



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 310 434**

⑫ Número de solicitud: 200600119

⑤① Int. Cl.:
C07K 14/45 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **19.01.2006**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.01.2009**

⑫④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.01.2009

⑦① Solicitante/s:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad Miguel Hernández**

⑦② Inventor/es: **Nieto Toledano, María Ángela;
Boutet, Agnès y
Álvarez de Frutos, Cristina**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Un procedimiento de identificación de un proceso de fibrosis renal, procedimiento de identificación de compuestos inhibidores, uso de los compuestos inhibidores de la expresión del gen del factor de transcripción Snail en la elaboración de composiciones farmacéuticas, dichas composiciones farmacéuticas y sus aplicaciones en la fibrosis renal.**

⑤⑦ Resumen:

Un procedimiento de identificación de un proceso de fibrosis renal, procedimiento de identificación de compuestos inhibidores, uso de los compuestos inhibidores de la expresión del gen del factor de transcripción Snail en la elaboración de composiciones farmacéuticas, dichas composiciones farmacéuticas y sus aplicaciones en la fibrosis renal.

Snail es una proteína directamente implicada en la etiopatogenia de la fibrosis renal, además de un marcador de esta enfermedad. Por lo tanto, puede utilizarse su identificación como diagnóstico de fibrosis renal; y por otro lado, la proteína Snail puede ser de gran utilidad en la identificación de nuevos fármacos para el tratamiento de la fibrosis renal, y su inhibición génica como una forma de tratamiento.

ES 2 310 434 A1

DESCRIPCIÓN

Un procedimiento de identificación de un proceso de fibrosis renal, procedimiento de identificación de compuestos inhibidores, uso de los compuestos inhibidores de la expresión del gen del factor de transcripción Snail en la elaboración de composiciones farmacéuticas, dichas composiciones farmacéuticas y sus aplicaciones en la fibrosis renal.

Sector de la técnica

La presente invención se enmarca en el campo de la biomedicina, y más concretamente en la aplicación de herramientas biotecnológicas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas, y más concretamente de la fibrosis renal.

Estado de la técnica

El epitelio renal se origina a partir de células que sufren una transición mesénquima-epitelio (TME). El proceso inverso, la transición epitelio mesénquima (TEM), se ha implicado en la progresión de tumores epiteliales y en la fibrosis que desencadena en último término un fallo renal. Los factores de transcripción Snail inducen TEMs tanto fisiológicas como patológicas por medio de la represión de la transcripción de la Cadherina E, (entre otras dianas (Cano y col., 2000; Batlle y col., 2000; Bolos y col., 2003). Se ha determinado que Snail suprime también la expresión de la cadherina específica de riñón, Cadherina 16 (Thompson y col., 1995), por medio de la represión de la transcripción de su activador, HNF-1beta (Factor nuclear hepático-1 beta; Bai y col., 2002). Esta represión está activa durante el desarrollo embrionario temprano y se ha observado que la desaparición de Snail ocurre concomitante con la aparición de HNF-1beta y subsecuentemente de Cadherina 16, identificados como signos de diferenciación del epitelio renal (Dressler, 2002). La activación de Snail en el riñón maduro puede considerarse un proceso de retorno a las propiedades embriogénicas y se ha identificado como suficiente para inducir TEM y fibrosis renal en ratones.

La fibrosis renal progresiva es una enfermedad devastadora que desencadena fallo renal en pacientes aquejados de distintas enfermedades como glomerulonefritis, nefropatía IgA, diabetes, daño renal inducido por toxicidad, obstrucción urinaria o deterioro de trasplantes renales entre otras (Liu, 2004; Kalluri y Neilson, 2003; Zeisberg y Kalluri, 2004; Vongwiwatana y col., 2005). Se pensaba que la fibrosis renal procedía de la activación de fibroblastos intersticiales, pero hay datos concluyentes de que también proceden del resultado de una TEM sufrida por las células epiteliales de los túbulos renales (Iwano y col., 2002). Se han observado signos de TEM tubular en los riñones de pacientes con fibrosis renal (Jinde y col, 2001; Rastaldi y col, 2002) y en modelos animales se ha calculado que alrededor del 36% de la población fibroblástica procede de una TEM local de las células epiteliales (Kalluri y Neilson, 2003).

Por otro lado, la expresión de Snail aparece concomitante con la TEM sufrida en el riñón tras obstrucción uretral unilateral que causa fibrosis renal (Sato y col., 2003), aunque no se estableció una causa-efecto, ya que la causa de la fibrosis renal fue la obstrucción uretral. Además, la expresión de Snail aparece concomitante con la TEM sufrida por células mesoteliales, que constituye una fibrosis mesotelial (Yañez-Mo y col., 2003) en dializados de pacientes sometidos diálisis peritoneal y en células en cultivo tratadas con TGF-beta.

Está patentado el uso de BMP-7 como agente inhibidor y con capacidad de reversión de fibrosis renal BMP-7 (proteína formadora de hueso numero 7) ejerce este efecto por su capacidad inhibidora de TGF-beta, agente inductor de fibrosis renal y conocido inductor de Snail (revisado en Barrallo-Gimeno y Nieto, 2005; United States Patent Application 20020173453, Method of treating renal injury). Tanto TGF-beta como BMP-7 son moléculas señalizadoras extracelulares que inician una cascada compleja de eventos. Si la sola inducción de Snail reproduce la fibrosis renal es de esperar que la inhibición específica de Snail sea una terapia mucho más específica que la inhibición de toda la cascada de señalización de TGF-beta.

Finalmente, si la sola actividad de Snail en el riñón maduro es capaz de inducir TEM y fibrosis renal, la presencia de Snail podría considerarse un marcador de fibrosis renal, su inhibición una forma de terapia anti-fibrótica y Snail podría ser de gran utilidad en la identificación de nuevos fármacos antifibróticos.

Descripción de la invención

Descripción breve

Un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación de un proceso de fibrosis renal, en adelante procedimiento de identificación de un proceso de fibrosis renal de la invención, basado en la identificación de la presencia de Snail en una muestra biológica y que comprende las siguientes etapas:

- a) identificación de la presencia de Snail, en una muestra biológica de origen renal, y
- b) comparación de la presencia de observada en a) con su ausencia en una muestra control, y donde su presencia es indicativa de la existencia de fibrosis renal.

ES 2 310 434 A1

Un objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de identificación de la invención en el que la identificación de Snail de a) se refiere a las formas humanas de Snail1 (hSnail1, SEQ ID NO 5 y 6) y (hSnail2, SEQ ID NO 7 y 8), ya sea la identificación en forma de un transcrito génico (RNAm) o de la forma proteica de ambos genes.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación y evaluación de la actividad de compuestos inhibidores de la proteína Snail útiles para el tratamiento de la fibrosis renal, en adelante procedimiento de identificación de compuestos de la presente invención, que comprende los siguientes pasos:

- a) Puesta en contacto de un sistema biológico donde exista una expresión de Snail que produzca fibrosis renal con el compuesto candidato objeto de este procedimiento, e incubación en las condiciones adecuadas,
- b) determinación de un parámetro indicativo del proceso de fibrosis renal, e
- c) identificación de un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína Snail cuando se observa una disminución de dicho parámetro de fibrosis renal.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de identificación de la invención donde el sistema biológico del punto a) es un animal transgénico donde la expresión de la proteína Snail es inducible, de forma constante o condicionada, y donde su expresión provoca fibrosis renal. Una realización particular es aquella donde el animal transgénico es el ratón transgénico de la presente invención (Ejemplo 2, ratón transgSnail1-ER).

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto o agente inhibidor de la actividad de la proteína Snail, en adelante uso de un compuesto de la presente invención, en la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la fibrosis renal, preferentemente humana.

Por tanto, en otra realización particular de la invención dicho uso de un compuesto se basa en que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína Snail humana y que incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína Snail,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína Snail,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína Snail, y
- d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína Snail

Una realización particular de la invención lo constituye el uso de un RNAi que se une preferentemente a la secuencia fragmento de RNAm de Snail gatgcacatccgaagccac (SEQ ID NO 9) o a otro fragmento que comprenda a esta.

Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento para el tratamiento de la fibrosis renal, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente inhibidor de la proteína Snail, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Una realización particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica en la que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína Snail humana y que incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína Snail,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína Snail,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína Snail, y
- d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína Snail

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por fibrosis renal, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe el proceso de fibrosis.

Un objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de esta invención en el que la fibrosis renal está provocada por una enfermedad, desorden o patología perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: glomerulonefritis, neuropatía IgA, diabetes, daño renal inducido por toxicidad, obstrucción urinaria y deterioro de trasplantes renales.

Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han observado que los genes Snail reprimen la expresión *in vivo* de cadherina-16 por la represión indirecta de la transcripción del gen de su activador, HNF1-beta, tanto en modelos celulares como animales. Para determinar si ambos genes Snail pueden ser represores de la cadherina-16 *in vivo*, se estudiaron sus patrones de expresión relativos durante el desarrollo embrionario en ratones, cuando ocurren distintos procesos de TEM y TME que dan lugar a la formación del riñón maduro (Ejemplo 1) y en ratones transgénicos con expresión inducible de los genes Snail (Ejemplo 2).

Los datos muestran que los patrones de expresión son complementarios en los distintos estadios embrionarios y que la cadherina-16 sólo aparece a partir de mesénquima tras la desaparición de la expresión de los genes Snail1 y Snail2 (Ejemplo 1). Estos datos son compatibles con que Snail reprime la expresión del gen de la cadherina-16 *in vivo* de forma indirecta (Figura 2v), a través de la represión de HNF-1beta, y más concretamente a través de la acción directa sobre su promotor (unión a caja E consenso conservada identificada en la presente invención) induciendo una completa TEM (Figura 4a y 4c).

Además, para determinar si los genes Snail pueden reprimir la transcripción de HNF-1beta y consecuentemente la expresión de Cadherina-16 se generaron ratones transgénicos con actividad inducible de Snail1 (Ejemplo 2). Así, se observó que Snail1 reprime HNF-1beta *in vivo*, lo cual induce la represión de cadherina-16, e induce la pérdida de las características epiteliales de las células, que parecen adquirir una morfología similar a la fibroblástica que tiene lugar en una TEM completa (Figura 5b, e, h, k, insertos). Estos cambios aquí descritos son reminiscentes de los observados tras la inducción experimental de fibrosis renal en distintas condiciones (Liu, 2003).

En resumen, estos datos indican que los genes Snail 1 y 2 actúan como represores del fenotipo epitelial en el riñón maduro y, además, que solamente su activación es suficiente para inducir todas las características de TEM y de fibrosis renal, es decir, que existe una relación directa -no sólo una asociación temporal- entre la actividad de los genes Snail y la etiopatogenia de esta enfermedad. De esta forma, la presencia de Snail puede considerarse un marcador de fibrosis renal y, por tanto, utilizarse su identificación como diagnóstico de fibrosis renal; y por otro lado, la proteína Snail puede ser de gran utilidad en la identificación de nuevos fármacos para el tratamiento de la fibrosis renal, y su inhibición génica como una forma de terapia. Estas aproximaciones terapéuticas de la fibrosis renal se basan en el uso de compuestos o agentes inhibidores de la actividad de dicha proteína Snail.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación de un proceso de fibrosis renal, en adelante procedimiento de identificación de un proceso de fibrosis renal de la invención, basado en la identificación de la presencia de Snail en una muestra biológica y que comprende las siguientes etapas:

- a) identificación de la presencia de Snail, en una muestra biológica de origen renal, y
- b) comparación de la presencia de observada en a) con su ausencia en una muestra control, y donde su presencia es indicativa de la existencia de fibrosis renal.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “genes Snail” o “proteínas Snail” se refiere tanto al gen o proteína Snail1 (SEQ ID NO 1 y 2, respectivamente) como al gen o proteína Snail2 (SEQ ID NO 3 y 4, respectivamente), así como a cualquier secuencia de nucleótidos o de aminoácidos (aás.) análoga a éstas de otras especies, respectivamente. En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos o aminoácidos que pueda ser aislada o construida en base a las secuencias de nucleótidos o aás. mostradas en la presente memoria, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos o aás. conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos o aás, la adición de uno o más nucleótidos o aás. en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos o aás. en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que constituya una secuencia codificante o péptido con actividad similar a las secuencias de la invención, es decir, sea capaz de inducir fibrosis renal.

En general, una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos o aás. en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 40%, preferentemente de, al menos, un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

Un objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de identificación de la invención en el que la identificación de Snail de a) se refiere a las formas humanas de Snail1 (hSnail1, SEQ ID NO 5 y 6) y (hSnail2, SEQ ID NO 7 y 8), ya sea la identificación en forma de un transcrito génico (RNAm) o de la forma proteica de ambos genes. La realización de estos análisis de identificación de los niveles de expresión de Snail puede ser llevado a cabo por un experto medio del área de la biomedicina gracias a la información descrita en la presente invención y en el estado de la técnica por distintas técnicas (Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de identificación de un proceso de fibrosis renal en el que la identificación de Snail se lleva a cabo mediante el uso de anticuerpos específicos de Snail. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de identificación de un proceso de fibrosis renal en el que la identificación de Snail se lleva a cabo mediante hibridación *in situ* con un precursor de Snail

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de identificación de un proceso de fibrosis renal en el que la identificación de Snail se lleva a cabo mediante RT-PCR de un precursor génico de Snail Este procedimiento está basado en la extracción de RNA polyA+ de una muestra biológica de origen renal y de un tejido control y la amplificación de la secuencia codificante de Snail con adecuados oligonucleótidos cebadores.

Por otro lado, este procedimiento de diagnóstico de fibrosis renal puede realizarse utilizándose a Snail como único marcador o de forma conjunta con otros marcadores de fibrosis renal, por ejemplo formando parte de un microarray de expresión biológica, ya sea en forma génica -a partir de RNAm- o en forma de proteína, que defina una huella o perfil diagnóstico de fibrosis pulmonar.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación y evaluación de la actividad de compuestos inhibidores de la proteína Snail útiles para el tratamiento de la fibrosis renal, en adelante procedimiento de identificación de compuestos de la presente invención, que comprende los siguientes pasos:

- d) Puesta en contacto de un sistema biológico donde exista una expresión de Snail que produzca fibrosis renal con el compuesto candidato objeto de este procedimiento, e incubación en las condiciones adecuadas,
- e) determinación de un parámetro indicativo del proceso de fibrosis renal, e
- f) identificación de un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína Snail cuando se observa una disminución de dicho parámetro de fibrosis renal.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de identificación de la invención donde el sistema biológico del punto a) es un animal transgénico donde la expresión de la proteína Snail es inducible, de forma constante o condicionada, y donde su expresión provoca fibrosis renal. Una realización particular es aquella donde el animal transgénico es el ratón transgénico de la presente invención (Ejemplo 2, ratón transgSnail1-ER).

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de identificación de la invención en el que el parámetro relacionado con el proceso de fibrosis renal de a) pertenece, a título ilustrativo y sin limitar el alcance de la presente invención, al siguiente grupo: un cambio morfológico característico de una TEM, nivel de vimentina, transcripción del gen Colágeno I y deposición de fibras de colágeno (Figura 6, Ejemplo 2).

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto o agente inhibidor de la actividad de la proteína Snail, en adelante uso de un compuesto de la presente invención, en la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la fibrosis renal, preferentemente humana.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “compuesto/agente inhibidor o antagonista” se refiere a una molécula que cuando se une o interactúa con la proteína Snail (por ejemplo, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 8), o con fragmentos funcionales de la misma, disminuye o elimina la intensidad o la duración de la actividad biológica de dicha proteína. En esta definición se incluye además aquellos compuestos que impiden o disminuyen la expresión del gen codificante de la proteína Snail, es decir, que impiden o disminuyen la transcripción del gen, la maduración del RNAm, la traducción del RNAm y la modificación post-traducciona. Un agente inhibidor puede estar constituido por un péptido, una proteína, un ácido nucleico o polinucleótido, un carbohidrato, un anticuerpo, un compuesto químico o cualquier otro tipo de molécula que disminuya o elimina el efecto y/o la función de la proteína Snail

A modo ilustrativo, dicho polinucleótido puede ser un polinucleótido que codifica una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína Snail, o bien un polinucleótido que codifica una ribozima específica del mRNA de la proteína Snail, o bien un polinucleótido que codifica un aptámero específico del mRNA de la proteína Snail, o bien polinucleótido que codifica un RNA de interferencia (“small interference RNA” o siRNA) específico del mRNA de la proteína Snail

Estos polinucleótidos mencionados pueden ser utilizados en un proceso de terapia génica en el que mediante cualquier técnica o procedimiento se permita la integración de los mismos en las células de un paciente humano. Este objetivo puede conseguirse mediante la administración a estas células renales de una construcción génica que comprende uno de los polinucleótidos mencionados con el fin de transformar dichas células permitiendo su expresión en el interior de las mismas de manera que se inhiba la expresión de la proteína Snail Ventajosamente, dicha construcción génica puede estar incluida dentro de un vector, tal como, por ejemplo, un vector de expresión o un vector de transferencia.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “vector” se refiere a sistemas utilizados en el proceso de transferencia de un gen exógeno o de una construcción génica exógena al interior de una célula, permitiendo de este modo la vehiculación de genes y construcciones génicas exógenas. Dichos vectores pueden ser vectores no virales o vectores virales (Pfeifer A, Verma IM (2001) Gene therapy: promises and problems. Annu Rev Genomics Hum Genet

ES 2 310 434 A1

2: 177-211) y su administración puede ser preparada por un experto en la materia en función de las necesidades y especificidades de cada caso.

Por tanto, en otra realización particular de la invención dicho uso de un compuesto se basa en que el compuesto
5 inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína Snail humana y que incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína Snail,

10 b) una ribozima específica del mRNA de la proteína Snail,

c) un aptámero específico del mRNA de la proteína Snail, y

15 d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína Snail

Con anterioridad se han descrito e incluso protegido mediante patente oligonucleótidos antisentido (US20060003956, Materials and methods for the derepression of the E-cadherin promoter; Kajita M, McClinic KN, Wade PA. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. Mol Cell Biol. 2004, 24(17): 7559-66) y siRNAs que inhiben su expresión (Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, Csiszar K, Fong KS, Vega S, Nieto MA, Cano A, Portillo F. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. EMBO J. 2005, 24(19): 3446-58; Tripathi MK, Misra S, Chaudhuri G. Negative regulation of the expressions of cytokeratins 8 and 19 by SLUG repressor protein in human breast cells. Biochem Biophys Res Commun. 2005, 329(2): 508-15). Por otro lado, estas técnicas de inhibición génica, y más concretamente la vehiculización de los compuestos -oligonucleótidos antisentido, iRNA, ribozimas o aptámeros- puede llevarse a cabo mediante el uso de nanopartículas que incrementan el éxito de dicha transferencia (Lu PV and Woodle MC, Adv Genet 54: 117-42, 2005; Hawker CJ and Wooley KL, Science 19 (309): 1200-5, 2005).

Así, una realización particular de la invención lo constituye el uso de un RNAi que se une preferentemente a la
30 secuencia fragmento de RNAm de Snail gatgcacatccgaagccac (SEQ ID NO 9) o a otro fragmento que comprenda a esta.

Las secuencias de nucleótidos a)-d) mencionadas previamente impiden la expresión del gen en mRNA o del mRNA en la proteína Snail, y, por tanto, anulan su función biológica, y pueden ser desarrolladas por un experto en el sector de ingeniería genética en función del conocimiento existente en el estado del arte sobre transgénesis y anulación de la expresión génica (Clarke, A.R. (2002) Transgenesis Techniques. Principles and Protocols, 2a Ed. Humana Press, Cardiff University; Patente US20020128220. Gleave, Martin. TRPM-2 antisense therapy; Puerta-Fernández E *et al.* (2003) Ribozymes: recent advances in the development of RNA tools. FEMS Microbiology Reviews 27: 75-97; Kikuchi, *et al.*, 2003. RNA aptamers targeted to domain II of Hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. J. Biochem. 133, 263-270; Reynolds A. *et al.*, 2004. Rational siRNA design for RNA interference. Nature Biotechnology 22 (3): 326-330).

Por otro lado, el origen de estos compuestos inhibidores de la actividad de las proteínas Snail puede ser variado, de tal forma que pueden ser origen natural (por ejemplo, de origen vegetal, bacteriano, vírico, animales o microorganismos eucariotas) o sintético.

Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento para el tratamiento de la fibrosis renal, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente inhibidor de la proteína Snail, junto con, opcionalmente,
50 uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Una realización particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica en la que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína Snail humana y que incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

55 a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína Snail,

b) una ribozima específica del mRNA de la proteína Snail,

60 c) un aptámero específico del mRNA de la proteína Snail, y

d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína Snail

Al igual que lo comentado anteriormente, una realización particular de la invención lo constituye la composición
65 farmacéutica de la invención en la que el inhibidor de Snail es un RNAi que se une preferentemente a la secuencia fragmento de RNAm de Snail gatgcacatccgaagccac (SEQ ID NO 5) o a otro fragmento que comprenda a esta.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

5 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto inhibidor de la actividad de la proteína Snail, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

10 En una realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por vía oral, por vía
15 intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un
20 método de tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por fibrosis renal, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe el proceso de fibrosis.

Un objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de esta invención
25 en el que la fibrosis renal está provocada por una enfermedad, desorden o patología perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: nefropatía IgA, glomerulonefritis, diabetes, daño renal inducido por toxicidad, obstrucción urinaria y deterioro de trasplantes renales.

Descripción de las figuras

30 Figura 1. *Snail induce TEM en células NMuMG concomitante con la represión de Cadherina-16.* Imágenes de contraste de fases (a, b), expresión de Cadherina E (c, d) y F-actina (e, f) en células transfectadas con el vector vacío (Mock) o transfectadas con Snail1 (Snail). La motilidad se determinó por un ensayo de herida en cultivo (g, h). Las propiedades invasivas se analizaron por la capacidad de las células de traspasar geles de colágeno IV. (k) Expresión de Cadherina E, cadherina-16 y Snail1 por RT PCR en células Mock y Snail. Las células que expresan Snail han perdido
35 la Cadherina E, reorganizado las fibras de actina y adquirido una morfología fibroblástica, todo ello indicativo de una TEM. Adicionalmente, son capaces de cerrar la herida en 24 horas y de invadir los geles de colágeno. Barras de escala 50 μm .

40 Figura 2. *Los epitelios renales que expresan Cadherina-16 se originan de mesénquima positivo para los genes Snail.* Hibridación *in situ* para Cadherina-16, Snail 1 y Snail 2 en distintos días del desarrollo embrionario del ratón: 10.5 (a-i), 13.5 (j-o) y 17.5 (p-u). La Cadherina-16 se expresa en el epitelio recién formado del ducto néfrico (nd, b) que ya no expresa Snail (e, h, insertos). Snail se observa en el mesénquima metanefrico indiferenciado (mm). Los sistemas urogenitales disecados (ver inserto en j) o sus secciones (j-o) se hibridaron con sondas para detectar
45 Cadherina-16 y los genes Snail. La Cadherina-16 se expresa también en los túmulos en formación (j, k) junto con los ductos sexuales (sd) y los túmulos epiteliales del mesonefros transitorio (ms) como se ve en el inserto en j. Los genes Snail se siguen expresan en el mesénquima remanente (mm, l-o). El epitelio de las nefronas y los túbulos colectores expresan niveles altos de Cadherina-16 cuando todo el mesénquima se ha diferenciado a epitelio y la expresión de los genes Snail ha desaparecido (r-u). Esta expresión se mantiene en el riñón adulto. Barras de escala 100 μm . v, Los factores de transcripción Snail inhiben la actividad del promotor del gen de la Cadherina-16. Snail 1 y Snail 2 siguen
50 reprimiendo la actividad del promotor cuando los sitios de unión de Snail han sido eliminados.

Figura 3.- *La expresión de HNF-1beta precede la de Cadherina-16 en los componentes epiteliales del riñón en desarrollo.* Hibridación *in situ* de embriones de 10.5, 13.5 y 17.5 días de desarrollo y sus secciones correspondientes.
55 La expresión de HNF-1beta se observa tan pronto como aparecen epitelios derivados de mesénquima. A 10.5 días de desarrollo, la expresión se observa en el conducto nefrítico (b) y en el mesénquima que se está condensando en regiones donde aun no ha aparecido la expresión de Cadherina-16 (Figura 2c). A 13.5 días de desarrollo, además del conducto nefrítico, se observan muchos lugares de expresión de HNF-1beta (d), algunos de los cuales ya expresan Cadherina-16. Snail2 se expresa en el mesénquima metanefrítico. Barras de escala 100 μm .

60 Figura 4.- *Snail1 y Snail2 reprimen la expresión de Cadherina-16 por la represión de la transcripción de su activador, HNF-1beta.* a) La activación de Snail1 reprime la expresión de Cadherina-16 y HNF-1beta. Las células NMuMG transfectadas establemente con una versión activable de Snail1 cambian su morfología 24 horas después de la inducción. b) Expresión del transgén por RT PCR. c) RT PCR a tiempo real de Cadherina-16 y HNF-1beta 24 horas
65 después de la administración del inductor, 4-OH-tamoxifeno. y d) Diagrama de la región de 1 kb por delante del lugar de iniciación de la traducción del gen del HNF-1beta de ratón mostrando una región muy conservada con humanos. Los dos sitios de unión de Snail están indicados con cajas negras. Snail1 y Snail2 reprimen la actividad del promotor nativo de HNF-1beta, pero no afectaron la de un promotor con el sitio conservado eliminado.

Figura 5.- *Snail1 reprime la expresión de HNF-1beta y cadherina-16 in vivo*. a, b) La proteína Snail exógena se traslocó al núcleo tras la administración de tamoxifeno, como se observa por medio del anticuerpo anti-receptor de estrógenos humano. c) RT-PCR a tiempo real de Snail1 en ratones normales y transgénicos en ausencia o presencia de tamoxifeno. Expresión de *HNF-1beta* (d, e), *cadherina-16* (g, h) y *Snail2* (j, k) en secciones de la médula de riñones transgénicos de dos semanas y sus valores correspondientes de expresión por RT-PCR a tiempo real (f, i y l, respectivamente). Barras de escala 25 μ m. Aunque no se muestra, también desaparece la Cadherina E, diana directa de Snail mostrada en tejidos de distinta etiología (revisado en Barrallo-Gimeno y Nieto, 2005).

Figura 6.- *La activación de Snail es suficiente para inducir fibrosis renales en ratones transgénicos*. La activación de Snail induce un cambio morfológico característico de una TEM (a, b); una activación del marcador mesenquimático vimentina (c, d); activación de la transcripción del gen del Colágeno I (e, f) y deposición de fibras de colágeno como se observa con la tinción de Trichome-Masson (g, h).

Figura 7.- *La activación de Snail también produce fibrosis en la corteza renal*. Se observan los mismos cambios morfológicos que en la médula, indicativos de TEM, así como la desaparición de Cadherina-16 y Cadherina E y la aparición de Snail2 y de depósitos de Colágeno I.

Ejemplos de la invención

Ejemplo 1

Los genes Snail reprimen la expresión de cadherina-16 por la represión de la transcripción del gen de su activador, HNF1-beta

La expresión ectópica de Snail1 en la línea celular NMuMG indujo una TEM como se ha descrito previamente en otras líneas celulares epiteliales (Cano y col., 2000; Batlle y col., 2000) con la adquisición de características mesenquimales como la pérdida de la expresión de cadherina E (Figura 1d), la reorganización del citoesqueleto de actina F (Figura 1f) y, además, adquieren movilidad (Figura 1g y 1h) y propiedades invasivas (Figura 1i y 1j). Además de reprimir marcadores epiteliales conocidos, también reprimió la expresión de la Cadherina-16 (Figura 1k), una cadherina específica del riñón. Ya que la mama de ratón y otras líneas celulares procedentes de mama humana no expresaban Cadherina-16, se concluyó que esta expresión es una peculiaridad de la línea celular NMuMG, pero indujo a estudiar si Snail puede reprimir a la Cadherina-16 en el riñón.

Para determinar si ambos genes Snail pueden ser represores de la Cadherina-16 *in vivo*, se estudió los patrones de expresión relativos durante el desarrollo embrionario en ratones, cuando ocurren distintos procesos de TEM y TME que dan lugar a la formación del riñón maduro. Tan pronto como los conductos nefríticos se epitelizan la expresión de Snail2 se reprime y la cadherina-16 aparece claramente, observándose que la diferenciación en gradiente anteroposterior de los conductos se correlaciona con la expresión complementaria de los genes cadherina-16 y Snail (Figura 2a-2i). Los conductos colectores inducen al mesénquima nefrítico a condensarse y a diferenciarse en estructuras tubulares las cuales van a dar lugar a las nefronas. El mesénquima nefrítico expresa ambos genes Snail1 y Snail2 (Figura 2f y 2i) y, de nuevo, su epitelización se correlaciona con su represión y el inicio de la expresión de cadherina-16 (Figura 2j-2o). En el día 17.5 dpc, además de lo mencionado para los conductos colectores, se observa una fuerte expresión de cadherina-16 en la neurona. (Figura 2p-2u). Los genes Snail se encuentran en este momento completamente reprimidos en el riñón sin que se observe mesénquima desdiferenciado, situación que se mantiene durante la vida adulta. Los datos muestran que los patrones de expresión son complementarios en los distintos estadios embrionarios y que la Cadherina-16 sólo aparece a partir de mesénquima tras la desaparición de la expresión de los genes Snail1 y Snail2. Estos datos son compatibles con que Snail reprime la expresión del gen de la Cadherina-16 *in vivo*.

Para determinar si Snail reprime directamente la transcripción del gen de la cadherina-16, se analizó su promotor, donde se encontraron dos cajas E, consenso de unión del factor de transcripción Snail, localizadas en posición en las posiciones -581 y -746 (Figura 2v). Cuando se transfectó Snail1 o Snail2 junto a una construcción génica conteniendo estas dos cajas y capaz de reproducir el patrón de expresión de Cadherina-16 (Whyte DA y col 1999; Shao X y col 2002), se observó una disminución en la actividad del promotor del 61% y 56%, respectivamente. Para confirmar si las cajas de unión de Snail eran necesarias para producir este efecto, se co-transfectaron con Snail1 o Snail2 construcciones con esas cajas mutadas o eliminadas. Estos experimentos produjeron el mismo resultado, lo que indica que Snail reprime la actividad del promotor de la Cadherina-16 de forma indirecta (Figura 2v).

Debido a que los genes *Snail* están caracterizados como represores, se investigó si su efecto represor lo realizaba por medio de la represión de un activador de Cadherina-16. HNF-1beta es un potente activador conocido de Cadherina-16 (Bai y col, 2002) y porque además presenta un patrón de expresión durante el desarrollo renal muy interesante. Así, se estudió su patrón de expresión relativo al de los genes Snail y la Cadherina-16 durante el desarrollo del riñón y se observó que muestra una expresión complementaria a la de los genes Snail, que aparece cuando los genes Snail desaparecen y que su expresión ocurre antes que la de Cadherina-16 y en los mismos territorios. De esta forma a los 10 dpc, HNF-1beta se expresa en la diferenciación de los ductos nefríticos en la región posterior (Figura 3c) donde los genes Snail han sido reprimidos y la cadherina-16 no está expresada (Figura 2c). En el 13.5 dpc el mesénquima metanefrico expresa Snail1 y Snail2, mientras que los transcritos de HNF-1beta son detectados en algunas áreas de mesénquima epitelializado las cuales son todavía negativas a la cadherina-16 (Figura 3d-f). Las nefronas que se

diferencian desde ese mesénquima para dar lugar a las estructuras epiteliales funcionales del riñón maduro expresan tanto HNF-1beta y cadherina (Figura 2). Estos datos son compatibles con que Snail reprime a HNF-1beta y que esta represión impide la aparición de cadherina-16.

Para determinar si la activación aguda de Snail es capaz de reprimir HNF-1beta y cadherina-16, se ha utilizado una construcción inducible que activa Snail1 por la administración de 4-OH-Tamoxifeno (semejante a la utilizada en Locascio y col., 2002) en células NMuMG. Este procedimiento se utiliza para la activación rápida de factores de transcripción, ya que la proteína se encuentra sintetizada de forma inactiva y el agente inductor simplemente la transporta al núcleo de la célula para que actúe como factor de transcripción regulando la expresión de otros genes. Estos experimentos permitieron afirmar que la sola activación de la proteína Snail1 fue capaz de reprimir la transcripción de HNF-1beta y cadherina-16 en 24 h induciendo una completa TEM (Figura 4a y 4c). Interesantemente, 6 horas tras la activación de Snail se observó una represión de los niveles de HNF-1beta del 20% y unos valores de cadherina-16 sin alterar. Estos datos indican que Snail induce la represión secuencial de HNF-1beta y cadherina-16, es decir, que Snail inhibe la expresión de cadherina-16 a través de la represión de HNF-1beta.

Para determinar si la represión HNF-1beta por Snail es directa sobre el promotor, se realizaron experimentos semejantes a los descritos sobre el promotor de la Cadherina-16 con Snail1 y Snail2. Se identificaron dos cajas E consenso de unión de Snail, una de ellas conservada en el promotor de ratón y humano (Figura 4d). Los experimentos de cotransfección con la construcción de este promotor intacto de HNF-1beta mostraron que ambos genes Snail 1 y 2 -tal como se describieron anteriormente para el promotor de la cadherina-16- reprimen la actividad del promotor (Figura 4d), pero no así de aquellos en los que se habían eliminado las dos cajas, o simplemente la caja conservada (Figura 5d). Estos datos muestran que Snail es un represor directo de la transcripción del gen de HNF-1beta a través de su unión a la caja conservada.

Ejemplo 2

Snail induce fibrosis renal en ratones transgénicos

Para determinar si los genes Snail pueden reprimir la transcripción de HNF-1beta y consecuentemente la expresión de Cadherina-16 y también la de Cadherina E (su diana conocida en otros tejidos (revisado en Barrallo-Gimerno y Nieto, 2005) en el riñón, se generaron ratones transgénicos con actividad inducible de Snail1 (ratón transgSnail1-ER). Se utilizó el mismo sistema que para la expresión inducible en líneas celulares. Ratones normales y transgénicos se trataron con una inyección de excipiente o con tamoxifeno tras el nacimiento durante dos semanas, momento en que fueron sacrificados y se analizó la expresión (Figura 5c) y localización de la proteína transgénica (Figura 5a y 5b). El análisis de los riñones correspondientes mostró la traslocación de la proteína exógena al núcleo (Figura 5b) y la represión de la expresión de los genes de la Cadherina E, la Cadherina-16 y HNF-1beta sólo en los ratones transgénicos tratados con tamoxifeno (Figura 5d-5i; suplementaria figura 5 online). Se observó también la inducción de la expresión de Snail2, el miembro de la familia con expresión prominente durante el desarrollo renal (Figura 5j-5l; suplementaria figura 5 online) y mostrado como funcionalmente equivalente a Snail1 en líneas celulares y en embriones como inductor de TEM (Bolós y col., 2003; del Barrio y Nieto, 2002). En resumen, se observó que Snail1 reprime HNF-1beta *in vivo*, lo cual induce la represión de cadherina-16. Conjuntamente con esta represión de la cadherina-E la expresión de Snail1 presente un alto impacto en la pérdida de las características epiteliales, de tal forma que las células de los conductos colectores de la médula parecen adquirir una morfología similar a la fibroblástica reminiscente de la TEM (Figura 5b, e, h, k, insertos).

Para verificar que la expresión de los genes Snail indujo no sólo la represión de los genes citados, sino una TEM completa, se analizó el fenotipo histológico de los riñones de estos animales transgénicos y se observó que en la médula renal la activación de Snail1 indujo un cambio morfológico compatible con TEM, activación del marcador mesenquimático vimentina y activación de la transcripción de Colágeno I (Figura 6e-f) junto con sus depósitos (Figura 6g-h), marcador prototípico de fibrosis renal (Alexakis y col., 2005). Estos cambios también aparecieron en la corteza renal (Figura 7). Los cambios aquí descritos son reminiscentes de los observados tras la inducción experimental de fibrosis renal en distintas condiciones (Liu, 2003). Estos datos indican que los genes Snail1 y Snail2 actúan como represores del fenotipo epitelial en el riñón y, además, que solamente su activación es suficiente para inducir todas las características de la fibrosis renal.

Materiales y Métodos

Plásmidos y anticuerpos. Plásmidos de expresión. pcDNA3-Snail1 corresponde a la secuencia completa del cDNA de Snail1 de ratón insertada en el plásmido pcDNA3 (Invitrogen; Cano *et al.*, 2000). pcDNA3-Snail-ER corresponde a la secuencia codificante de Snail1 unida a una versión mutada del dominio de unión al agonista del receptor de estrógeno humano que reconoce el ligando sintético 4'-OH-Tamoxifeno (Locascio *et al.*, 2002). La secuencia completa del cDNA de Snail2 de ratón fue también clonada en pcDNA3 (pcDNA3-Snail2). Plásmidos reporteros. La construcción reportera del promotor de cadherina-16 de ratón pKsp(1268F)-Luc ha sido amablemente proporcionada por el Doctor Peter Igarashi (Universidad de Tejas, Southwestern Medical Center, Dallas, TX). La secuencia del promotor de HNF-1β de ratón conteniendo 1072 pb desde el ATG ha sido amplificada por PCR a partir del DNA genómico de las células NMuMG utilizando una DNA polimerasa de alta fidelidad (*PfuTurbo*, Stratagene). Los oligonucleótidos iniciadores utilizados para la amplificación fueron 5'-gggtaccATCTACACATTCACTACTAGA-3' (SEQ ID NO 10)

y 5'-acgcgtTTTCCAAGGACGGAAAAAGAA-3' (SEQ ID NO 11) correspondiendo a la secuencia del GenBank™ X55842 y conteniendo los sitios de restricción *KpnI* y *MluI* en los extremos 5', respectivamente. El producto de PCR purificado ha sido subclonado en el vector pGL3-basic (Promega). El kit Quickchange Site Directed Mutagenesis (Stratagene) ha sido utilizado para introducir mutaciones dentro de las cajas E presentes en el promotor de *cadherina-16* de ratón. La secuencia 5'-CA(G/C)(G/C)TG-3' ha sido mutada por 5'-AA(G/C)(G/C)TA-3'. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para eliminar las cajas E en los promotores de *cadherina-16* y de *HNF-1β* están disponibles si se requieren. Anticuerpos: Anti-cadherina-E (ECCD2, 1:200, Takara), anti-vimentina (MO725, 1:200, Dako). La proteína de fusión Snail1-ER ha sido detectada por inmunoblots o inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-α receptor de estrógeno humano (1:100, Santa-Cruz). La F-actina ha sido detectada usando la faloidina-FITC (1:10, Sigma).

Cultivo celular y generación de células establemente transfectadas con Snail1 o Snail1-ER. La línea celular NMuMG procede del epitelio de la glándula mamaria de ratón. Esta línea celular epitelial expresa altos niveles de *cadherina-E* y es muy sensible a la transición epitelio-mesénquima inducida por TGFβ (Miettinen *et al.*, 1994). Para la transfección, las células NMuMG se sembraron en placas de 6 pocillos (5x10⁴ células por pocillo de 3.5 cm) en una mezcla 1:1 de medio Ham's F12 y de medio Dulbecco's Modified Eagle's complementada con 100 IU/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de estreptomycin, 2 mM de glutamina y 2.5 μg/ml de anfotericina B, 10% de suero bovino fetal y 10 μg/ml de insulina. 24 horas después de sembrar las células, se añadieron 500 ng de DNA en presencia de LIPOFECTAMINA (Roche) y las células se incubaron con el DNA toda la noche. Un día después, se empezó la selección de las células transfectadas resistentes a la neomicina utilizando el análogo de neomicina G-418 (Calbiochem, 400 μg/ml). Se aislaron dos clones independientes transfectados con Snail1 o Snail1-ER.

Ensayos de migración y de invasión. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 3x10⁵ células por pocillo. A las 24 horas, se realizó una herida en la zona central del cultivo confluyente y las células se incubaron por un periodo adicional de 24 horas tras lavar el cultivo y añadirle medio fresco. Los cultivos se observaron a varios tiempos y se tomaron fotografías de la zona herida utilizando un microscopio invertido Zeiss Axiovert. Los ensayos de invasión en geles de colágeno de tipo IV se realizaron en cámaras de Boyden como se describe en Cano *et al.*, 2000. Las células del compartimiento de abajo fueron recogidas y contadas después de 24 horas. En paralelo los núcleos de las células presentes en la parte inferior del filtro se tiñeron con DAPI después de una fijación en metanol y de haber quitado todas las células de la parte superior del filtro.

Análisis genético por microarray. Se utilizó el Chip U74Av2 para genoma murino de Affymetrix para definir el perfil de expresión génica de las células transfectadas con Snail1 (Snail1-transfectantes). Este perfil fue comparado con el de las células transfectadas con el vector vacío (mock-transfectantes). Los RNA biotinilados se analizaron e hibridaron al Chip. A continuación, el Chip se tiñó con estreptavidina-ficoeritrina y se escaneó. Los chips se analizaron usando el programa Affymetrix® Microarray Suite 5.0.

Análisis de los transcritos. Los mRNAs Poly(A)+ se extrajeron de las células NMuMG utilizando el kit Microfast Track (Invitrogen). Para el análisis por Northern blots, alícuotas de 1.5 μg de mRNAs Poly(A)+ purificados con celuloosa oligo(dT) fueron transferidos a membranas de nylon que se hibridaron con sondas radiomarcadas con [α-³²P]dCTP (rediprime II, Amersham Biosciences). Las sondas de DNA de Snail1, *cadherina-E*, *cadherina-16* y GAPDH fueron amplificadas por RT-PCR a partir de 25 ng de los cDNAs purificados correspondientes y sus hibridaciones se visualizaron por autoradiografía utilizando un Hyperfilm MP (Amersham Biosciences). La RT-PCR para Snail1 y GAPDH se describió en Cano *et al.*, 2000. La RT-PCR en tiempo real se realizó utilizando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7000 y las sondas TagMan®. Los oligonucleótidos y las sondas se obtuvieron de Applied Biosystems Assays-on-Demand como sigue: Mm-99999915-g1 (GAPDH), Mm-00441533-g1 (Snail1), Mm00483196-m1 (*Cadherina-16*) y Mm-00447452-m1 (*HNF-1β*). La expresión de RNA se calculó utilizando el método comparativo Ct normalizado con GAPDH. Los resultados finales se expresan relativos a un calibrador (células mock o ratones silvestres) utilizando la fórmula 2^{-(ΔΔCt)} ±SD. El RNA fue extraído y el cDNA sintetizado a partir de las células transfectadas con Snail1-ER o con el vector vacío a varios tiempos después del tratamiento con 4'-OH-Tamoxifeno y a partir de los riñones de los animales normales o transgénicos neonatales o después de dos semanas de administración de tamoxifeno o excipiente.

Hibridación in situ. Los embriones de ratón proceden de la cepa Balb-C y sus edades, establecidas en días *post-coitum* (dpc) se determinaron considerando el día en el cual se ve el tapón vaginal como el día 0.5. Los sistemas urogenitales o los riñones se disecaron a estadios 13.5 dpc y 17.5 dpc respectivamente, se fijaron en paraformaldehído a 4 en PBS/DEPC toda la noche. A continuación se procesaron directamente para la hibridación *in situ* (ISH) o se embebieron en gelatina y cortaron con un vibratomo para obtener secciones de 50 μm. Las ISH en secciones de gelatina o en embriones enteros se realizaron como se describe en Blanco *et al.*, 20002 utilizando las sondas de RNA marcadas con DIG-11-UTP de Snail1, Snail2 y *cadherina-E* de ratón (Cano *et al.*, 2000; Sefton *et al.*, 1998). Las sondas para *Cadherina-16* y *HNF-1β* de ratón fueron obtenidas por RT-PCR a partir del cDNA de las células NMuMG utilizando los oligonucleótidos descritos arriba. Después de la hibridación, los embriones o las secciones de riñones se procesaron como descrito en Cano *et al.* 2000.

Análisis de promotor. Las actividades de los promotores de *cadherina-16* y *HNF-1β* se determinaron co-transfectando las células NMuMG con 50 ng de pcDNA3-Snail, pcDNA3-mSnail2 o el vector vacío y con 300 ng de pKsp (1268F)-Luc ó 400 ng de pmHNF-1β-Luc. Un plásmido con el gen *Renilla reniformis luciferase* (phRL-CMV-Luc, Promega) SE co-transfectó como control de eficiencia. 24 horas después de la transfección, las actividades de las

luciferasas de luciérnaga (Luc) y de *renilla* se determinaron utilizando el sistema Dual Luciferase Reporter Assay (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor. La actividad Luc fue normalizada a la de la luciferasa de *renilla*. En todos los experimentos, la cantidad total de DNA transfectado fue estandarizada añadiendo el vector vacío. Los resultados se representan como el porcentaje de la actividad de luciferasa relativa a los controles (valores de luciferasa en células co-transfectadas con el vector vacío).

Ratones transgénicos. El transgén Snail1-ER fue diseñado como descrito anteriormente (Locascio *et al.*, 2002) y un ratón transgénico (ratón transgSnail1-ER) para esta construcción se generó según los procedimientos estándares (Hogan, B., Beddington, R. & Lacy, F. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994). Para este estudio, seleccionamos una línea de animales cuya expresión de la proteína transgénica es muy alta en el riñón. En este modelo, aunque la proteína Snail1-ER esté expresada constitutivamente, su función como factor de transcripción se desarrolla únicamente cuando se trasloca la proteína en el núcleo después del tratamiento con el tamoxifeno. El transgén se detecta a partir del DNA procediendo de la cola de los animales por PCR (los detalles respecto a los oligonucleótidos utilizados están disponibles si se requiere). La localización subcelular de la proteína fue analizada por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-receptor de estrógeno humano. El mismo anticuerpo sirvió para valorar la cantidad de la proteína Snail1-ER en los distintos tejidos obtenidos de los ratones transgénicos por Western Blots. El tamoxifeno (Sigma) fue disuelto primero en etanol (10% del volumen final) y luego en aceite de maíz (Sigma) para tener una concentración final de 30 mg/ml. La solución fue sonicada para mejorar su solubilidad y se administraron 3 mg de Tamoxifeno subcutáneamente por cada 20 gramos de peso corporal en los animales neonatales cada tres días durante dos semanas. Una vez finalizado el tratamiento, los animales se sacrificaron y los riñones obtenidos se embebieron en gelatina, se cortaron con un vibratomo para la ISH o la inmunohistoquímica o fueron procesados para la extracción de RNAs.

Referencias

- Bai, Y., Pontoglio, M., Hiesberger, T., Sinclair, A.M. & Igarashi, P. Regulation of kidney-specific Kspcadherin gene promoter by hepatocyte nuclear factor-1beta. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283, F839-51 (2002).
- Barrallo-Gimeno, A. & Nieto, M.A. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151-61 (2005).
- Battle, E. *et al.* The transcription factor snail is a I repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 2, 84-9 (2000).
- Bolos, V. *et al.* The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J. Cell Sci.* 116, 499-511 (2003).
- Cano, A. *et al.* The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing Ecadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2, 76-83 (2000).
- Chilosí *et al.*, 2003.
- del Barrio, M.G. & Nieto, M.A. Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development* 129, 1583-93 (2002).
- Dressler 2002. *Book*.
- Hawker CJ and Wooley KL. The convergence of synthetic organic and polymer chemistries. *Science* 19 (309): 1200-5, 2005.
- Huber *et al* *Current Op Cell Biol* 2005.
- Iwano, M. *et al.* Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* 110, 341-50 (2002).
- Jinde *et al.*
- Kalluri and Neilson 2003.
- Li *et al*, 2005.
- Locascio, A., Vega, S., de Frutos, C.A., Manzanares, M. & Nieto, M.A. Biological potential of a functional human SNAIL retrogene. *J. Biol. Chem.* 277, 38803-9 (2002).
- Rastaldi *et al* 2002.
- Lu PV and Woodle MC. *In vivo* application of RNA interference: from functional genomics to therapeutics. *Adv Genet* 54: 117-42, 2005.

ES 2 310 434 A1

- **Sato, M., Muragaki, Y., Saika, S., Roberts, A.B. & Ooshima, A.** Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J. Clin. Invest.* 112, 1486-94 (2003).

5 - **Shao, X., Johnson, J.E., Richardson, J.A., Hiesberger, T. & Igarashi, P.** A minimal Ksp-cadherin promoter linked to a green fluorescent protein reporter gene exhibits tissue-specific expression in the developing kidney and genitourinary tract. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 1824-36 (2002).

10 - **Thompson, R.B. et al.** Isolation and cDNA cloning of Ksp-cadherin, a novel kidney-specific member of the cadherin multigene family. *J. Biol. Chem.* 270, 17594-601 (1995).

 - **Vongwiwatana et al., 2005.**

15 - **Whyte, D.A. et al.** Ksp-cadherin gene promoter. I. Characterization and renal epithelial cell-specific activity. *Am. J. Physiol.* 277, F587-98 (1999).

 - **Yañez-Mo et al., 2002.**

20 - **Zeisberg, M. & Kalluri, R.** The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J. Mol. Med.* 82, 175-181 (2004).

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación de un proceso de fibrosis renal **caracterizado** porque se basa en la identificación de la presencia del factor de transcripción SNAIL en una muestra biológica y que comprende las siguientes etapas:

a) identificación de la presencia del factor de transcripción SNAIL, en una muestra biológica de origen renal, y

b) comparación de la presencia de observada en a) con su ausencia en una muestra control, y donde su presencia es indicativa de la existencia de fibrosis renal.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el factor de transcripción Snail de a) se refiere a la identificación de un transcrito del gen Snail1 humano (SEQ ID NO 5) o del gen Snail2 (SEQ ID NO 7).

3. Un procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el factor de transcripción Snail de a) se refiere a la identificación del factor de transcripción Snail1 humano (SEQ ID NO 6) o del factor de transcripción Snail2 humano (SEQ ID NO 8).

4. Un procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la identificación del factor de transcripción Snail de a) se lleva a cabo mediante el uso de anticuerpos específicos, monoclonales o policlonales, frente al factor de transcripción SNAIL.

5. Un procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la identificación del factor de transcripción Snail de a) se lleva a cabo mediante hibridación *in situ* con un precursor del factor de transcripción SNAIL.

6. Un procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la identificación del factor de transcripción Snail de a) se lleva a cabo mediante la amplificación RT-PCR de un precursor génico del factor de transcripción SNAIL.

7. Procedimiento de identificación y evaluación de la actividad de compuestos inhibidores del factor de transcripción Snail útiles para el tratamiento de la fibrosis renal **caracterizado** porque comprende los siguientes pasos:

a) Puesta en contacto de un sistema biológico donde exista una expresión del factor de transcripción SNAIL que produzca fibrosis renal con el compuesto candidato objeto de este procedimiento, e incubación en las condiciones adecuadas,

b) determinación de un parámetro indicativo del proceso de fibrosis renal, e

c) identificación de un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína Snail cuando se observa una disminución de dicho parámetro de fibrosis renal.

8. Procedimiento de identificación según la reivindicación 7 **caracterizado** porque el sistema biológico del punto a) es un animal transgénico donde la expresión del factor de transcripción Snail es inducible, de forma constante o condicionada, y donde su expresión provoca fibrosis renal.

9. Procedimiento de identificación según la reivindicación 8 **caracterizado** porque el animal transgénico es el ratón transgSnail1-ER.

10. Procedimiento de identificación según la reivindicación 7 **caracterizado** porque el parámetro relacionado con el proceso de fibrosis renal de b) pertenece al siguiente grupo: un cambio morfológico característico de una TEM, nivel de vimentina, transcripción del gen Colágeno I y deposición de fibras de colágeno.

11. Uso de un compuesto o agente inhibidor de la actividad del factor de transcripción Snail en la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la fibrosis renal, preferentemente humana **caracterizado** porque el compuesto es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante del factor de transcripción Snail humano, ya sea Snail1 o Snail2, y que incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA del factor de transcripción Snail,

b) una ribozima específica del mRNA del factor de transcripción Snail,

c) un aptámero específico del mRNA del factor de transcripción Snail, y

d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína Snail.

ES 2 310 434 A1

12. Uso de un compuesto según la reivindicación 11 **caracterizado** porque el iRNA de d) se une preferentemente a la secuencia fragmento de RNAm del factor de transcripción Snail (SEQ ID NO 9) o a otro fragmento que comprenda a esta.

13. Composición farmacéutica o un medicamento para el tratamiento de la fibrosis renal **caracterizado** porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante del factor de transcripción Snail humano, ya sea Snail1 o Snail2, y que incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA del factor de transcripción Snail,

b) una ribozima específica del mRNA del factor de transcripción Snail,

c) un aptámero específico del mRNA del factor de transcripción Snail, y

d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA del factor de transcripción Snail.

14. Composición farmacéutica según la reivindicación 13 **caracterizado** porque el iRNA de d) se une preferentemente a la secuencia fragmento de RNAm del factor de transcripción Snail (SEQ ID NO 9) o a otro fragmento que comprenda a esta.

15. Uso de la composición farmacéutica según las reivindicaciones 13 a la 14 en un método de tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por fibrosis renal, y consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe el proceso de fibrosis.

16. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 15 **caracterizado** porque la fibrosis renal está provocada por una enfermedad, desorden o patología perteneciente al siguiente grupo: glomerulonefritis, nefropatía IgA, diabetes, daño renal inducido por toxicidad, obstrucción urinaria y deterioro de transplantes renales.

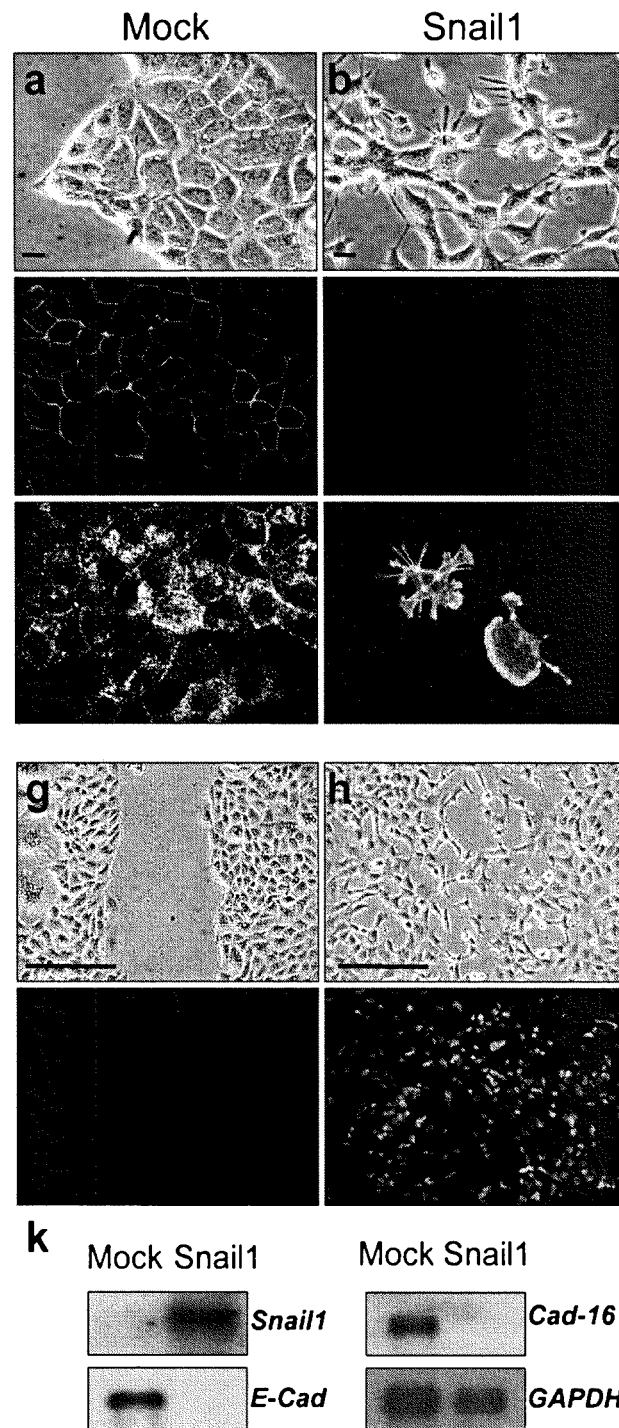


Figura 1

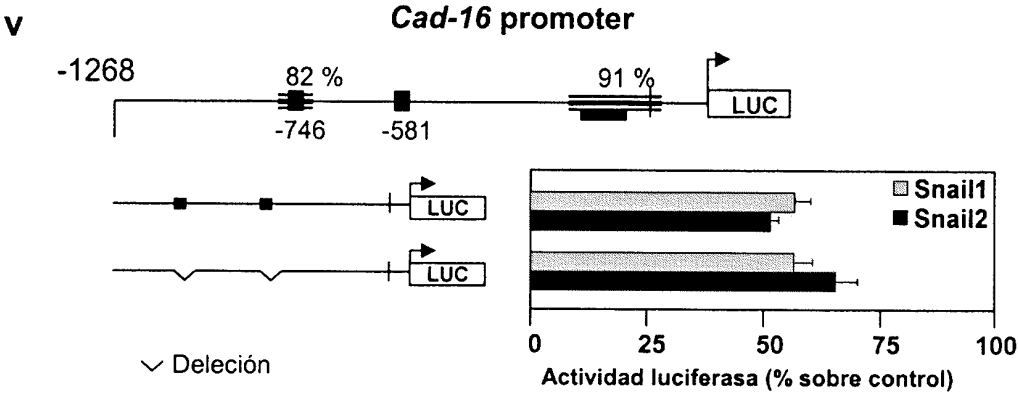
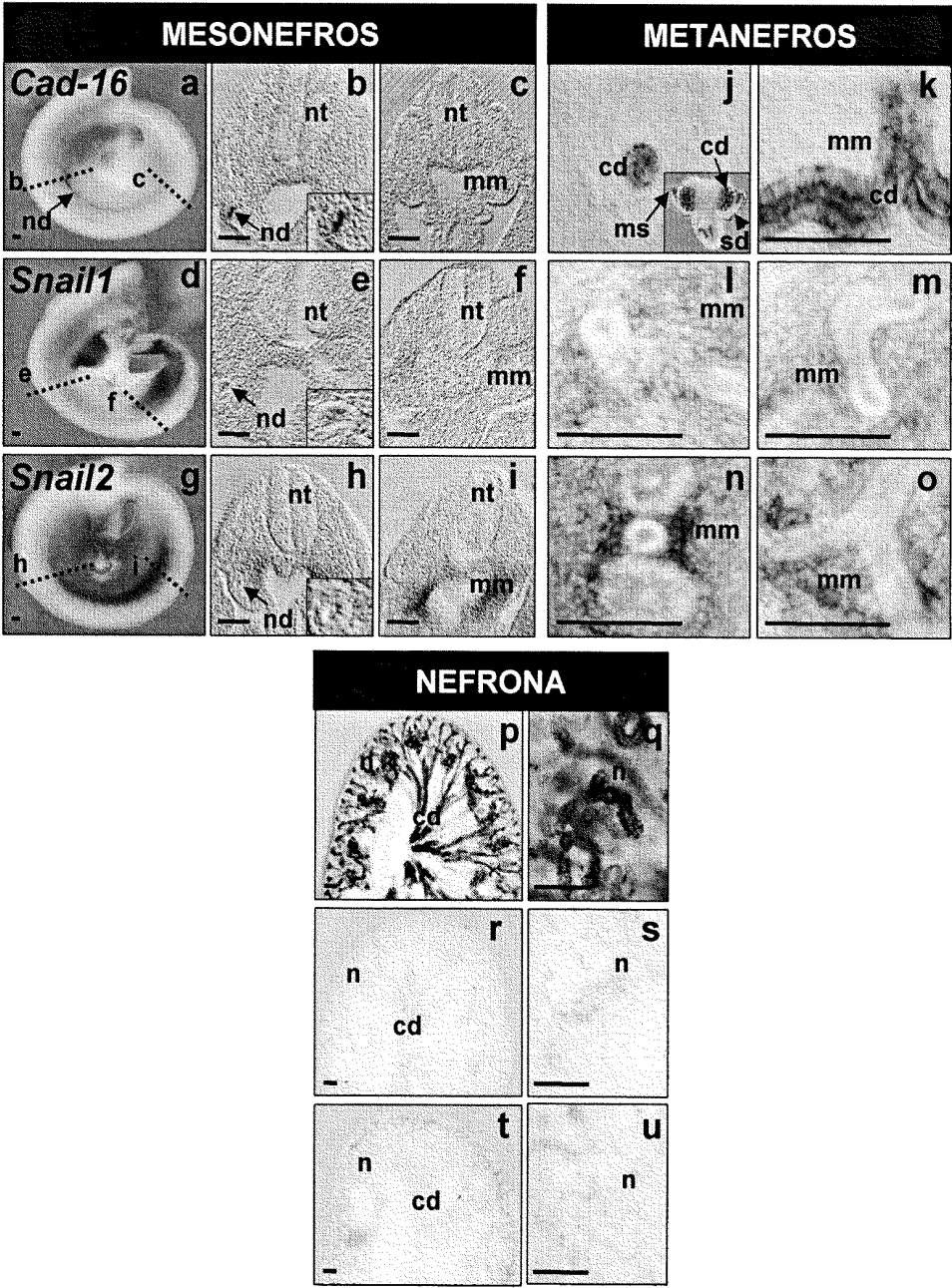


Figura 2

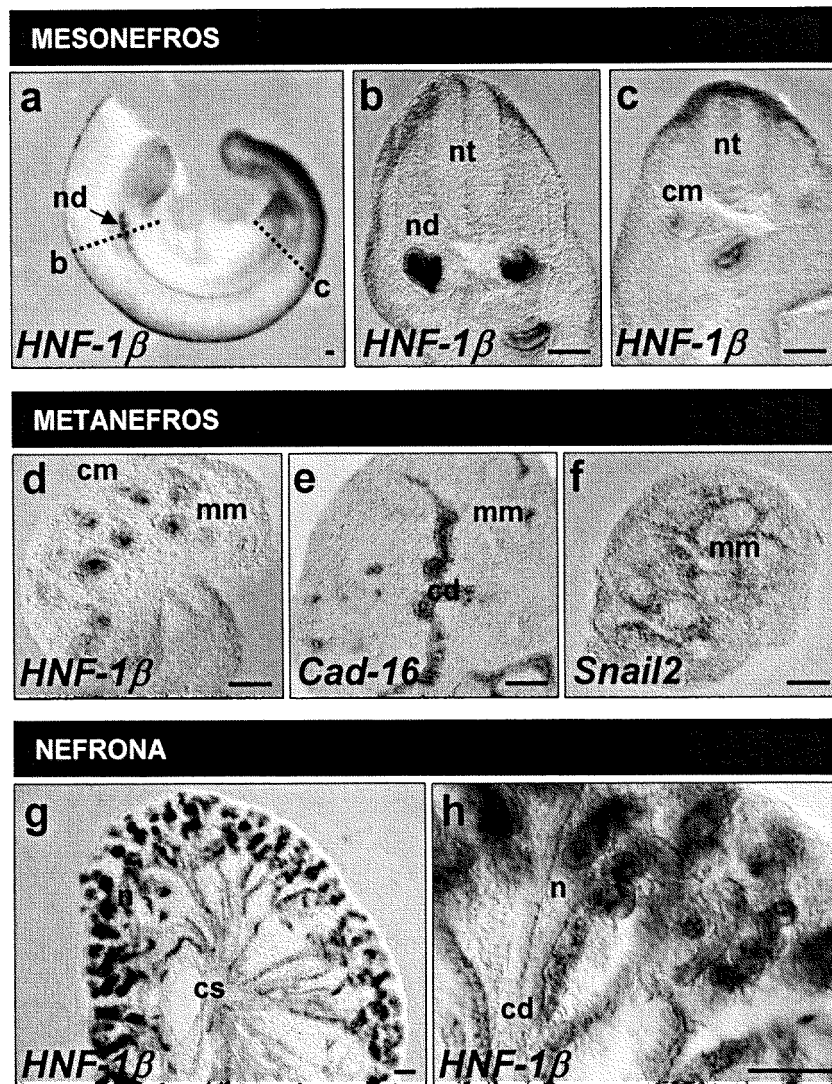


Figura 3

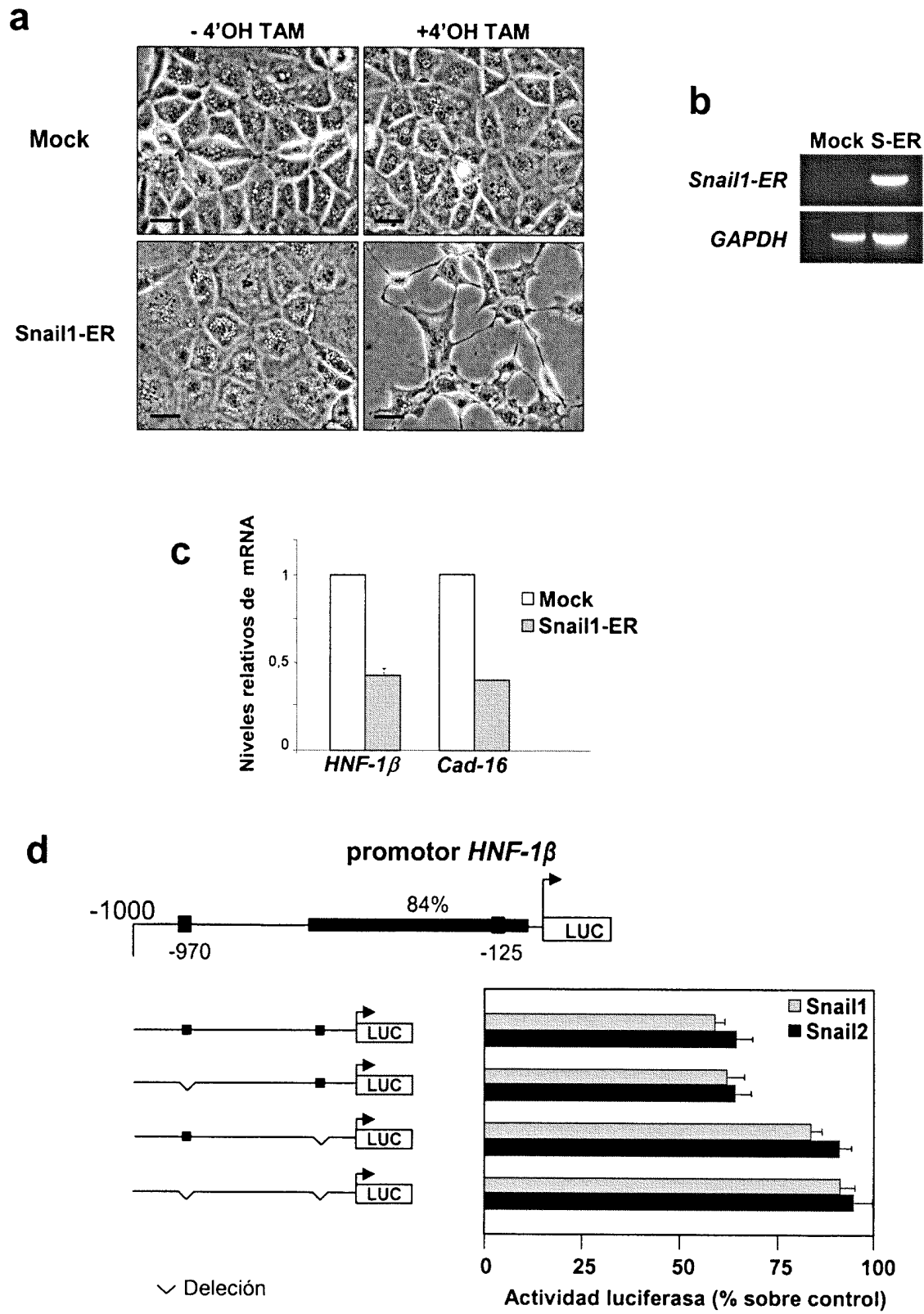


Figura 4

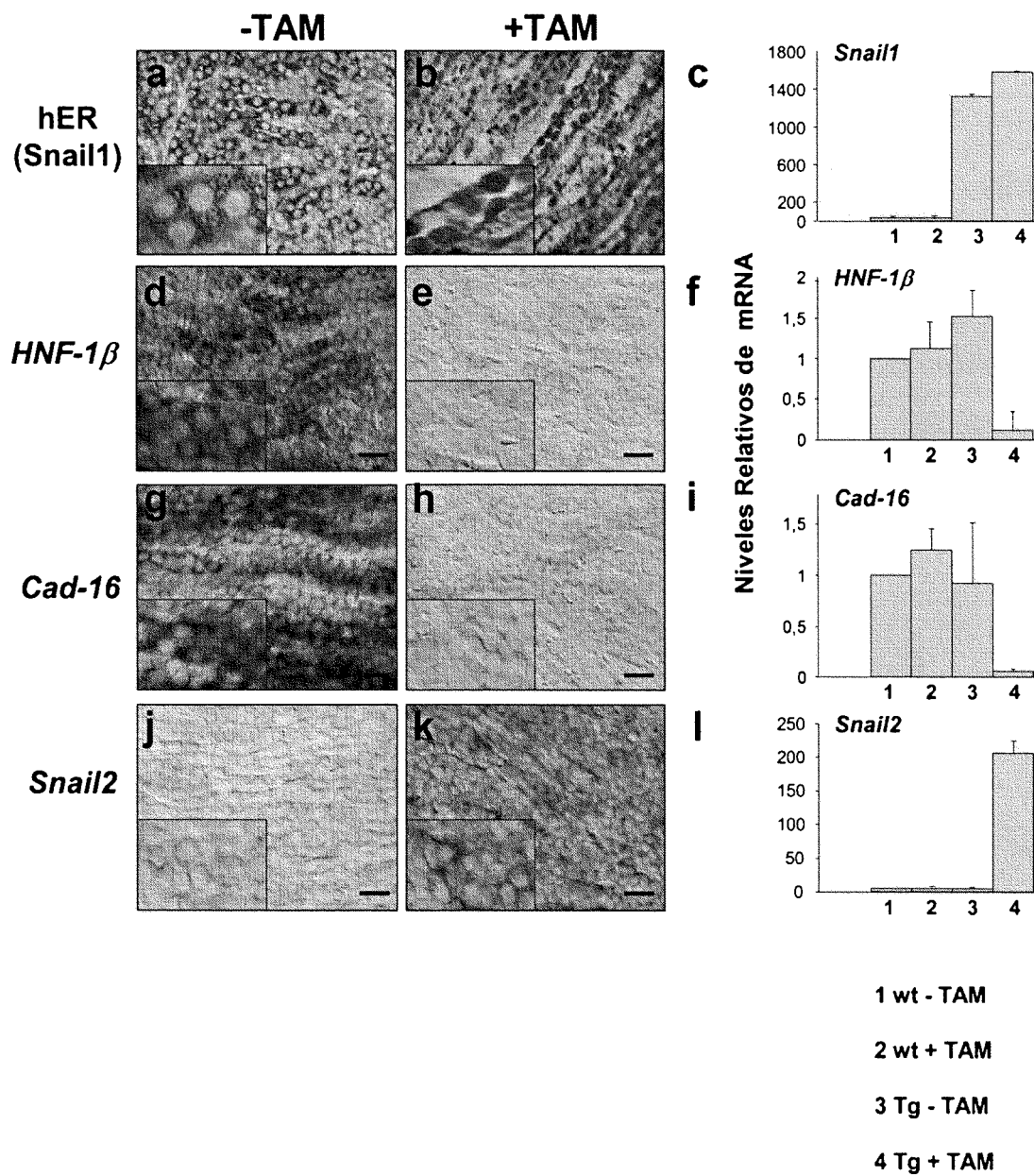


Figura 5

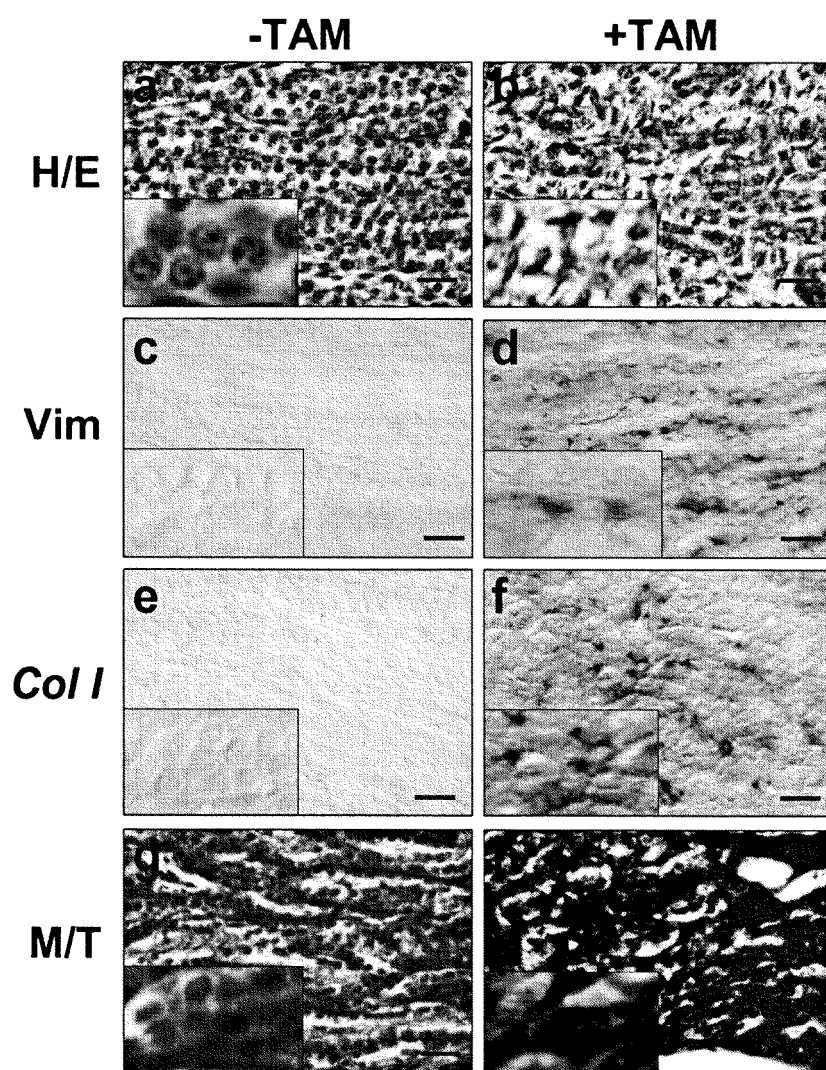


Figura 6

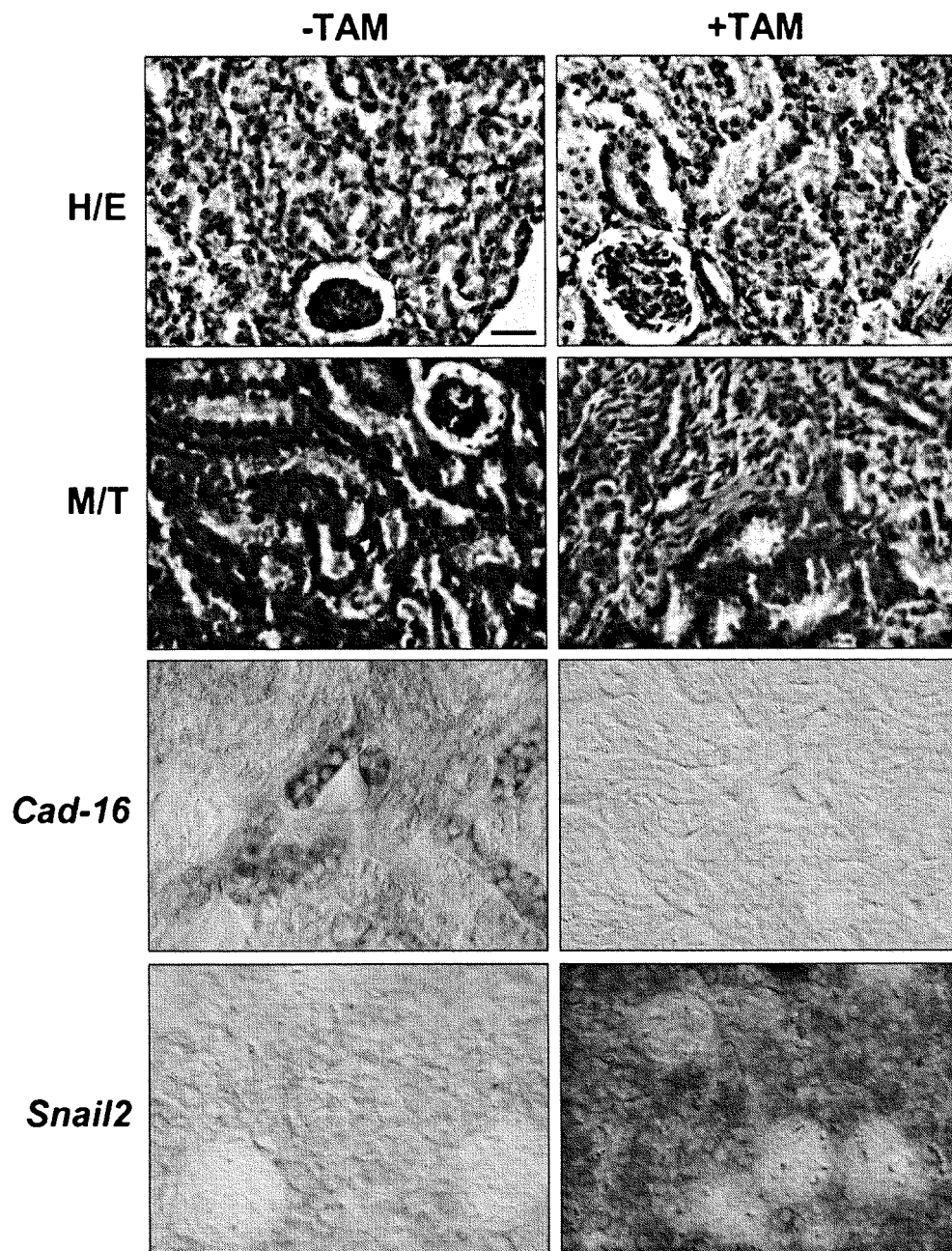


Figura 7

ES 2 310 434 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ

5 <120> UN PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN DE UN PROCESO DE FIBROSIS RENAL, USO DE LOS
COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD DE SNAIL EN LA ELABORACIÓN DE COMPO-
SICIONES FARMACÉUTICAS, PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN DE DICHOS COMPUESTOS
10 INHIBIDORES, DICHAS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y SUS APLICACIONES EN LA FI-
BROSIS RENAL

<130> Snail

<160> 11

15 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

20 <211> 1613

<212> DNA

<213> Mouse

25 <220>

<221> CDS

<222> (64)..(858)

30 <223> Secuencia codificante de Snail1 de ratón

<400> 1

cggagttgac taccgacctt ggcgcgacccg gtgacccccga ctacctaggt cgctctggcc 60

35 aac atg ccg cgc tcc ttc ctg gtc agg aag ccg tcc gac ccc cgc cgg 108
Met Pro Arg Ser Phe Leu Val Arg Lys Pro Ser Asp Pro Arg Arg
1 5 10 15

40 aag ccc aac tat agc gag ctg cag gac gcg tgt gtg gag ttc acc ttc 156
Lys Pro Asn Tyr Ser Glu Leu Gln Asp Ala Cys Val Glu Phe Thr Phe
20 25 30

45 cag cag ccc tac gac cag gcc cac ctg ctg gcc gcc atc cct ccg ccc 204
Gln Gln Pro Tyr Asp Gln Ala His Leu Leu Ala Ala Ile Pro Pro Pro
35 40 45

50 gag gtc ctc aac ccc gcc gct tcg ctg ccc acc ctc atc tgg gac tct 252
Glu Val Leu Asn Pro Ala Ala Ser Leu Pro Thr Leu Ile Trp Asp Ser
50 55 60

55 ctc ctg gta ccc caa gtg cgg ccg gtt gcc tgg gcc acc ctc ccg ctg 300
Leu Leu Val Pro Gln Val Arg Pro Val Ala Trp Ala Thr Leu Pro Leu
65 70 75

60 cgg gag agc ccc aag gcc gta gag ctg acc tcg ctg tcc gat gag gac 348
Arg Glu Ser Pro Lys Ala Val Glu Leu Thr Ser Leu Ser Asp Glu Asp
80 85 90 95

65 agt ggc aaa agc tcc cag ccg ccc agc ccg ccc tcg ccg gcg ccg tcg 396
Ser Gly Lys Ser Ser Gln Pro Pro Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Ser
100 105 110

ES 2 310 434 A1

| | | |
|----|--|------|
| | tcc ttc tcg tcc acc tcg gcc tcg tcc ctg gag gcc gag gcc ttc atc | 444 |
| | Ser Phe Ser Ser Thr Ser Ala Ser Ser Leu Glu Ala Glu Ala Phe Ile | |
| | 115 120 125 | |
| 5 | gcc ttc cct ggc ttg ggc caa ctt ccc aag cag ctg gcc agg ctc tcg | 492 |
| | Ala Phe Pro Gly Leu Gly Gln Leu Pro Lys Gln Leu Ala Arg Leu Ser | |
| | 130 135 140 | |
| 10 | gtg gcc aag gac ccc cag tcg cgg aag atc ttc aac tgc aaa tat tgt | 540 |
| | Val Ala Lys Asp Pro Gln Ser Arg Lys Ile Phe Asn Cys Lys Tyr Cys | |
| | 145 150 155 | |
| 15 | aac aag gag tac ctc agc ctg ggc gct ctg aag atg cac atc cga agc | 588 |
| | Asn Lys Glu Tyr Leu Ser Leu Gly Ala Leu Lys Met His Ile Arg Ser | |
| | 160 165 170 175 | |
| 20 | cac acg ctg cct tgt gtc tgc acg acc tgt gga aag gcc ttc tct agg | 636 |
| | His Thr Leu Pro Cys Val Cys Thr Thr Cys Gly Lys Ala Phe Ser Arg | |
| | 180 185 190 | |
| 25 | ccc tgg ctg ctt cag ggc cac gtc cgc acc cac act ggt gag aag cca | 684 |
| | Pro Trp Leu Leu Gln Gly His Val Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro | |
| | 195 200 205 | |
| 30 | ttc tcc tgc tcc cac tgc aac cgt gct ttt gct gac cgc tcc aac ctg | 732 |
| | Phe Ser Cys Ser His Cys Asn Arg Ala Phe Ala Asp Arg Ser Asn Leu | |
| | 210 215 220 | |
| 35 | cgt gcc cac ctc caa acc cac tcg gat gtg aag aga tac cag tgc cag | 780 |
| | Arg Ala His Leu Gln Thr His Ser Asp Val Lys Arg Tyr Gln Cys Gln | |
| | 225 230 235 | |
| 40 | gcc tgt gcc cga acc ttc tcc cgc atg tcc ttg ctc cac aag cac caa | 828 |
| | Ala Cys Ala Arg Thr Phe Ser Arg Met Ser Leu Leu His Lys His Gln | |
| | 240 245 250 255 | |
| 45 | gag tct ggc tgc tcc gga ggc cct cgc tga cccgtgctacc tccccatcct | 878 |
| | Glu Ser Gly Cys Ser Gly Gly Pro Arg | |
| | 260 | |
| 50 | cgtggtgcatc ttcccgaggc tcaacctctc cctcaactgcc aggactcctt ccagccttgg | 938 |
| | ttccggggacc tgtggcgctcc atgtctggac ctgggttctg cttgggtctc ttgggtggcct | 998 |
| | ttgcgcgagg tggctgatgg agtgcccttg taccgcgcca gagcctccta cccctcagta | 1058 |
| | ttcatgaggt gtagcctctg gacacagctg cttcgagcca tagaactaaa gccaaaccac | 1118 |
| 55 | tggctgggaa gcttgaaccc cgctcagggg accccacttc cctacctccc tcaaggaccc | 1178 |
| | ttcaggccac cttctttgag gtacaacaga ctatgcaata gttccccctcc cccccacccc | 1238 |
| 60 | gtccagctgt aaccatgcct cagcaggggtg gttactggac acatgtccag gtgccccctgg | 1298 |
| | gcctgggcaa ctgtttcagc ccccgcccc atttgtcctg gtgacacctg tttcacagca | 1358 |
| 65 | gtttaactgt ctcagaagg accatgaata atggccatca cttgttaggg gccaaagtggg | 1418 |
| | gtgcttcagc ctggccaatg tgtctcccag aactattttg gggcccaaca ggtggccccg | 1478 |

ES 2 310 434 A1

ggagaaagat gtttacattt taaaggtatt tatattgtaa gcagcatttt gtatagttaa 1538

tatgtacagt ttattgatat tcaataaaat ggtaattta tataactaaaa aaaaaaaaaa 1598

5 aaaaaaaaaa aaaaaa 1613

<210> 2

<211> 264

10 <212> PRT

<213> Mouse

<400> 2

15 Met Pro Arg Ser Phe Leu Val Arg Lys Pro Ser Asp Pro Arg Arg Lys
1 5 10 15

20 Pro Asn Tyr Ser Glu Leu Gln Asp Ala Cys Val Glu Phe Thr Phe Gln
20 25 30

25 Gln Pro Tyr Asp Gln Ala His Leu Leu Ala Ala Ile Pro Pro Pro Glu
35 40 45

30 Val Leu Asn Pro Ala Ala Ser Leu Pro Thr Leu Ile Trp Asp Ser Leu
50 55 60

35 Leu Val Pro Gln Val Arg Pro Val Ala Trp Ala Thr Leu Pro Leu Arg
65 70 75 80

40 Glu Ser Pro Lys Ala Val Glu Leu Thr Ser Leu Ser Asp Glu Asp Ser
85 90 95

45 Gly Lys Ser Ser Gln Pro Pro Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Ser Ser
100 105 110

50 Phe Ser Ser Thr Ser Ala Ser Ser Leu Glu Ala Glu Ala Phe Ile Ala
115 120 125

55 Phe Pro Gly Leu Gly Gln Leu Pro Lys Gln Leu Ala Arg Leu Ser Val
130 135 140

Ala Lys Asp Pro Gln Ser Arg Lys Ile Phe Asn Cys Lys Tyr Cys Asn
145 150 155 160

60 Lys Glu Tyr Leu Ser Leu Gly Ala Leu Lys Met His Ile Arg Ser His
165 170 175

65 Thr Leu Pro Cys Val Cys Thr Thr Cys Gly Lys Ala Phe Ser Arg Pro
180 185 190

ES 2 310 434 A1

Trp Leu Leu Gln Gly His Val Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe
195 200 205

5 Ser Cys Ser His Cys Asn Arg Ala Phe Ala Asp Arg Ser Asn Leu Arg
210 215 220

10 Ala His Leu Gln Thr His Ser Asp Val Lys Arg Tyr Gln Cys Gln Ala
225 230 235 240

15 Cys Ala Arg Thr Phe Ser Arg Met Ser Leu Leu His Lys His Gln Glu
245 250 255

20 Ser Gly Cys Ser Gly Gly Pro Arg
 260

<210> 3

<211> 2084

25 <212> DNA

<213> Mouse

 $\langle 220 \rangle$ 30 $\langle 221 \rangle$ CDS

$\langle 222 \rangle$ (116)..(925)

<223> Secuencia codificante de Snail2 de ratón

35 $\langle 400 \rangle$ 3

cagggagccg ggtgacttca gaggcgcctg cctgtccccc gccgcacctg agccaccgcg 60

[illegible]

45 ccg cgc tcc ttc ctg gtc aag aaa cat ttc aac gcc tcc aag aag ccc 166
Pro Arg Ser Phe Leu Val Lys Lys His Phe Asn Ala Ser Lys Lys Pro
 5 10 15

50 aac tac agc gaa ctg gac aca cac aca gtt att att tcc cca tat ctc 214
 Asn Tyr Ser Glu Leu Asp Thr His Thr Val Ile Ile Ser Pro Tyr Leu
 20 25 30

tat gaa agt tac cct ata cct gtc ata cca aaa cca gag atc ctg acc 262
Tyr Glu Ser Tyr Pro Ile Pro Val Ile Pro Lys Pro Glu Ile Leu Thr

35 40 45

60 tcg gga gca tac agc cct att act gta tgg aca tcg tcg gca gct cca 310
Ser Gly Ala Tyr Ser Pro Ile Thr Val Trp Thr Ser Ser Ala Ala Pro
50 55 60 65

ctc cac tct cct tta ccc agt ggc ctt tct cct ctt act gga tac tcc 358
Leu His Ser Pro Leu Pro Ser Gly Leu Ser Pro Leu Thr Gly Tyr Ser

65 70 75 80

ES 2 310 434 A1

| | | |
|----|---|------|
| | tca tcc ttg ggg cgt gta agt ccc ccg cct tcc tct gac act tca tcc | 406 |
| | Ser Ser Leu Gly Arg Val Ser Pro Pro Pro Ser Ser Asp Thr Ser Ser | |
| | 85 90 95 | |
| 5 | aag gat cac agt ggt tca gaa agt ccc att agt gac gaa gag gag aga | 454 |
| | Lys Asp His Ser Gly Ser Glu Ser Pro Ile Ser Asp Glu Glu Glu Arg | |
| | 100 105 110 | |
| 10 | ctg cag ccc aag ctt tca gac ccc cat gcc atc gaa gct gag aag ttt | 502 |
| | Leu Gln Pro Lys Leu Ser Asp Pro His Ala Ile Glu Ala Glu Lys Phe | |
| | 115 120 125 | |
| 15 | cag tgc aat tta tgc aat aag acc tat tct acg ttc tct ggg ctg gcc | 550 |
| | Gln Cys Asn Leu Cys Asn Lys Thr Tyr Ser Thr Phe Ser Gly Leu Ala | |
| | 130 135 140 145 | |
| 20 | aaa cac aag cag ctg cac tgt gat gcc cag tct agg aaa tcg ttc agc | 598 |
| | Lys His Lys Gln Leu His Cys Asp Ala Gln Ser Arg Lys Ser Phe Ser | |
| | 150 155 160 | |
| 25 | tgc aag tac tgt gac aag gaa tat gtg agc ctg ggt gcc ctg aag atg | 646 |
| | Cys Lys Tyr Cys Asp Lys Glu Tyr Val Ser Leu Gly Ala Leu Lys Met | |
| | 165 170 175 | |
| 30 | cac att cga acc cac aca ttg cct tgt gtc tgc aag atc tgt ggc aag | 694 |
| | His Ile Arg Thr His Thr Leu Pro Cys Val Cys Lys Ile Cys Gly Lys | |
| | 180 185 190 | |
| 35 | gct ttc tcc aga ccc tgg ctg ctt caa gga cac att aga act cac act | 742 |
| | Ala Phe Ser Arg Pro Trp Leu Leu Gln Gly His Ile Arg Thr His Thr | |
| | 195 200 205 | |
| 40 | ggg gaa aag cct ttc tct tgc cct cac tgc aat agg gct ttt gca gac | 790 |
| | Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys Pro His Cys Asn Arg Ala Phe Ala Asp | |
| | 210 215 220 225 | |
| 45 | aga tca aac ctg agg gca cat ctg cag acc cac tct gat gta aag aaa | 838 |
| | Arg Ser Asn Leu Arg Ala His Leu Gln Thr His Ser Asp Val Lys Lys | |
| | 230 235 240 | |
| 50 | tac cag tgc aaa aac tgc tcc aaa acc ttc tcc aga atg tcg ctt ctg | 886 |
| | Tyr Gln Cys Lys Asn Cys Ser Lys Thr Phe Ser Arg Met Ser Leu Leu | |
| | 245 250 255 | |
| 55 | cat aaa cat gag gag tct ggc tgc tgt gtg gca cac tga gtggcgcaac | 935 |
| | His Lys His Glu Glu Ser Gly Cys Cys Val Ala His | |
| | 260 265 | |
| 60 | cagtgttttac tcaaacagaa tgcattttctt cactccaatg acaaatgaca aatgaaagtc | 995 |
| | caaagacatt ttctcatgtg ottaccaacc aaatagtatg tataaaacca caaaagagtc | 1055 |
| 65 | acacacacac acacacacac acacacacac acacacacag agagagagag agagagagag | 1115 |
| | agagagacag acagacagac agacagatac acacacacta cagaacagaa tctatgtact | 1175 |
| 70 | taaagttaat tcgttctatg tgaagtttaa aattatatatt actgacagct agattgaaag | 1235 |
| | gataaaagat aagaatcttt ctcttttaaag atgaagtga aagcacattg catcttttct | 1295 |

ES 2 310 434 A1

tactaagaaa gaatacagag atttacactg ctgccaaacc atttcaacca aaggaacagt 1355
 atttcttctt aatagaattg taatagtgtt tccaagagga agagagtctg ccagacacta 1415
 5 tctcaggtgc cttataaagt actccaagtt tacttcttta aatgtatgat gcctggttgt 1475
 catcagtga tgcagcctt ttctggatta cctacaatgt tttaaaacta tattgttaag 1535
 10 agaaaaaaaa ccaaaaacaa gaaaaagaac agaacacaag agaatgtatt aaagtattct 1595
 tgttttattt ttgccatgtg tgccttgga gagggaggaa agacaaactt caaacattcc 1655
 15 tgggtgctgt cccatgtctt tcttttttaa aaagaatctt aatgttttat aatacaaagt 1715
 aatgaaaatg tgcaaaagaa tttcttagac attcagtaat gtacttagac ttttgaaaat 1775
 20 tcatgtgatg gatgcagtaa tacaatgcc ctccaagtgc ctgtcttaat gacttggtga 1835
 gttgatgaac tgatgtaaat ttgtgtttat ttttatacaa ctgaatgaac tctgtatgaa 1895
 agtgaggtag ggttaatagc cacgcctata ttcaaccaga atacttgtga aatcaatgtc 1955
 25 ctttttttaa aagtaacttt caaggtctct tttttacaat aaacattttt gagtaaaaaa 2015
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2075
 30 aaaaaaaaaa 2084

<210> 4

<211> 269

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 4

Met Pro Arg Ser Phe Leu Val Lys Lys His Phe Asn Ala Ser Lys Lys
 1 5 10 15
 Pro Asn Tyr Ser Glu Leu Asp Thr His Thr Val Ile Ile Ser Pro Tyr
 20 25 30
 45 Leu Tyr Glu Ser Tyr Pro Ile Pro Val Ile Pro Lys Pro Glu Ile Leu
 35 40 45
 Thr Ser Gly Ala Tyr Ser Pro Ile Thr Val Trp Thr Ser Ser Ala Ala
 50 55 60
 Pro Leu His Ser Pro Leu Pro Ser Gly Leu Ser Pro Leu Thr Gly Tyr
 65 70 75 80
 Ser Ser Ser Leu Gly Arg Val Ser Pro Pro Pro Ser Ser Asp Thr Ser
 85 90 95
 55 Ser Lys Asp His Ser Gly Ser Glu Ser Pro Ile Ser Asp Glu Glu Glu
 100 105 110
 Arg Leu Gln Pro Lys Leu Ser Asp Pro His Ala Ile Glu Ala Glu Lys
 115 120 125
 60 Phe Gln Cys Asn Leu Cys Asn Lys Thr Tyr Ser Thr Phe Ser Gly Leu
 130 135 140
 Ala Lys His Lys Gln Leu His Cys Asp Ala Gln Ser Arg Lys Ser Phe
 145 150 155 160
 Ser Cys Lys Tyr Cys Asp Lys Glu Tyr Val Ser Leu Gly Ala Leu Lys
 65 165 170 175
 Met His Ile Arg Thr His Thr Leu Pro Cys Val Cys Lys Ile Cys Gly
 180 185 190

ES 2 310 434 A1

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Lys | Ala | Phe | Ser | Arg | Pro | Trp | Leu | Leu | Gln | Gly | His | Ile | Arg | Thr | His | |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| 5 | Thr | Gly | Glu | Lys | Pro | Phe | Ser | Cys | Pro | His | Cys | Asn | Arg | Ala | Phe | Ala | |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| | Asp | Arg | Ser | Asn | Leu | Arg | Ala | His | Leu | Gln | Thr | His | Ser | Asp | Val | Lys | |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| | Lys | Tyr | Gln | Cys | Lys | Asn | Cys | Ser | Lys | Thr | Phe | Ser | Arg | Met | Ser | Leu | |
| 10 | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| | Leu | His | Lys | His | Glu | Glu | Ser | Gly | Cys | Cys | Val | Ala | His | | | | |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | | | | |
| 15 | <210> 5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> 1708 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> DNA | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <221> CDS | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <222> (71)..(865) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | <223> Secuencia codificante de Snail1 humano | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> 5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | ggcacggcct agcgagtggg tcttctgcgc tactgctgcg cgaatcggcg accccagtgc 60 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ctcgaccact atg ccg cgc tct ttc ctc gtc agg aag ccc tcc gac ccc 109 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Met Pro Arg Ser Phe Leu Val Arg Lys Pro Ser Asp Pro | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | 1 5 10 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | aat cgg aag cct aac tac agc gag ctg cag gac tct aat cca gag ttt 157 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Asn Arg Lys Pro Asn Tyr Ser Glu Leu Gln Asp Ser Asn Pro Glu Phe | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | 15 20 25 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | acc ttc cag cag ccc tac gac cag gcc cac ctg ctg gca gcc atc cca 205 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Thr Phe Gln Gln Pro Tyr Asp Gln Ala His Leu Leu Ala Ala Ile Pro | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 30 35 40 45 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 45 | cct ccg gag atc ctc aac ccc acc gcc tcg ctg cca atg ctc atc tgg 253 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Pro Pro Glu Ile Leu Asn Pro Thr Ala Ser Leu Pro Met Leu Ile Trp | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 50 55 60 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 50 | gac tct gtc ctg gcg ccc caa gcc cag cca att gcc tgg gcc tcc ctt 301 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Asp Ser Val Leu Ala Pro Gln Ala Gln Pro Ile Ala Trp Ala Ser Leu | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 65 70 75 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | cgg ctc cag gag agt ccc agg gtg gca gag ctg acc tcc ctg tca gat 349 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Arg Leu Gln Glu Ser Pro Arg Val Ala Glu Leu Thr Ser Leu Ser Asp | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 80 85 90 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 55 | gag gac agt ggg aaa ggc tcc cag ccc ccc agc cca ccc tca ccg gct 397 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Glu Asp Ser Gly Lys Gly Ser Gln Pro Pro Ser Pro Pro Ser Pro Ala | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 95 100 105 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 60 | cct tcg tcc ttc tcc tct act tca gtc tct tcc ttg gag gcc gag gcc 445 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Pro Ser Ser Phe Ser Ser Thr Ser Val Ser Ser Leu Glu Ala Glu Ala | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 110 115 120 125 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | tat gct gcc ttc cca ggc ttg ggc caa gtg ccc aag cag ctg gcc cag 493 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Tyr Ala Ala Phe Pro Gly Leu Gly Gln Val Pro Lys Gln Leu Ala Gln | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 130 135 140 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 65 | ctc tct gag gcc aag gat ctc cag gct cga aag gcc ttc aac tgc aaa 541 | | | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 310 434 A1

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|------|
| | Leu | Ser | Glu | Ala | Lys | Asp | Leu | Gln | Ala | Arg | Lys | Ala | Phe | Asn | Cys | Lys | |
| | | | | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | |
| 5 | tac | tgc | aac | aag | gaa | tac | ctc | agc | ctg | ggc | gcc | ctc | aag | atg | cac | atc | 589 |
| | Tyr | Cys | Asn | Lys | Glu | Tyr | Leu | Ser | Leu | Gly | Ala | Leu | Lys | Met | His | Ile | |
| | | | 160 | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | |
| 10 | cga | agc | cac | acg | ctg | ccc | tgc | gtc | tgc | gga | acc | tgc | ggg | aag | gcc | ttc | 637 |
| | Arg | Ser | His | Thr | Leu | Pro | Cys | Val | Cys | Gly | Thr | Cys | Gly | Lys | Ala | Phe | |
| | | | 175 | | | | 180 | | | | | | 185 | | | | |
| 15 | tct | agg | ccc | tgg | ctg | cta | caa | ggc | cat | gtc | cgg | acc | cac | act | ggc | gag | 685 |
| | Ser | Arg | Pro | Trp | Leu | Leu | Gln | Gly | His | Val | Arg | Thr | His | Thr | Gly | Glu | |
| | 190 | | | | | 195 | | | | 200 | | | | | 205 | | |
| 20 | aag | ccc | ttc | tcc | tgt | ccc | cac | tgc | agc | cgt | gcc | ttc | gct | gac | cgc | tcc | 733 |
| | Lys | Pro | Phe | Ser | Cys | Pro | His | Cys | Ser | Arg | Ala | Phe | Ala | Asp | Arg | Ser | |
| | | | | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | |
| 25 | aac | ctg | cgg | gcc | cac | ctc | cag | acc | cac | tca | gat | gtc | aag | aag | tac | cag | 781 |
| | Asn | Leu | Arg | Ala | His | Leu | Gln | Thr | His | Ser | Asp | Val | Lys | Lys | Tyr | Gln | |
| | | | | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | |
| 30 | tgc | cag | gcg | tgt | gct | cgg | acc | ttc | tcc | cga | atg | tcc | ctg | ctc | cac | aag | 829 |
| | Cys | Gln | Ala | Cys | Ala | Arg | Thr | Phe | Ser | Arg | Met | Ser | Leu | Leu | His | Lys | |
| | | | 240 | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | |
| 35 | cac | caa | gag | tcc | ggc | tgc | tca | gga | tgt | ccc | cgc | tga | ccctcgagggc | | | | 875 |
| | His | Gln | Glu | Ser | Gly | Cys | Ser | Gly | Cys | Pro | Arg | | | | | | |
| | | 255 | | | | 260 | | | | | | | | | | | |
| 40 | tcctctcttc | tctccataacc | tgccccctgcc | tgacagcctt | ccccagctcc | agcaggaagg | | | | | | | | | | | 935 |
| | acccacacatc | cttctcactg | ccatggaatt | ccctcctgag | tgccccactt | ctggccacat | | | | | | | | | | | 995 |
| | cagccccaca | ggactttgat | gaagaccatt | ttctggttct | gtgtcctctg | cctgggctct | | | | | | | | | | | 1055 |
| | ggaagaggcc | ttcccatggc | catttctgtg | gagggagggc | agctggcccc | cagccctggg | | | | | | | | | | | 1115 |
| 45 | ggattcctga | gctggcctgt | ctgcgtgggt | ttttgtatcc | agagctgttt | ggatacagct | | | | | | | | | | | 1175 |
| | gctttgagct | acaggacaaa | ggctgacaga | ctcactggga | agctcccacc | ccactcaggg | | | | | | | | | | | 1235 |
| 50 | gacccactc | ccctcacaca | caccccccca | caaggaaccc | tcaggccacc | ctccacgagg | | | | | | | | | | | 1295 |
| | tgtgactaac | tatgcaataa | tccaccccc | ggtgcagccc | cagggcctgc | ggaggcgggtg | | | | | | | | | | | 1355 |
| 55 | gcagactaga | gtctgagatg | ccccgagccc | aggcagctat | ttcagcctcc | tgtttggtgg | | | | | | | | | | | 1415 |
| | ggtggcacct | gtttcccggg | caatttaaca | atgtctgaaa | agggactgtg | agtaatggct | | | | | | | | | | | 1475 |
| 60 | gtcacttgtc | gggggccc | gtgggggtgt | ctgggtctgac | cgatgtgtct | cccagaacta | | | | | | | | | | | 1535 |
| | ttctgggggc | ccgacaggtg | ggcctgggag | gaagatgttt | acatttttaa | aggtacactg | | | | | | | | | | | 1595 |
| | gtatttatat | ttcaaacatt | ttgtatcaag | gaaacgtttt | gtatagttat | atgtacagtt | | | | | | | | | | | 1655 |
| 65 | tattgatatt | caataaagca | gttaatttat | atattaaaaa | aaaaaaaaaa | aaa | | | | | | | | | | | 1708 |

ES 2 310 434 A1

<210> 6

<211> 264

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 10 | Met | Pro | Arg | Ser | Phe | Leu | Val | Arg | Lys | Pro | Ser | Asp | Pro | Asn | Arg | Lys |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | Pro | Asn | Tyr | Ser | Glu | Leu | Gln | Asp | Ser | Asn | Pro | Glu | Phe | Thr | Phe | Gln |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| 15 | Gln | Pro | Tyr | Asp | Gln | Ala | His | Leu | Leu | Ala | Ala | Ile | Pro | Pro | Pro | Glu |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| 20 | Ile | Leu | Asn | Pro | Thr | Ala | Ser | Leu | Pro | Met | Leu | Ile | Trp | Asp | Ser | Val |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| | Leu | Ala | Pro | Gln | Ala | Gln | Pro | Ile | Ala | Trp | Ala | Ser | Leu | Arg | Leu | Gln |
| | 65 | | | | | 70 | | | | 75 | | | | | | 80 |
| 25 | Glu | Ser | Pro | Arg | Val | Ala | Glu | Leu | Thr | Ser | Leu | Ser | Asp | Glu | Asp | Ser |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| 30 | Gly | Lys | Gly | Ser | Gln | Pro | Pro | Ser | Pro | Pro | Ser | Pro | Ala | Pro | Ser | Ser |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| | Phe | Ser | Ser | Thr | Ser | Val | Ser | Ser | Leu | Glu | Ala | Glu | Ala | Tyr | Ala | Ala |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| 35 | Phe | Pro | Gly | Leu | Gly | Gln | Val | Pro | Lys | Gln | Leu | Ala | Gln | Leu | Ser | Glu |
| | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| 40 | Ala | Lys | Asp | Leu | Gln | Ala | Arg | Lys | Ala | Phe | Asn | Cys | Lys | Tyr | Cys | Asn |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| | Lys | Glu | Tyr | Leu | Ser | Leu | Gly | Ala | Leu | Lys | Met | His | Ile | Arg | Ser | His |
| | | | | 165 | | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| 45 | Thr | Leu | Pro | Cys | Val | Cys | Gly | Thr | Cys | Gly | Lys | Ala | Phe | Ser | Arg | Pro |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| | Trp | Leu | Leu | Gln | Gly | His | Val | Arg | Thr | His | Thr | Gly | Glu | Lys | Pro | Phe |
| | | 195 | | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| 50 | Ser | Cys | Pro | His | Cys | Ser | Arg | Ala | Phe | Ala | Asp | Arg | Ser | Asn | Leu | Arg |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| | Ala | His | Leu | Gln | Thr | His | Ser | Asp | Val | Lys | Lys | Tyr | Gln | Cys | Gln | Ala |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| 55 | Cys | Ala | Arg | Thr | Phe | Ser | Arg | Met | Ser | Leu | Leu | His | Lys | His | Gln | Glu |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| 60 | Ser | Gly | Cys | Ser | Gly | Cys | Pro | Arg | | | | | | | | |
| | | | | 260 | | | | | | | | | | | | |

<210> 7

<211> 2101

<212> DNA

65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 310 434 A1

<220>

<221> CDS

<222> (165)..(971)

5 <223> Secuencia codificante de Snail2 humano

<400> 7

```

10      agtttcgtaaa ggagccgggt gacttcagag gcgcgcggccc gtccgtctgc cgcacctgag      60
      cacggcccct gcccgagcct ggcccgccgc gatgctgtag ggaccgccgt gtccctccgc      120
      cggaccgtta tccgcgccgg gcgcccgcga gaccgcgtgg caag atg ccg cgc tcc      176
15                                     Met Pro Arg Ser
                                           1

      ttc ctg gtc aag aag cat ttc aac gcc tcc aaa aag cca aac tac agc      224
20      Phe Leu Val Lys Lys His Phe Asn Ala Ser Lys Lys Pro Asn Tyr Ser
      5                                     10                                     15                                     20

      gaa ctg gac aca cat aca gtg att att tcc ccg tat ctc tat gag agt      272
25      Glu Leu Asp Thr His Thr Val Ile Ile Ser Pro Tyr Leu Tyr Glu Ser
                                           25                                     30                                     35

      tac tcc atg cct gtc ata cca caa cca gag atc ctc agc tca gga gca      320
30      Tyr Ser Met Pro Val Ile Pro Gln Pro Glu Ile Leu Ser Ser Gly Ala
                                           40                                     45                                     50

      tac agc ccc atc act gtg tgg act acc gct gct cca ttc cac gcc cag      368
35      Tyr Ser Pro Ile Thr Val Trp Thr Thr Ala Ala Pro Phe His Ala Gln
      55                                     60                                     65

      cta ccc aat ggc ctc tct cct ctt tcc gga tac tcc tca tct ttg ggg      416
40      Leu Pro Asn Gly Leu Ser Pro Leu Ser Gly Tyr Ser Ser Ser Leu Gly
      70                                     75                                     80

      cga gtg agt ccc cct cct cca tct gac acc tcc tcc aag gac cac agt      464
      Arg Val Ser Pro Pro Pro Pro Ser Asp Thr Ser Ser Lys Asp His Ser
      85                                     90                                     95                                     100

      ggc tca gaa agc ccc att agt gat gaa gag gaa aga cta cag tcc aag      512
45      Gly Ser Glu Ser Pro Ile Ser Asp Glu Glu Glu Arg Leu Gln Ser Lys
      105                                     110                                     115

      ctt tca gac ccc cat gcc att gaa gct gaa aag ttt cag tgc aat tta      560
50      Leu Ser Asp Pro His Ala Ile Glu Ala Glu Lys Phe Gln Cys Asn Leu
      120                                     125                                     130

      tgc aat aag acc tat tca act ttt tct ggg ctg gcc aaa cat aag cag      608
55      Cys Asn Lys Thr Tyr Ser Thr Phe Ser Gly Leu Ala Lys His Lys Gln
      135                                     140                                     145

      ctg cac tgc gat gcc cag tct aga aaa tct ttc agc tgt aaa tac tgt      656
60      Leu His Cys Asp Ala Gln Ser Arg Lys Ser Phe Ser Cys Lys Tyr Cys
      150                                     155                                     160

      gac aag gaa tat gtg agc ctg ggc gcc ctg aag atg cat att cgg acc      704
65      Asp Lys Glu Tyr Val Ser Leu Gly Ala Leu Lys Met His Ile Arg Thr

```

ES 2 310 434 A1

| | | | | | | | | |
|----|--|-----|-----|--|-----|--|-----|------|
| | 165 | | 170 | | 175 | | 180 | |
| 5 | cac aca tta cct tgt gtt tgc aag atc tgc ggc aag gcg ttt tcc aga | | | | | | | 752 |
| | His Thr Leu Pro Cys Val Cys Lys Ile Cys Gly Lys Ala Phe Ser Arg | | | | | | | |
| | | 185 | | | 190 | | 195 | |
| 10 | ccc tgg ttg ctt caa gga cac att aga act cac acg ggg gag aag cct | | | | | | | 800 |
| | Pro Trp Leu Leu Gln Gly His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro | | | | | | | |
| | | 200 | | | 205 | | 210 | |
| 15 | ttt tct tgc cct cac tgc aac aga gca ttt gca gac agg tca aat ctg | | | | | | | 848 |
| | Phe Ser Cys Pro His Cys Asn Arg Ala Phe Ala Asp Arg Ser Asn Leu | | | | | | | |
| | | 215 | | | 220 | | 225 | |
| 20 | agg gct cat ctg cag acc cat tct gat gta aag aaa tac cag tgc aaa | | | | | | | 896 |
| | Arg Ala His Leu Gln Thr His Ser Asp Val Lys Lys Tyr Gln Cys Lys | | | | | | | |
| | | 230 | | | 235 | | 240 | |
| 25 | aac tgc tcc aaa acc ttc tcc aga atg tct ctc ctg cac aaa cat gag | | | | | | | 944 |
| | Asn Cys Ser Lys Thr Phe Ser Arg Met Ser Leu Leu His Lys His Glu | | | | | | | |
| | | 245 | | | 250 | | 255 | 260 |
| 30 | gaa tct ggc tgc tgt gta gca cac tga gtgacgcaat caatgtttac | | | | | | | 991 |
| | Glu Ser Gly Cys Cys Val Ala His | | | | | | | |
| | | 265 | | | | | | |
| 35 | tcgaacagaa tgcattttctt cactccgaag ccaaatgaca aataaagtcc aaaggcattt | | | | | | | 1051 |
| | tctcctgtgc tgaccaacca aataatatgt atagacacac acacatatgc acacacacac | | | | | | | 1111 |
| 40 | acacacaccc acagagagag agctgcaaga gcatggaatt catgtgttta aagataatcc | | | | | | | 1171 |
| | tttccatgtg aagtttaaaa ttactatata tttgctgatg gctagattga gagaataaaa | | | | | | | 1231 |
| 45 | gacagtaacc tttctcttca aagataaaat gaaaagcaca ttgcatcttt tcttcctaaa | | | | | | | 1291 |
| | aaaatgcaaa gattttacatt gctgccaaat catttcaact gaaaagaaca gtattgcttt | | | | | | | 1351 |
| 50 | gtaatagagt ctgtaatagg atttcccata ggaagagatc tgccagacgc gaactcaggt | | | | | | | 1411 |
| | gccttaaaaa gtattccaag ttactccat tacatgtcgg ttgtctgggt gccattgttg | | | | | | | 1471 |
| 55 | aactaaagcc tttttttgat tacctgtagt gctttaaagt atatttttaa aagggaggaa | | | | | | | 1531 |
| | aaaaataaca agaacaaaac acaggagaat gtattaaaag tattttttgtt ttgttttgtt | | | | | | | 1591 |
| 60 | tttgccaatt aacagtatgt gccttggggg aggagggaaa gattagcttt gaacattcct | | | | | | | 1651 |
| | ggcgcgatgct ccattgtctt actattttta aacattttta taatttttga aaattaatta | | | | | | | 1711 |
| 65 | aagatgggaa taagtgcaaa agaggattct taaaaattca ttaatgtact taaactattt | | | | | | | 1771 |
| | caaatgcata ccacaaatgc aataatacaa tacccttcc aagtgccttt ttaaattgta | | | | | | | 1831 |
| | tagttgatga gtcaatgtaa atttgtgttt atttttatat gattgaatga gttctgtatg | | | | | | | 1891 |
| | aaactgagat gttgtctata gctatgtcta taaacaacct gaagacttgt gaaatcaatg | | | | | | | 1951 |
| | tttctttttt aaaaaacaat tttcaagttt tttttacaat aaacagtttt gattttaa | | | | | | | 2011 |

ES 2 310 434 A1

ctcgttttgta tactatatttc agagacttta cttgcttcat gattagtacc aaaccactgt 2071

acaaagaatt gtttggttaac aagaaaaaaa 2101

5 <210> 8

<211> 268

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 15 | Met | Pro | Arg | Ser | Phe | Leu | Val | Lys | Lys | His | Phe | Asn | Ala | Ser | Lys | Lys |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | Pro | Asn | Tyr | Ser | Glu | Leu | Asp | Thr | His | Thr | Val | Ile | Ile | Ser | Pro | Tyr |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| 20 | Leu | Tyr | Glu | Ser | Tyr | Ser | Met | Pro | Val | Ile | Pro | Gln | Pro | Glu | Ile | Leu |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| | Ser | Ser | Gly | Ala | Tyr | Ser | Pro | Ile | Thr | Val | Trp | Thr | Thr | Ala | Ala | Pro |
| 25 | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| | Phe | His | Ala | Gln | Leu | Pro | Asn | Gly | Leu | Ser | Pro | Leu | Ser | Gly | Tyr | Ser |
| | 65 | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | | 80 |
| 30 | Ser | Ser | Leu | Gly | Arg | Val | Ser | Pro | Pro | Pro | Pro | Ser | Asp | Thr | Ser | Ser |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| | Lys | Asp | His | Ser | Gly | Ser | Glu | Ser | Pro | Ile | Ser | Asp | Glu | Glu | Glu | Arg |
| 35 | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| | Leu | Gln | Ser | Lys | Leu | Ser | Asp | Pro | His | Ala | Ile | Glu | Ala | Glu | Lys | Phe |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| 40 | Gln | Cys | Asn | Leu | Cys | Asn | Lys | Thr | Tyr | Ser | Thr | Phe | Ser | Gly | Leu | Ala |
| | | 130 | | | | | 135 | | | | | | 140 | | | |
| | Lys | His | Lys | Gln | Leu | His | Cys | Asp | Ala | Gln | Ser | Arg | Lys | Ser | Phe | Ser |
| 45 | | 145 | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| | Cys | Lys | Tyr | Cys | Asp | Lys | Glu | Tyr | Val | Ser | Leu | Gly | Ala | Leu | Lys | Met |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| 50 | His | Ile | Arg | Thr | His | Thr | Leu | Pro | Cys | Val | Cys | Lys | Ile | Cys | Gly | Lys |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| | Ala | Phe | Ser | Arg | Pro | Trp | Leu | Leu | Gln | Gly | His | Ile | Arg | Thr | His | Thr |
| 55 | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| | Gly | Glu | Lys | Pro | Phe | Ser | Cys | Pro | His | Cys | Asn | Arg | Ala | Phe | Ala | Asp |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| 60 | Arg | Ser | Asn | Leu | Arg | Ala | His | Leu | Gln | Thr | His | Ser | Asp | Val | Lys | Lys |
| | | 225 | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| | Tyr | Gln | Cys | Lys | Asn | Cys | Ser | Lys | Thr | Phe | Ser | Arg | Met | Ser | Leu | Leu |
| 65 | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |

ES 2 310 434 A1

His Lys His Glu Glu Ser Gly Cys Cys Val Ala His
 260 265

5 <210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 9
 gatgcacatc cgaagccac
 19

15 <210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

20 <220>
 <223> Oligo A

25 <400> 10
 ggtaccatct acacattcac tactaga 27
 <210> 11
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

30 <220>
 <223> Oligo B

35 <400> 11
 40 acgcgttttc caaggacgga aaaagaa 27

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 310 434

⑫ Nº de solicitud: 200600119

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 19.01.2006

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X | WO 2005039635 A2 (NOVARTIS AG) 06.05.2005, SEQ ID NO:1, reivindicaciones 17-22; SEQ ID NO 2, reivindicación 1 & Base de datos EMBL [Online], "Secuencias 1 y 2; de la patente WO2005039635"; recuperado de EBI nº de acceso CS084086, ADZ80774. | 7-10 |
| X | KALLURI R. et al. "Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis". J Clin Invest. Dic. 2003; Vol. 112, Nº 12, páginas 1776-1784. | 1-6 |
| X | PEINADO H. et al. "Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions". J Biol Chem. Jun 2003; Vol. 278, Nº 23, páginas 21113-21123. | 1-6 |
| A | WO 2004065602 A1 (UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID) 05.08.2004, ejemplo 4; reivindicaciones 1,2,7,8. | 1-10 |
| A | LIU Y. et al. "Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention". J.Am. Soc. Nephrol. Enero 2004; Vol. 15, Nº 1, páginas 1-12. | 1-10 |
| A | ZEISBERG M. et al. "The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis". JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE-JMM. Marzo 2004; Vol. 82, Nº 3, páginas 175-181. | 1-10 |
| A | CANO A. et al. "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression". Nat Cell Biol. 2000 Feb; 2(2):76-83. | 1-10 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

10.12.2008

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/45 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)