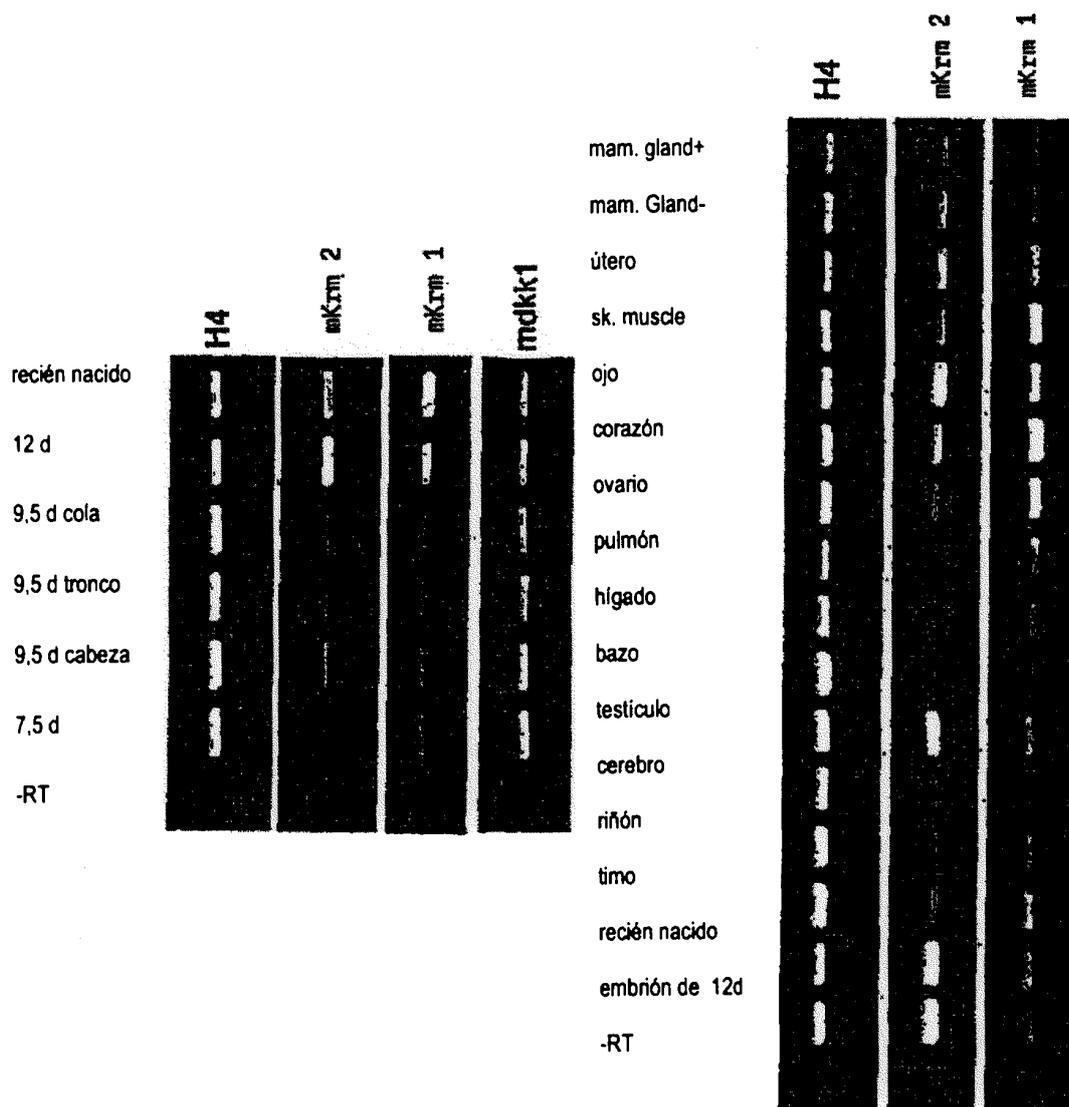


Fig. 5