



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 310 469**

⑫ Número de solicitud: 200700619

⑮ Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**A61P 19/00** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **08.03.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.01.2009**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.01.2009**

⑰ Solicitante/s:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
c/ Serrano, 117  
28006 Madrid, ES  
Universidad Miguel Hernández**

⑱ Inventor/es: **Nieto Toledano, María Ángela;  
Álvarez de Frutos, Cristina y  
Vega, Sonia**

⑳ Agente: **No consta**

② Título: **Uso de los compuestos inhibidores de la actividad de Snail1 en la elaboración de composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de condrodisplasias, procedimiento de identificación de compuestos inhibidores, dichas composiciones farmacéuticas, procedimiento de diagnóstico condrodisplasias y sus aplicaciones.**

③ Resumen:

Uso de los compuestos inhibidores de la actividad de Snail1 en la elaboración de composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de condrodisplasias, procedimiento de identificación de compuestos inhibidores, dichas composiciones farmacéuticas, procedimiento de diagnóstico de condrodisplasias y sus aplicaciones.

La presente describe que el gen Snail1 transduce la señalización mediada por el receptor FGFR3 responsable de condrodisplasias (acondroplasia (ACH), displasia tanatófica (TD) e hipocondroplasia (HCH)), habiéndose demostrado que la simple activación aberrante de Snail1 es suficiente para reproducir un fenotipo de condrodisplasia. Igualmente, mediante experimentos de RNA de interferencia (siRNA) sobre cultivos primarios se demostró que al impedir la función de Snail1 se impide la señalización asediada por el FGFR3 en condrocitos. Esto permite identificar a Snail1 como una diana terapéutica y diagnóstico de condrodisplasias, así como el uso de sus inhibidores como fármacos para el tratamiento de dicha enfermedad.

ES 2 310 469 A1

## DESCRIPCIÓN

Uso de los compuestos inhibidores de la actividad de Snail1 en la elaboración de composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de condrodisplasias, procedimiento de identificación de compuestos inhibidores, dichas composiciones farmacéuticas, procedimiento de diagnóstico de condrodisplasias y sus aplicaciones.

## 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 las condrodisplasias relacionadas con el receptor 3 del factor de crecimiento fibroblástico (acondrodisplasias (ACH), displasias tanatofóricas (TD) e hipocondrodisplasias (HCH), en adelante denominadas genéricamente como condrodisplasias).

## Estado de la técnica

El esqueleto está formado por el cartílago y el hueso. El cartílago, a su vez, está formado por los condrocitos, mientras que el hueso está formado por los osteoblastos y los osteoclastos. Los condrocitos y los osteoblastos tienen origen mesenquimático, mientras que los osteoclastos provienen del linaje hematopoyético.

Los condrocitos tienen un papel primordial en la formación de la mayoría de los componentes esqueléticos. Además de su papel durante la osteogénesis, los condrocitos situados en la placa de crecimiento controlan el crecimiento longitudinal de los huesos. En el interior de las condensaciones mesenquimáticas, se van diferenciando gradualmente, desde condrocitos proliferativos, hasta llegar a su estadio de diferenciación final, los condrocitos hipertróficos. Esta población celular es rodeada gradualmente por matriz extracelular calcificada, que favorece la invasión de vasos sanguíneos provenientes del pericondrio. Es entonces cuando las células del pericondrio empiezan a diferenciarse a osteoblastos, y a formar la estructura mineralizada denominada collar óseo (Caplan, 1987 y St-Jacques y cols., 1999).

Después de la invasión vascular, los condrocitos hipertróficos mueren por apoptosis y los osteoblastos empiezan a depositar la matriz extracelular ósea, consistente principalmente en colágeno tipo I. Los condrocitos se ven restringidos a la placa de crecimiento, donde junto con los osteoblastos, dirigirán el crecimiento longitudinal del hueso.

En la placa de crecimiento, los miembros de la familia FGF y sus receptores, principalmente el receptor 3 (FGFR3), regulan la proliferación e inhiben el crecimiento del hueso (Karsenty y Wagner, 2002). FGFR3 se expresa en los condrocitos proliferativos. Mutaciones de ganancia de función del *Fgfr3* causan hipocondroplasia, acondroplasia y displasia tanatofórica, la variante más severa de la acondroplasia (Horton, 1997 y Heuertz y cols., 2006). La hipocondroplasia (HCH, OMIM 146000) es la forma más leve de este tipo de enanismos, causada en un 65% de los casos por la mutación N540K, en el dominio tirosina kinasa 1 del receptor (Winterpacht y cols., 2000; Bellus y cols., 1995 y Prinos y cols., 1995). La acondroplasia (ACH, OMIM 100800), debida en el 98% de los casos a la mutación G680R, en el dominio transmembrana del receptor, es la condrodisplasia más común en humanos (Naski y cols., 1998; Yamanaka y cols., 2003 y Wang y cols., 1999). La displasia tanatofórica presenta un fenotipo letal y se han descrito dos variedades según diagnóstico radiológico: de tipo I (TD I, OMIM 187600; Chen y cols., 1999 y 2001 y Legeai-Mallet y cols., 1998), y de tipo II (TD II, OMIM 187601; Iwata y cols., 2000 y 2001 y Li y cols., 1999). En todos los casos, el fenotipo de acortamiento de los huesos largos es debido a una desorganización y acortamiento de las columnas de condrocitos proliferativos, provocados por problemas en proliferación, y a la consecuente reducción de la zona de condrocitos hipertróficos, tanto en modelos animales como en humanos. Por el contrario, la inactivación de *Fgfr3* en ratón, causa un crecimiento endocondral prolongado, con el resultado de un fenotipo de "huesos largos", que va acompañado de una extensión de la zona de condrocitos proliferativos en la placa de crecimiento (Deng y cols., 1996 y Colvin y cols., 1996). Todos estos datos dan al FGFR3 un importante papel como regulador negativo de la proliferación de los condrocitos. Este papel inhibidor de la proliferación por parte de la vía FGF es único de los condrocitos (Wang y cols., 2001), y está mediado por el factor de transcripción STAT1, que aumenta la expresión del inhibidor del ciclo celular p21, responsable final de la parada de proliferación inducida por esta vía de señalización. Sus niveles pueden considerarse reflejo de la activación de la vía de señalización mediada por el FGFR3 en la placa de crecimiento.

Cuando se clonó Snail de ratón (Nieto y cols., 1992) se observó que en día 12 del desarrollo embrionario del ratón, el sitio predominante de expresión de Snail era el pre-cartílago, incluyendo los correspondientes al esclerotomo de la cola, las pre-vértebras, las costillas, las extremidades y la cabeza. Sin embargo, a partir del día 14 de desarrollo, ya no hay expresión en el pre-cartílago en ninguno de estos sitios, excepto en las falanges distales de las extremidades posteriores, que son los únicos sitios en que sigue habiendo pre-cartílago en las patas a este estadio.

Recientemente se ha descrito a Snail1 como un represor directo del colágeno tipo II (Seki y cols., 2003), característico de condrocitos proliferativos, y que desaparece cuando éstos dejan de proliferar y diferencian a condrocitos hipertróficos, población celular que expresa colágeno tipo X. En un contexto completamente independiente, se observó que la presencia de Snail atenuaba la proliferación de células epiteliales en cultivo y cursaba con un aumento en los niveles de p21 (Vega y cols., 2004).

En resumen, las condrodisplasias humanas (que cursan con retardo e irregularidad en la formación del cartílago) y los modelos murinos generados para su estudio, se han asociado con mutaciones que generan mayor actividad del FGFR3, que provoca una parada de la proliferación de las poblaciones condrocíticas patológica, impidiendo el correcto desarrollo óseo del individuo.

Las aproximaciones terapéuticas para estas condrodisplasias en humanos son varias. Una quirúrgica, muy invasiva y de larga duración (Noonan y cols., 1999), el tratamiento con hormona de crecimiento (Hertel y cols., 2005; Seino y cols., 2000) que resulta poco efectivo en la acondroplasia, agrava la desproporción entre el tronco y las extremidades y es muy costoso y la utilización del péptido natriurético CNP, inhibidor de la activación de las MAPKs mediada por los FGFs en la placa de crecimiento (Yasoda y cols., 2004) pero no rescata los defectos de proliferación de los condrocitos.

Otras estrategias persiguen disminuir la actividad tirosina kinasa del receptor con agentes químicos o bloquear con anticuerpos la unión del ligando al FGFR3 (Aveizer y cols., 2003).

## Descripción de la invención

### Descripción breve

Un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación de un proceso de condrodisplasia, en adelante procedimiento de identificación de un proceso de condrodisplasia de la invención, basado en la identificación de la presencia de Snail1 en una muestra biológica y que comprende las siguientes etapas:

a) identificación de la presencia de Snail1, en una muestra biológica de origen óseo, y

b) comparación de la presencia de Snail1 observada en a) con su ausencia en una muestra control, y donde su presencia es indicativa de la existencia de condrodisplasia.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación y evaluación de la actividad de compuestos inhibidores de la proteína Snail1 útiles para el tratamiento de la condrodisplasia, 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 Snail1 que produzca condrodisplasia con el compuesto candidato objeto de este procedimiento, e incubación en las condiciones adecuadas,

b) determinación de un parámetro indicativo del proceso de condrodisplasia, e

c) identificación de un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína Snail1 cuando se observa una disminución de dicho parámetro de condrodisplasia.

Otro objeto de la invención lo constituye un sistema biológico necesario para llevar a cabo el procedimiento de identificación de compuestos de la presente invención, preferentemente un animal transgénico, preferentemente un mamífero, y más preferentemente un primate no humano, donde la expresión de la proteína Snail1 es inducible, de forma constante o condicionada, y donde su expresión provoca condrodisplasia. Una realización particular de dicho animal mamífero no humano de la presente invención lo constituye el ratón transgénico desarrollado en la invención, el ratón transgSnail1-ER (Ejemplo 2).

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto o agente inhibidor de la actividad de la proteína Snail1, en adelante uso de un compuesto inhibidor de la presente invención, en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica útil para el tratamiento de un proceso condrodisplásico, preferentemente humano o veterinario.

Por tanto, otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de Snail1 en el que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína Snail1 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 Snail1,

b) una ribozima específica del mRNA de la proteína Snail1,

c) un aptámero específico del mRNA de la proteína Snail1,

d) un RNA de interferencia (siRNA o shRNA) específico del mRNA de la proteína Snail1, y

e) un microRNA (miRNA) específico del mRNA de la proteína Snail1.

Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento útil para el tratamiento de un proceso condrodisplásico, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente inhibidor de la proteína Snail1, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

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 un proceso condrodisplásico, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe el proceso de condrodisplasia.

### Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han observado que el gen Snail1 transduce la señalización mediada por el receptor 3 de los FGF (FGFR3) responsable de condrodisplasias. Para determinar si el gen Snail1 puede ser responsable de esta vía de señalización, se estudiaron sus patrones de expresión relativos durante el desarrollo embrionario en ratones, cuando ocurren los distintos procesos en los que están implicados durante la formación del hueso maduro en ratones sanos (Ejemplo 1). Los datos muestran que los patrones de expresión son coincidentes en estadios embrionarios ya que el pico de expresión de Snail1 aparece en la población celular que expresa FGFR3. Estos datos son compatibles con que FGFR3 induce la expresión del gen de la Snail1 *in vivo*.

Además, se estudiaron los efectos de la activación patológica de Snail1 en el desarrollo óseo en ratones transgénicos con expresión inducible del gen Snail1 (Ejemplo 2). De esta forma se ha relacionado directamente la presencia de Snail1 con la parada de proliferación de condrocitos en ratones transgénicos en los que se ha activado Snail1 de manera artificial (ratón transgénico de la presente invención, ratón transgSnail1-ER), y al mismo tiempo se ha demostrado que la simple activación aberrante de Snail1 es suficiente para reproducir un fenotipo de condrodisplasia. El desarrollo y caracterización de este modelo animal, ratón transgSnail1-ER, permite la disponibilidad de modelos animales -este proceso de transgénesis puede ser trasladado por cualquier experto al desarrollo de otros animales mamíferos incluido primates, no humanos- en los que se pueden testar y caracterizar compuestos terapéuticos para el tratamiento de procesos condrodisplásicos veterinarios o humanos, y que hasta la fecha no existían.

Así, se observó que Snail1 reprime la proliferación celular *in vivo*, lo cual induce defectos morfológicos en la placa de crecimiento de estos huesos (huesos más cortos). Estos cambios aquí descritos son reminiscentes de los observados tras la inducción experimental de condrodisplasia en ratones modificados genéticamente que expresaban versiones mutadas de FGFR3 que suponen su activación constitutiva (Chen y cols., 1999; Li y cols., 1999; Wang y cols., 1999).

Igualmente, se ha relacionado a Snail1 con la vía de señalización del FGFR3 mediante experimentos *in vitro* en cultivos primarios de condrocitos hipertróficos obtenidos a partir de hueso embrionario de ratón más tardíos, demostrando que la señalización mediada por el FGFR3 activa la expresión de Snail1 (Ejemplo 3).

Por otro lado, en muestras de pacientes con condrodisplasia, se estudió la activación del gen Snail1 (Ejemplo 4). En este sentido, en un no-nato con displasia tanatofórica se confirmó la mutación en FGFR3 responsable de esta enfermedad (forma grave de condrodisplasia y de curso siempre letal). Se observó que esta mutación en FGFR3, que produce su actividad constitutiva, provoca una activación aberrante del gen Snail1.

Finalmente, los experimentos de RNA de interferencia ("small interference", siRNA) realizados en cultivos primarios procedentes de hueso fetal de ratón, demostraron que impedir la función de Snail1 es suficiente para impedir la señalización mediada por el FGFR3 en condrocitos, revertiendo la parada de ciclo celular (medida por la expresión de p21), incluso en presencia del FGFR3 constitutivamente activo (Ejemplo 3). Por tanto Snail1 es el mediador de la parada de proliferación que se produce en respuesta a la señalización de FGFR3. 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.

Si la sola actividad de Snail en el cartílago embrionario es capaz de inducir parada de ciclo celular y acondroplasia, la presencia de Snail1 en etapas donde normalmente está reprimido podría considerarse un marcador del fenotipo acondroplásico del tipo de las asociadas al FGFR3 - acondroplasia (ACH), displasia tanatofórica (TD) e hipocondroplasia (HCH) - y, por tanto, utilizar su expresión aberrante como diagnóstico de cualquier fenotipo provocado por la ganancia de función del FGFR3. Por otro lado, si la activación de Snail1 es suficiente para inducir todas las características de las acondroplasias relacionadas con mutaciones que generan un aumento de actividad del FGFR3, es decir, que existe una relación directa -no sólo una asociación temporal- entre la actividad del gen Snail1 y la etiopatología de esta enfermedad, su inhibición, por ejemplo su inhibición génica, se convertiría en una forma de terapia anti-displásica y Snail1 podría ser de gran utilidad en la identificación de nuevos fármacos anti-condrodisplásicos. Estas aproximaciones terapéuticas se basan en el uso de compuestos o agentes inhibidores de la actividad de dicha proteína Snail1. De hecho, podrían aparecer casos de condrodisplasia de este tipo aun en ausencia de mutaciones en el FGFR3 y por la sola activación patológica de Snail1 durante el desarrollo del sistema cartílago-hueso.

La presencia aberrante de Snail1 en el cartílago embrionario (en un momento en el cual, en condiciones normales, ya no ocurre) induce acondroplasia, de forma independiente de la señal que haya inducido esta presencia patológica de Snail1. La inhibición de Snail1 por siRNA impide la parada de la proliferación de condrocitos aún en presencia de actividad constitutiva de FGFR3. Por lo tanto, la inhibición de Snail1 en la placa de crecimiento impedirá los efectos de la ganancia de función del FGFR3 inducidos por cualquier mecanismo o las acondroplasias generadas por la presencia aberrante de Snail1 independientes del FGFR3.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación de un proceso de condrodisplasia, en adelante procedimiento de identificación de un proceso de condrodisplasia de la invención, basado en la identificación de la presencia de Snail1 en una muestra biológica y que comprende las siguientes etapas:

a) identificación de la presencia de Snail1, en una muestra biológica de origen óseo, y

b) comparación de la presencia de Snail1 observada en a) con su ausencia en una muestra control, y donde su presencia es indicativa de la existencia de condrodisplasia.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “proceso de condrodisplasia” se refiere a una enfermedad con fenotipo condrodisplásico, preferentemente humana, en la que la acción biológica de Snail1 sea la causa de dicha enfermedad, ya se acompañe de una activación anómala del FGFR3 - como por ejemplo: acondrodisplasia (ACH), tanatoforia displásica (TD) e hipocondroplasia (HCH) - o no. Esta identificación de Snail1 en una muestra biológica de origen veterinario o médico de animales o sujetos humanos puede ser extraída de los mismos y posteriormente *ex vivo* identificar sobre la misma la presencia o no Snail1, que se correlacionaría con el diagnóstico de un proceso condrodisplásico en dicho sujeto, lo que permitiría la definición y la ejecución de una aproximación terapéutica, veterinaria o médica.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “gen Snail1” o “proteína Snail1” se refiere tanto al gen o proteína, de distinto origen animal, preferentemente humano, Snail1 (por ejemplo, Snail1 de ratón: SEQ ID NO1 y NO2, o humano: SEQ ID NO3, NO4, respectivamente) como al gen o proteína Snail2 (por ejemplo, Snail1 de ratón: SEQ ID NO5 y NO6, o humano: SEQ ID NO7, NO8, respectivamente), así como a cualquier secuencia de nucleótidos o de aminoácidos (aás.) análoga a éstas, 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 aminoácidos mostradas en la presente memoria, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos o aminoácidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos o aminoácidos, la adición de uno o más nucleótidos o aminoácidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos o aminoácidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que constituya una secuencia codificante o péptido con actividad similar a la secuencia de Snail1 de la invención, es decir, sea capaz de inducir condrodisplasia. Ambas proteínas Snail, Snail1 y Snail2, presentan una actividad biológica similar en los distintos modelos estudiados (cáncer, fibrosis peritoneal y fibrosis renal) por lo que los resultados obtenidos en la presente invención sobre Snail1 pueden ser trasladados a Snail2.

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 aminoácidos 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 Snail1 de a) se refiere a la forma humana de Snail1 (hSnail1 y/o hSnail2, ya sea la identificación en forma de un transcrito génico (RNAm) o de la forma proteica del gen; SEQ ID NO 3 y 4 y SEQ ID NO 7 y 8). La realización de estos análisis de identificación de los niveles de expresión de Snail1 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 y cols., 1989; Lambalez y Rossier, 2000; Egger y cols., 2000; Folz y Nepluev, 2000 y Pfaffl, 2001).

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de identificación de un proceso de condrodisplasia en el que la identificación de Snail1, ya sea hSnail1 y/o hSnail2, se lleva a cabo mediante el uso de anticuerpos específicos de la proteína Snail1, preferentemente hSnail1 y/o hSnail2. (Franci y cols., 2006). Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de identificación de un proceso de condrodisplasia en el que la identificación de Snail1 se lleva a cabo mediante hibridación *in situ* con un precursor de Snail1 (ver Figura 1).

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de identificación de un proceso de condrodisplasia en el que la identificación de Snail1 se lleva a cabo mediante RT-PCR de un precursor génico de Snail1 (Ejemplo 3, Figura 4). Este procedimiento está basado en la extracción de RNA polyA+ de una muestra biológica de origen óseo y de un tejido control y la amplificación de la secuencia codificante de Snail1 con adecuados oligonucleótidos cebadores (Boutet y cols., 2006).

## ES 2 310 469 A1

Por otro lado, este procedimiento de diagnóstico de condrodisplasia puede realizarse utilizándose a Snail1 como único marcador o de forma conjunta con otros marcadores de condrodisplasia, por ejemplo formando parte de un microarray de expresión biológica, ya sea en forma génica - a partir de RNAm- o en forma de proteína.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación y evaluación de la actividad de compuestos inhibidores de la proteína Snail1 útiles para el tratamiento de la condrodisplasia, 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 Snail1 que produzca condrodisplasia con el compuesto candidato objeto de este procedimiento, e incubación en las condiciones adecuadas,

b) determinación de un parámetro indicativo del proceso de condrodisplasia, e

c) identificación de un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína Snail1 cuando se observa una disminución de dicho parámetro de condrodisplasia.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de identificación de compuestos de la invención donde el sistema biológico del punto a) es un animal transgénico donde la expresión de la proteína Snail1 es inducible, de forma constante o condicionada, y donde su expresión provoca condrodisplasia. Una realización particular del procedimiento de identificación de compuestos de la presente invención es aquella donde el animal transgénico es el ratón transgénico de la presente invención (Ejemplo 2, ratón transgSnail1-ER).

Otro objeto de la invención lo constituye un sistema biológico necesario para llevar a cabo el procedimiento de identificación de compuestos de la presente invención, preferentemente un animal transgénico, preferentemente un mamífero, y más preferentemente un primate no humano, donde la expresión de la proteína Snail1 es inducible, de forma constante o condicionada, y donde su expresión provoca condrodisplasia. Una realización particular de dicho animal mamífero no humano de la presente invención lo constituye el ratón transgénico desarrollado en la invención, el ratón transgSnail1-ER (Ejemplo 2).

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto o agente inhibidor de la actividad de la proteína Snail1, en adelante uso de un compuesto inhibidor de la presente invención, en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica útil para el tratamiento de un proceso condrodisplásico, preferentemente humano o veterinario.

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 Snail1 (por ejemplo, SEQ ID NO2, SEQ ID NO4, SEQ ID NO6 y SEQ ID NO8), 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 (por ejemplo, SEQ ID NO1, SEQ ID NO3, SEQ ID NO5 y SEQ ID NO7), es decir, que impiden o disminuyen la transcripción del gen, la maduración del RNAm, la traducción del RNAm y la modificación post-traduccional. 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 elimine el efecto y/o la función de la proteína Snail1.

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 Snail1, o bien un polinucleótido que codifica una ribozima específica del mRNA de la proteína Snail1, o bien un polinucleótido que codifica un aptámero específico del mRNA de la proteína Snail1, bien polinucleótido que codifica un RNA de interferencia (“small interference RNA” o siRNA o un shRNA) específico del mRNA de la proteína Snail1 o bien un microRNA (miRNA).

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 óseas o de cartílago 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 y Verma, 2001) y su administración puede ser preparada por un experto en la materia en función de las necesidades y especificidades de cada caso.

Por tanto, otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de Snail1 en el que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína Snail1 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 Snail1,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína Snail1,
- 5 c) un aptámero específico del mRNA de la proteína Snail1,
- d) un RNA de interferencia (siRNA o shRNA) específico del mRNA de la proteína Snail1, y
- e) un microRNA (miRNA) específico del mRNA de la proteína Snail1.

Con anterioridad se han descrito e incluso protegido mediante patente oligonucleótidos antisentido (Patente US20060003956; Kajita y cols., 2004) y siRNAs que inhiben la expresión de Snail1 (Peinado y cols., 2005; Tripathi y cols., 2005). Cualquiera de estas secuencias de nucleótidos descritas en el estado del arte como inhibidoras de la expresión de Snail1 se incorporan como realizaciones de la presente invención como potenciales compuestos terapéuticos útiles para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de un proceso condrodisplásico. 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 liposomas, nanopartículas u otros vehiculizantes que incrementan el éxito de dicha transferencia al interior de la célula, preferentemente al núcleo celular (Lu y Woodle, 2005; Hawker y Wooley, 2005). En principio, pueden utilizarse inhibidores de la traducción del RNAm de Snail1 que se unen tanto a su región codificante como a la no codificante, por ejemplo frente a la zona 3' no codificante.

Así, una realización particular de la invención lo constituye el uso de un siRNA de d) en el que el RNAi se une preferentemente a la secuencia fragmento del RNAm de Snail gatgcacatccgaagccac (SEQ ID NO21) o a otra secuencia que comprenda a ésta o a un fragmento más corto de la misma (Patente US20060003956; el uso de los siRNA descritos en esta patente americana se incorporan como realizaciones particulares dentro del alcance de la presente patente).

Otra realización particular de la invención lo constituye el uso de un RNAi de d) en el que el siRNA está constituido por una pareja de secuencias de nucleótidos, o una mezcla de las mismas, perteneciente al siguiente grupo:

- I: 5'-CGG AAG AUC UUC AAC UGC AAA UAU U-3' (SEQ ID NO15), complementaria: 5'-AAU AUU UGC AGU UGA AGA UCU UCC G-3' (SEQ ID NO16),
- II: 5'-CAA ACC CAC UCG GAU GUG AAG AGA U-3' (SEQ ID NO17), complementaria: 5'-AUC UCU UCA CAU CCG AGU GGG UUU G-3' (SEQ ID NO18), y
- III: 5'-CAG CUG CUU CGA GCC AUA GAA CUA A-3' (SEQ ID NO19), complementaria 5'-UUA GUU CUA UGG CUC GAA GCA GCU G-3' (SEQ ID NO20).

Las parejas I y II se unen a la región codificante del RNAm de Snail1, mientras que la pareja III se une a la zona 3' no codificante). Las tres parejas de secuencias de siRNA que se indican fueron activas, siendo la imagen presentada de inhibición de los niveles de Snail1 y p21 representativa de los resultados obtenidos por cualquiera de las tres parejas de siRNAs (Figura 4h y 4j) ya sea por separado o en combinación.

Las secuencias de nucleótidos a)-e) mencionadas previamente impiden la expresión del gen en mRNA o del mRNA en la proteína Snail1, 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, 2002; Patente US20020128220; Miyake y cols., 2000; Puerta-Ferández y cols., 2003; Kikuchi y cols., 2003; Reynolds y cols., 2004).

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 útil para el tratamiento de un proceso condrodisplásico, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente inhibidor de la proteína Snail1, 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 Snail1 humana y que incluye, al menos, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína Snail1,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína Snail1,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína Snail1,

d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína Snail1, y

e) un microRNA (miRNA) específico del mRNA de la proteína Snail1.

Otra realización particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el inhibidor de Snail1 es un siRNA que se une preferentemente a la secuencia fragmento del RNAm de Snail1 gatg-cacatccgaagccac (SEQ ID NO21) o a otra secuencia que comprenda a ésta o a un fragmento más corto de la misma (Patente US20060003956; el uso de los siRNA descritos en esta patente americana se incorporan como realizaciones particulares dentro del alcance de la presente patente).

Otra realización particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el inhibidor de Snail es un RNAi constituido por una pareja de secuencias de nucleótidos, o una mezcla de las mismas, perteneciente al siguiente grupo:

- I: 5'-CGG AAG AUC UUC AAC UGC AAA UAU U-3' (SEQ ID NO15), complementaria: 5'-AAU AUU UGC AGU UGA AGA UCU UCC G-3' (SEQ ID NO16),
- II: 5'-CAA ACC CAC UCG GAU GUG AAG AGA U-3' (SEQ ID NO17), complementaria: 5'-AUC UCU UCA CAU CCG AGU GGG UUU G-3' (SEQ ID NO18), y
- III: 5'-CAG CUG CUU CGA GCC AUA GAA CUA A-3' (SEQ ID NO19), complementaria 5'-UUA GUU CUA UGG CUC GAA GCA GCU G-3' (SEQ ID NO20).

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.

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 Snail1, 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.

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 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 Faulí i Trillo, 1993.

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 un proceso condrodisplásico, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe el proceso de condrodisplasia.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en el que el proceso de condrodisplasia causado por la acción biológica de Snail1, se acompaña de una activación anómala del FGFR3, perteneciente a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: acondroplasia (ACH), tanatoforia displásica (TD) e hipocondroplasia (HCH).

Finalmente, otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en el que el proceso de condrodisplasia causado por la acción biológica de Snail1 no se acompaña de una activación anómala del FGFR3.

## Descripción de las figuras

Figura 1.- *Snail1* se expresa durante el desarrollo embrionario del hueso en las poblaciones implicadas en el crecimiento longitudinal del mismo. Imágenes de secciones de huesos embrionarios en las que se ha detectado la presencia del RNAm de Snail1 de ratón mediante la técnica de hibridación *in situ*. En los paneles superiores (a-d) se muestra la expresión endógena del gen durante el desarrollo, primero en las condensaciones mesenquimáticas y posteriormente reducido a las poblaciones de condrocitos hipertróficos. En los paneles inferiores (e-i) se compara su patrón de expresión con el de moléculas marcadoras de poblaciones celulares, observando que Snail1 se expresa en el estadio de 18,5 días post-coito (dpc) en las poblaciones hipertróficas, el pericondrio y en los osteoblastos. (j, k) detalle de la placa de crecimiento de embriones de 18,5 dpc mostrando la expresión de Snail1 y de FGFR3. En esta y en las siguientes figuras, wt, ratón salvaje; tg, ratón transgénico con activación inducible de Snail1; -TAM, sin tamoxifeno; +TAM, con tamoxifeno.



Figura 2.- *Los huesos largos de los embriones que expresan Snail1 transgénico son más cortos.* (a-d) tinción cartílago-hueso en la que se observa una reducción en la zona de cartílago (azul) a costa de las poblaciones de la placa de crecimiento en los huesos de los animales con activación de Snail1 inducida por la administración de Tamoxifeno. (e-h) secciones histológicas en las que se muestra que el acortamiento anteriormente descrito es a costa de poblaciones de condrocitos proliferativos.

Figura 3.- *La presencia de Snail1 en la placa de crecimiento inhibe la proliferación celular.* (a-d) inmunohistoquímica frente a PH3 para marcar células proliferando, dónde se puede observar una drástica disminución del número de células proliferativas en los ratones con expresión inducida de Snail1. (e-h) en estos mismos ratones, la inmunohistoquímica frente a STAT1 revela un aumento en su activación (presencia nuclear de la proteína), que viene acompañado de un aumento en los niveles de RNAm de p21 (m). También se puede observar un detalle de la co-expresión endógena de STAT1 y Snail1 en condiciones normales en el hueso de ratón (i-l).

Figura 4.- *Snail1 es suficiente y necesario para la señalización del FGFR3 en el hueso.* La activación de FGFR3 en cultivos primarios de condrocitos (a-d) de ratón induce la activación de Snail1 valorada mediante sus niveles de RNAm (e), que va acompañada de la activación de p21 (g). Este efecto se ve impedido por el tratamiento de dichos cultivos con siRNA de Snail1 (h y j). Mock, cultivos primarios transfectados con el vector vacío; wt, cultivos primarios transfectados con el FGFR3 humano normal; K644E, cultivos primarios transfectados con el FGFR3 humano con la mutación K644E, responsable de la mayoría de las displasias tanatofóricas humanas.

Figura 5.- *La mutación del FGFR3 responsable de la displasia tanatofórica en humanos activa la expresión de Snail1.* Los niveles de RNAm de Snail1 están aumentados en cartílago procedente de un feto humano tanatofórico (forma grave de la acondroplasia relacionada con la activación constitutiva del FGFR3) con respecto a uno sin problemas de desarrollo esquelético (a). El feto tanatofórico presenta la mutación descrita como constitutivamente activa de dicho receptor (b). N, muestra obtenida de un feto sin problemas óseos; T, muestra obtenida de un feto con displasia tanatofórica.

## Ejemplos de realización de la invención

### Ejemplo 1

*Snail1 se expresa durante el desarrollo embrionario del hueso en las poblaciones implicadas en el crecimiento longitudinal del mismo*

Se procedió a la detección de la presencia del RNAm de Snail1 en huesos embrionarios de ratón mediante la técnica de hibridación *in situ*. Los embriones de ratón procedieron de la cepa C57xCBA 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 huesos se disecaron a estadios comprendidos entre 12,5 dpc y 18,5 dpc respectivamente, se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS/DEPC toda la noche. A continuación se embebieron en gelatina y cortaron con un vibratomo para obtener secciones de 50  $\mu$ m. Las ISH en secciones de gelatina se realizaron como se describe en Blanco y cols., 2002 utilizando las sondas de RNA marcadas con DIG-II-UTP. Después de la hibridación, las secciones se procesaron como se ha descrito en Cano y cols., 2000.

Así, se demostró que la expresión endógena del gen Snail1 tiene lugar durante el desarrollo, primero en las condensaciones mesenquimáticas y posteriormente reducido a las poblaciones de condrocitos hipertróficos, el pericondrio y en los osteoblastos (Figura 1).

### Ejemplo 2

*Ratones transgénicos de Snail1-ER presentan alteraciones del crecimiento óseo*

Se utilizó el plásmido pcDNA3-Snail1 correspondiente a la secuencia completa del cDNA de Snail1 de ratón insertada en el plásmido pcDNA3 (Invitrogen; Cano y cols., 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 y cols., 2002).

El transgén Snail1-ER fue diseñado como fue descrito anteriormente (Locascio y cols., 2002) y se generó un ratón transgénico (ratón transgSnail1-ER) para esta construcción según los procedimientos estándares (Hogan y cols., 1994). Para este estudio, se seleccionó una línea de animales cuya expresión de la proteína transgénica fue ubicua en el embrión. 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 (Danielian y cols., 1998 y Feil y cols., 1996 y 1997). El transgén se detecta a partir del DNA procedente de la cola de los animales por PCR. 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 Blot. 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. Se realizan dos inyecciones intraperitoneales consecutivas de tamoxifeno a días 12,5 y 14,5 dpc a hembras gestantes. La dosis utilizada fue de 75  $\mu$ g/g peso de la hembra (Hayashi y McMahon, 2002).

Posteriormente, y para llevar a cabo los experimentos de tinción de cartílago-hueso los embriones disecados y los ratones post-natales del ratón transgénico transgSnail1-ER se fijaron en formalina tamponada al 10% a temperatura ambiente durante un mínimo de 2 días. Se evisceraron y se les quitó la piel. Se lavaron en agua entre 2 horas y 2 días, dependiendo del tamaño del ejemplar. Se tiñeron en una solución de azul alcian (Sigma A5268) durante 12-48 horas, para teñir los cartílagos. Después de lavar los especímenes en Etanol absoluto durante al menos dos días, se rehidrataron y se incubaron en tripsina (Sigma T4799) hasta la completa maceración del tejido. Se transfirieron a una solución de alizarina roja S (Sigma A5533) en KOH 0,5% hasta que los huesos aparecieron teñidos de rojo. Se lavaron los ejemplares en soluciones consecutivas de KOH 0,5%/glicerina 3:1, 1:1 y 1:3, y se conservaron en glicerina pura.

El estudio de los huesos de embriones de los ratones transgénicos transgSnail1-ER permitió observar que éstos eran más cortos que los no sobre-expresaban Snail1 (Figura 2), debido a una reducción en la zona de cartílago a costa de las poblaciones de condrocitos proliferativos. Además, la expresión de Snail1 se asoció a una inhibición de la proliferación de los condrocitos proliferativos y se acompañó de un aumento de la expresión de STAT1 y de p21 (Figura 3).

Para la realización de los ensayos de inmunohistoquímica se analizaron secciones de hueso. En detalle, las secciones fueron obtenidas por cortes en microtomo, se trataron durante 30 minutos en EDTA 1 mM a 100°C, con el fin de desenmascarar el antígeno. Después de retirar los restos de parafina e hidratar, se permeabilizaron durante 30 minutos en 0,5% Tritón X-100 en PBS a temperatura ambiente y, posteriormente, se bloquearon durante 1 hora en 0,1% Tween, 10% FCS en PBS. Las preparaciones se incubaron con los anticuerpos primarios en 0,1% Tween-20, 1% FCS en PBS durante 16 horas a 4°C y con los anticuerpos secundarios en 0,1% Tween-20, 1% FCS en PBS, 2 horas a temperatura ambiente. Las preparaciones se montaron con Mowiol y se conservaron protegidas de la luz a 4°C hasta su visualización en un microscopio.

Los niveles de de RNAm de p21 se analizaron mediante RT-PCR. En este sentido y en el resto de análisis de RNAm de la presente invención la PCR cuantitativa se realizó con una máquina de PCR cuantitativa ABI PRISM® 7000 siguiendo el método Syber Green°. Los niveles de expresión se calcularon según el método de la Ct, usando GAPDH como normalizador y los niveles del ratón salvaje sin ningún tratamiento ni transfección como calibrador. Para estos estudios se utilizaron las secuencias de cebadores (todas 5'-3'): *mGapdh*, CTGAGCAAGAGAGGCCCTATCC (SEQ ID NO9) y CTCCTAGGCCCTCCTGTT (SEQ ID NO10); *mP21*, AGGAGCCAGGCCAAGATGGT (SEQ ID NO11) y GCTTTGACACCCACGGTATTCA (SEQ ID NO12); *mSnail1*, CCACACTGGTGAGAAGCCATTC (SEQ ID NO13) y TCTTCACATCCGAGTGGGTTTG (SEQ ID NO14).

### Ejemplo 3

#### *Snail1 es suficiente y necesario para la señalización del FGFR3 en condrocitos*

Los cultivos primarios de condrocitos se obtuvieron a partir de hueso de las patas traseras de embriones de 14,5 dpc de animales C57 que se disecaron en medio de cultivo (a-MEM, 1% BSA, 0,1% L-Glutamina, 0,1% penicilina/estreptomicina. Al día siguiente se tripsinizaron y se trataron con collagenasa en DMEM y 10% de suero. Se cultivaron en medio (50% F-12, 50% DMEM, 10% FCS, 0,1% L-Glutamina, 0,1% penicilina/estreptomicina una densidad celular de 1,5.10<sup>6</sup> células/P100 (Woods and Beier, 2006). Después de cinco días en cultivo, se empezó la diferenciación con BMP-2 (Figura 4).

La activación de FGFR3 en cultivos primarios de condrocitos de ratón con FGF indujo la activación de Snail1 valorada mediante el incremento de sus niveles de RNAm (Figura 4e), que fue acompañada de la activación de p21 (Figura 4g). Como ejemplo de procedimiento de control de los niveles de Snail1 -y de modelo de tratamiento de un proceso condrodisplásico- se realizó un ensayo de regulación de la expresión de Snail1 mediante siRNA específicos, observándose que dichos siRNAs impidieron la expresión de Snail1 y p21 (Figura 4h y 4j). Se utilizaron tres siRNAs diferentes, dos frente a secuencias de la zona codificante y uno frente a zona 3' no codificante, a fin de asegurarnos de la especificidad de los resultados. Las secuencias de estos siRNAs son:

- I (codificante): 5'-CGG AAG AUC UUC AAC UGC AAA UAU U-3' (SEQ ID NO15), complementaria: 5'-AAU AUU UGC AGU UGA AGA UCU UCC G-3' (SEQ ID NO16),
- II (codificante): 5'-CAA ACC CAC UCG GAU GUG AAG AGA U-3' (SEQ ID NO17), complementaria: 5'-AUC UCU UCA CAU CCG AGU GGG UUU G-3' (SEQ ID NO18), y
- III (zona 3' no codificante): 5'-CAG CUG CUU CGA GCC AUA GAA CUA A-3' (SEQ ID NO19), complementaria 5'-UUA GUU CUA UGG CUC GAA GCA GCU G-3' (SEQ ID NO20).

Las tres parejas de secuencias de siRNA que se han indicado fueron activas, siendo la imagen presentada de inhibición de los niveles de Snail1 y p21 representativa de los resultados obtenidos por cualquiera de las tres parejas de siRNAs (Figura 4h y 4j) ya sea por separado o en combinación.

Ejemplo 4

*La mutación del FGFR3 responsable de la displasia tanatóforica en humanos activa la expresión de Snail1*

- 5 Los niveles de RNAm de Snail1 están aumentados en cartílago procedente de un feto humano tanatóforo (forma grave de la acondroplasia relacionada con la activación constitutiva del FGFR3) con respecto a uno sin problemas de desarrollo esquelético (Figura 5a). El feto tanatóforo presenta la mutación descrita como constitutivamente activa de dicho receptor (Figura 5b).

10 *Materiales y Métodos*

- Tinción histológica.* Las secciones se sumergieron en Hematoxilina (Harris Hematoxylin solution modified, Sigma HHS-16), durante 1 minuto, lavaron en agua del grifo, y posteriormente se sumergieron en Eosina (Eosin Y Counterstain Solution, 0,5% Aqueous, Sigma HT110-2-32), durante 30 segundos. Tras lavar en agua se deshidrataron de nuevo, se pasaron por Histoclear y se montaron con Depex (BDH Laboratoires) para ser analizadas en el microscopio óptico.

**Referencias**

- 20 - **Avizier D, Golembo M and Yayon A (2003)** FGFR3 as a therapeutic target for achondroplasia genetic short limbed dwarfism. *Curr. Drug Targets* 4(5):353-365.
- **Bellus GA, McIntosh I, Smith EA, Aylsworth AS, Kaitila I, Horton WA, Greenhaw GA, Hecht JT and Francomano CA (1995)** A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of FGFR3 causes hypochondroplasia. *Nat. Genet.* 10: 357-359.
- **Boutet A, De Frutos CA, Maxwell PH, Mayol MJ, Romero J and Nieto MA (2006)** Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J.* 25:5603-5613.
- 30 - **Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J and Nieto MA (2002)** Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*, 21:3241-3246.
- **Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo and Nieto MA (2000)** The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.*, 2:76-83.
- **Caplan, AI (1987)** Bone development and repair. *Bioessays*, 6, 171-5.
- 40 - **Chen L, Adar R, Yang X, Monson EO, Li C, Hauschka PV, Yayon A and Deng CX (1999)** Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *J. Clin. Invest.* 104(11): 1517-1525.
- **Chen L, Li C, Qiao W, Xu X, Deng C (2001)** A Ser(365)-->Cys mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in mouse downregulates Ihh/PTHrP signals and causes severe achondroplasia. *Hum Mol Genet* 10, 457-65.
- **Clarke, AR (2002)** Transgenesis Techniques. Principles and Protocols, 2ª Ed. Humana Press, Cardiff University.
- **Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM. (1996)** Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet.*, 12:390-397.
- 50 - **Danielian PS, Muccino D, Rowitch DH, Michael SK, McMahon AP (1998)** Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol.* 8(24), 1323-6.
- 55 - **Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P (1996)** Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84, 911-21.
- **Eggert A, Brodeur GM, Ikegaki N (2000)** Relative quantitative RT-PCR protocol for TrkB expression in neuroblastoma using GAPD as an internal control. *Biotechniques*; 28:681-682, 686, 688-691.
- 60 - **Faulí i Trillo C (1993)** "Tratado de Farmacia Galénica", Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.
- **Feil R, Brocard J, Mascres B, LeMeur M, D DM, Chambon P (1996)** Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10887-10890.
- 65 - **Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P (1997)** Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 237, 752-757.

- **Franci C, Takkunen M, Dave N, Alameda F, Gomez S, Rodriguez R et al** (2006) Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene*, 25:5134-5144.
- **Folz RJ and Nepluev I** (2000) Poly(A) cDNA-specific (PACS) RT-PCR: a quantitative method for the measurement of any poly(A)-containing mRNA not affected by contaminating genomic DNA. *Biotechniques*, 29, 762, 764-5, 766-8.
- **Hawker CJ and Wooley KL** (2005) *Science* 19 (309): 1200-5.
- **Hayashi S and McMahon AP** (2002) Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol*, 244, 305-18.
- **Hertel NT et al** (2005) Growth hormone treatment in 35 prepubertal children with achondroplasia: a five-year dose-response trial. *Acta Paediatr*. 94(10):1402-1410.
- **Heuertz S, Le Merrer M, Zabel B, Wright M, Legeai-Mallet L, Cormier-Daire V, Gibbs L and Bonaventure J** (2006) Novel FGFR3 mutations creating Cys residues in the extracellular domain of the receptor cause achondroplasia or severe forms of hypochondroplasia. *Eur. J. Hum. Genet*. 14(12):1240-1247.
- **Hogan B, Beddington R, Constantini F, Lacy E** (1994) "Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual". (Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- **Horton WA** (1997) FGFR3 and the human chondrodysplasias. *Curr. Opin. Pediatr*. 9(4):437-442.
- **Horton WA** (2006) Recent milestones in achondroplasia research. *Am. J. Med. Res.* 140A:166-169.
- **Iwata T, Chen L, Li C, Ovchinnikov DA, Behringer RR, Francomano CA, Deng CX** (2000) A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos. *Hum Mol Genet* 9, 1603-13.
- **Iwata T, Li C, Deng CX and Francomano CA** (2001) Highly activated Fgfr3 with the K644M mutation causes prolonged survival in severe dwarf mice. *Human. Mol. Genet.* (10) 12:1255-1264.
- **Kajita M, McClinic KN, Wade PA** (2004) Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol*. 24(17): 7559-66.
- **Karsenty, G. and Wagner, E. F.** 2002. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell*, 2, 389-406.
- **Kikuchi K, Umehara T, Fukuda K, Hwang J, Kuno A, Hasegawa T and Nishikawa S** (2003) RNA aptamers targeted to domain II of Hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. *J. Biochem.* 133, 263-270.
- **Lambole B and Rossier J** (2000) Quantitative RT-PCR. *Nat Biotechnol*, 18, 5.
- **Legeai-Mallet L, Benoist-Lasselin C, Delezoide AL, Munnich A and Bonaventure J** (1998) FGFR3 mutations promote apoptosis but do not alter chondrocyte proliferation in TD. *JBC* 273, 13007-13014.
- **Li C, Chen L, Iwata T, Kitagawa M, Fu XY, Deng CX** (1999) A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarfism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors. *Hum Mol Genet* 8, 35-44.
- **Locascio A, Vega S, de Frutos CA, Manzanares M, Nieto MA** (2002) Biological potential of a functional human SNAIL retrogene. *J Biol Chem* 277, 38803-9.
- **Lu PV and Woodle MC.** *In vivo* application of RNA interference: from functional genomics to therapeutics. (2005) *Adv Genet* 54: 117-42.
- **Miyake H, Chi and Gleave ME** (2000) Antisense TRPM-2 oligodeoxynucleotides chemosensitize human androgen-independent PC-3 prostate cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res*, 6, 1655-63.
- **Naski MC, Colvin JS, Coffin JD, Ornitz DM** (1998) Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development*, 125:4977-88.
- **Noonan KJ, Leyes M, Forriol F, Canadell J.** (1998) Distraction osteogenesis of the lower extremity with use of monolateral external fixation. A study of two hundred and sixty-one femora and tibiae. *J Bone Joint Surg Am.* 80:793-806.

- **Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, Csiszar K, Fong KS, Vega S, Nieto MA, Cano A, Portillo F** (2005) A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J.* 24(19): 3446-58.

5 - **Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucle Acids Res.* 29, e45.

- **Pfeifer A, Verma IM** (2001) Gene therapy: promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2: 177-211.

10 - **Puerta-Ferández E et al.** (2003) Ribozymes: recent advances in the development of RNA tools. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 75-97.

- **Prinos P, Costa T, Sommer A, Kilpatrick MW and Tsipouras P** (1995) A common FGFR3 gene mutation in hypochondroplasia. *Hum. Mol. Genet.* 4(11):2097-2101.

15 - **Ramaswami U, Hindmarsh PC and Brook CG** (1999) Growth hormone in hypochondroplasia. *Acta Paediatr. Suppl.* 88:116-117.

20 - **Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS and Khvorova A** (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* 22 (3): 326-330.

- **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

25 - **Seino Y, Yamanaka Y, Shinohara M, Ikegami S, Koike M, Miyazawa M, Inoue M, Morizake T and Tanaka H** (2000) Growth hormone therapy in achondroplasia. *Horm. Res.* 53 Suppl 3:53-56.

30 - **Seki, K., Fujimori, T., Savagner, P., Hata, A., Aikawa, T., Ogata, N., Nabeshima, Y. and Kaechoong, L.** 2003. Mouse Snail family transcription repressors regulate chondrocyte, extracellular matrix, type II collagen, and aggrecan. *J Biol Chem*, 278, 41862-70.

- **St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP** (1999) Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13, 2072-86.

35 - **Tripathi MK, Misra S, Chaudhuri G** (2005) Negative regulation of the expressions of cytokeratins 8 and 19 by SLUG repressor protein in human breast cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 329(2): 508-15.

- **Vega S, Morales AV, Ocaña O, Valdés F, Fabregat I and Nieto MA.** (2004) Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 118:1131-1143.

40 - **Wang Y, Spatz MK, Kannan K, Hayk H, Avivi A, Gorivodsky M, Pines M, Yayon A, Lonai P and Givol D** (1999) A mouse model for acondroplasia produced by targeting FGFR3. *PNAS* 96(8):4455-4460.

45 - **Winterpacht A, Hilbert K, Stelzer C, Schweikardt T, Decaer H, Segerer H, Spranger J and Zabel B** (2000) *Physiol. Genomics* 2(1):9-12.

- **Yamanaka Y, Ueda K, Seino Y and Tanaka H** (2003) Molecular basis for the treatment of achondroplasia. *Horm. Res.* 60 Suppl 3: 60-64.

50 - **Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, Kurihara T, Rogi T, Tanaka S, Suda M, Tamura N, Ogawa Y and Nakao K.** (2004) Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med.* 10 (1):80-86.

55 - Patente US20020128220, Materials and methods for the derepression of the E-cadherin promoter.

# REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de identificación de un proceso de condrodisplasia **caracterizado** porque se basa en la identificación de la sobreexpresión de Snail1 en una muestra biológica y porque comprende las siguientes etapas:
  - a) identificación de la presencia de Snail1, en una muestra biológica de origen óseo de un mamífero, preferentemente un ser humano, y
  - b) comparación de la cantidad de Snail1 observada en a) con la cantidad en una muestra control, y donde su incremento es indicativo de la existencia de condrodisplasia.
2. Procedimiento de identificación según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el proceso de condrodisplasia es una enfermedad con fenotipo condrodisplásico en la que la acción biológica de Snail1 sea la causa de dicha enfermedad, ya se acompañe de una activación anómala del FGFR3 o no.
3. Procedimiento de identificación según la reivindicación 2 **caracterizado** porque la enfermedad pertenece al siguiente grupo: acondroplasia (ACH), tanatoforia displásica (TD) e hipocondroplasia (HCH).
4. Procedimiento de identificación según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la identificación de Snail1 se refiere tanto al gen o proteína, de distinto origen animal, preferentemente humano, Snail1 y Snail2.
5. Procedimiento de identificación según la reivindicación 4 **caracterizado** porque Snail1 es el gen o proteína Snail1 de ratón de secuencia SEQ ID NO1 y NO2, respectivamente.
6. Procedimiento de identificación según la reivindicación 4 **caracterizado** porque Snail1 es el gen o proteína Snail1 humana de secuencia SEQ ID NO3 y NO4, respectivamente.
7. Procedimiento de identificación según la reivindicación 4 **caracterizado** porque Snail1 es el gen o proteína Snail2 de ratón de secuencia NO5 y NO 6, respectivamente.
8. Procedimiento de identificación según la reivindicación 4 **caracterizado** porque Snail1 es el gen o proteína Snail2 humana de secuencia SEQ ID NO7 y NO8, respectivamente.
9. Procedimiento de identificación según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la identificación de Snail1 de a) se refiere a la forma humana de Snail1, ya sea hSnail1 y/o hSnail2, ya sea la identificación en forma de un transcrito génico (RNAm) o de la forma proteica del gen, de secuencias SEQ ID NO 3 y 4 y SEQ ID NO 7 y 8, respectivamente.
10. Procedimiento de identificación según la reivindicación 9 **caracterizado** porque la identificación de Snail1, ya sea hSnail1 y/o hSnail2, se lleva a cabo mediante el uso de anticuerpos específicos, ya sean monoclonales o policlonales, de la proteína hSnail1 y/o hSnail2.
11. Procedimiento de identificación según la reivindicación 9 **caracterizado** porque la identificación de Snail1, ya sea hSnail1 y/o hSnail2, se lleva a cabo mediante hibridación *in situ* con un precursor de dichos genes.
12. Procedimiento de identificación según la reivindicación 9 **caracterizado** porque la identificación de Snail1, ya sea hSnail1 y/o hSnail2, se lleva a cabo mediante RT-PCR de un precursor génico de dichos genes.
13. Procedimiento de identificación y evaluación de la actividad de compuestos inhibidores de la proteína Snail1 útiles para el tratamiento de la condrodisplasia **caracterizado** porque comprende los siguientes pasos:
  - a) Puesta en contacto de un sistema biológico donde exista una expresión de Snail1 que produzca condrodisplasia con el compuesto candidato objeto de este procedimiento, e incubación en las condiciones adecuadas,
  - b) determinación de un parámetro indicativo del proceso de condrodisplasia, e
  - c) identificación de un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína Snail1 cuando se observa una disminución de dicho parámetro de condrodisplasia.
14. Procedimiento de identificación y evaluación según la reivindicación 13 **caracterizado** porque el sistema biológico de a) es un animal transgénico, preferentemente un mamífero, y, más preferentemente, un primate no humano, donde la expresión de la proteína Snail1 es inducible, de forma constante o condicionada, y donde su expresión provoca condrodisplasia.
15. Procedimiento de identificación y evaluación según la reivindicación 14 **caracterizado** porque el animal transgénico utilizado es el ratón transgénico transSnail1-ER.

16. Sistema biológico necesario para llevar a cabo el procedimiento de identificación y evaluación según las reivindicaciones 13 a la 15 **caracterizado** porque es un animal transgénico preferentemente un mamífero, y, más preferentemente, un primate no humano, donde la expresión de la proteína Snail1 es inducible, de forma constante o condicionada, y donde su expresión provoca condrodisplasia.

17. Sistema biológico según la reivindicación 16 **caracterizado** porque dicho animal mamífero no humano lo constituye el ratón transgénico transgSnail1-ER.

18. Uso de un compuesto o agente inhibidor de la actividad de la proteína Snail1 en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica útil para el tratamiento de un proceso condrodisplásico, preferentemente humano o veterinario, **caracterizado** porque es un ácido nucleico o polinucleótido 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 Snail1,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína Snail1,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína Snail1,
- d) un RNA de interferencia (siRNA o shRNA) específico del mRNA de la proteína Snail1, y
- e) un microRNA (miRNA) específico del mRNA de la proteína Snail1.

19. Uso de un compuesto según la reivindicación 18 caracterizado porque el siRNA de d) es un RNAi que se une preferentemente a la secuencia fragmento del RNAm de Snail gatgcacatccgaagccac (SEQ ID NO21) o a otra secuencia que comprenda a ésta o a un fragmento más corto de la misma.

20. Uso de un compuesto según la reivindicación 18 caracterizado porque el RNAi de d) es un siRNA constituido por una pareja de secuencias de nucleótidos, o una mezcla de las mismas, perteneciente al siguiente grupo:

- I: 5'-CGG AAG AUC UUC AAC UGC AAA UAU U-3' (SEQ ID NO15), complementaria: 5'-AAU AUU UGC AGU UGA AGA UCU UCC G-3' (SEQ ID NO16),
- II: 5'-CAA ACC CAC UCG GAU GUG AAG AGA U-3' (SEQ ID NO17), complementaria: 5'-AUC UCU UCA CAU CCG AGU GGG UUU G-3' (SEQ ID NO18), y
- III: 5'-CAG CUG CUU CGA GCC AUA GAA CUA A-3' (SEQ ID NO19), complementaria 5'-UUA GUU CUA UGG CUC GAA GCA GCU G-3' (SEQ ID NO20).

21. Composición farmacéutica o medicamento útil para el tratamiento de un proceso condrodisplásico **caracterizada** porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína Snail humana y que incluye, al menos, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína Snail1,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína Snail1,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína Snail1,
- d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína Snail1, y
- e) un microRNA (miRNA) específico del mRNA de la proteína Snail1,

junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

22. Composición farmacéutica según la reivindicación 21 **caracterizada** porque el siRNA de d) se une preferentemente a la secuencia fragmento del RNAm de Snail gatgcacatccgaagccac (SEQ ID NO21) o a otra secuencia que comprenda a ésta o a un fragmento más corto de la misma.

23. Composición farmacéutica según la reivindicación 21 **caracterizada** porque el siRNA de d) es un RNAi constituido por una pareja de secuencias de nucleótidos, o una mezcla de las mismas, perteneciente al siguiente grupo:

- I: 5'-CGG AAG AUC UUC AAC UGC AAA UAU U-3' (SEQ ID NO15), complementaria: 5'-AAU AUU UGC AGU UGA AGA UCU UCC G-3' (SEQ ID NO16),
- II: 5'-CAA ACC CAC UCG GAU GUG AAG AGA U-3' (SEQ ID NO17), complementaria: 5'-AUC UCU UCA CAU CCG AGU GGG UUU G-3' (SEQ ID NO18), y

## ES 2 310 469 A1

- III: 5'-CAG CUG CUU CGA GCC AUA GAA CUA A-3' (SEQ ID NO19), complementaria 5'-UUA GUU CUA UGG CUC GAA GCA GCU G-3' (SEQ ID NO20).

24. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un proceso condrodisplásico en un mamífero.

25. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 24 en la que el mamífero es un humano.

26. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 24 y 25 en el que el proceso condrodisplásico causado por la acción biológica de Snail1 se acompaña de una activación anómala del FGFR3, y se selecciona de la lista que comprende: acondroplasia (ACH), tanatoforia displásica (TD) e hipocondroplasia (HCH).

27. Uso de la composición farmacéutica según la cualquiera de las reivindicaciones 24 y 25 **caracterizado** porque el proceso condrodisplásico causado por la acción biológica de Snail1 no se acompaña de una activación anómala del FGFR3.

20

25

30

35

40

45

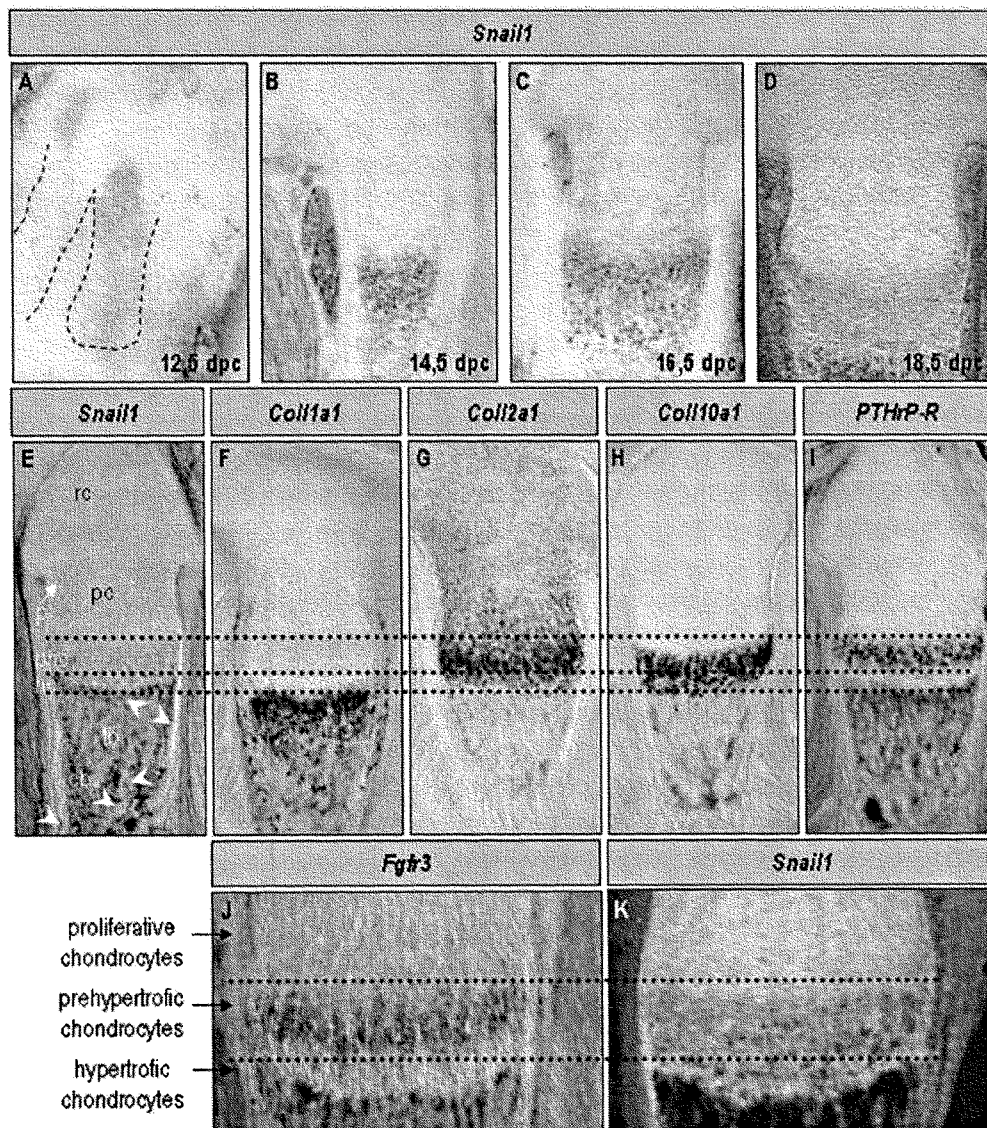
50

55

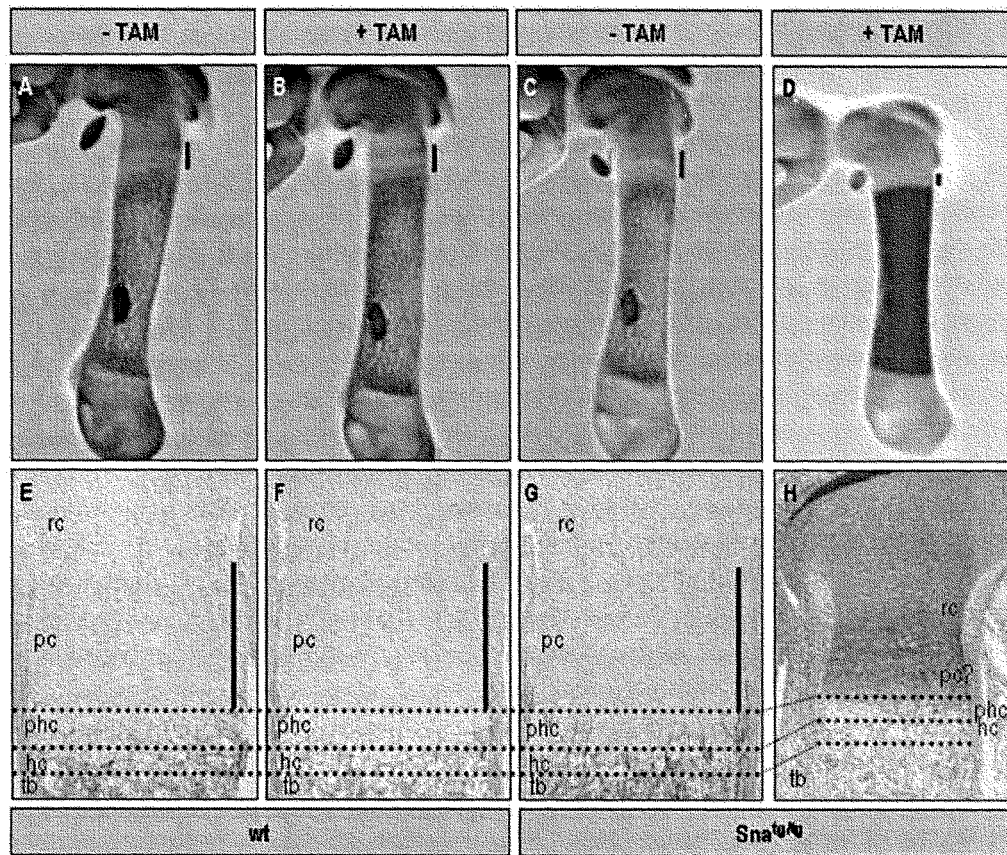
60

65

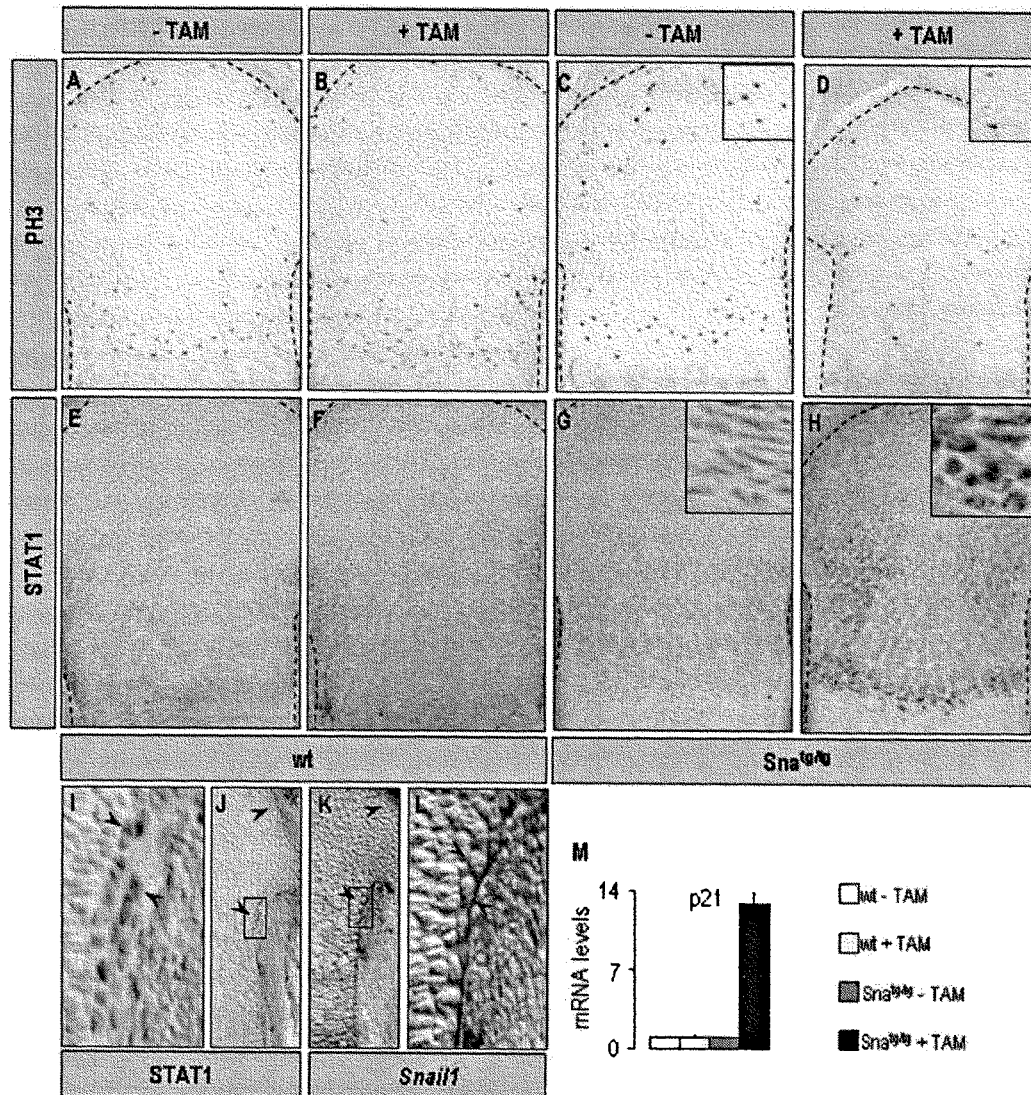




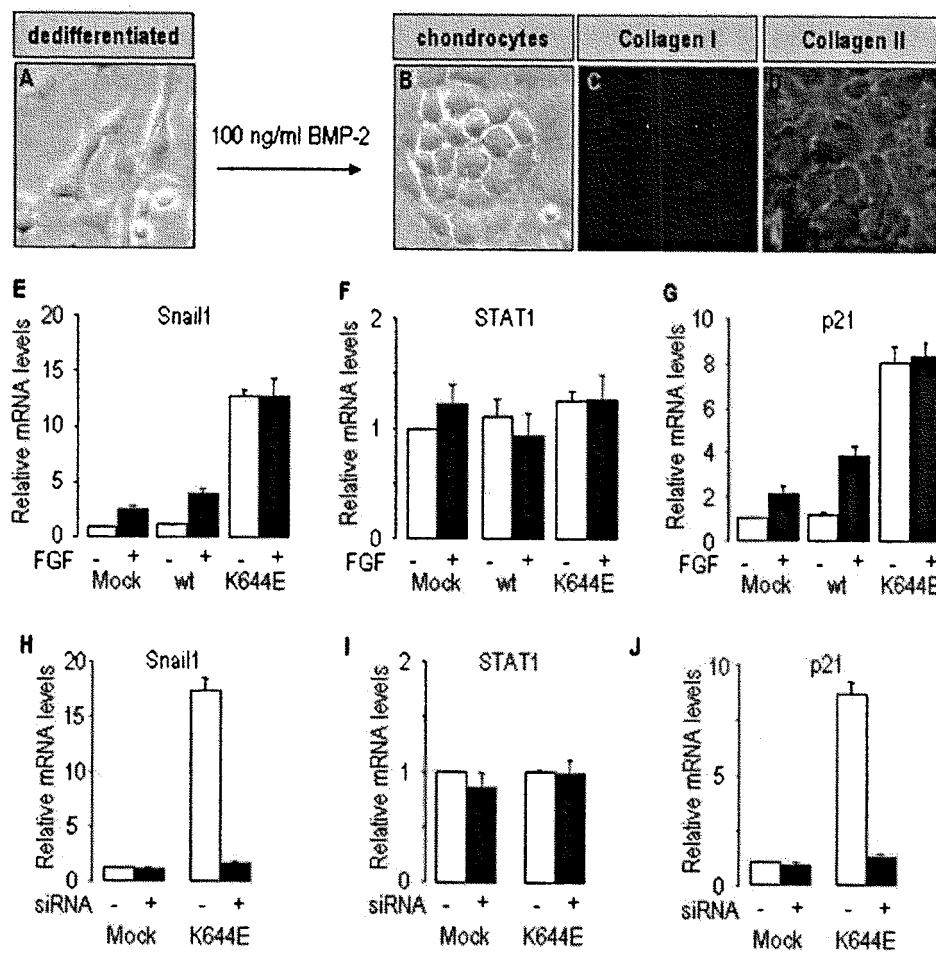
**Figura 1**



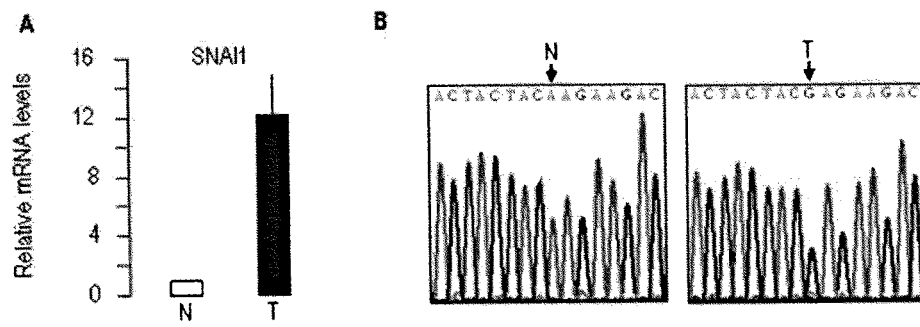
**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 5**

# ES 2 310 469 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

5 <120> USO DE LOS COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD DE SNAIL1 EN LA ELABORACIÓN  
DE COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO DE CONDRODISPLASIAS, PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS INHIBIDORES, DICHAS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS, PROCEDIMIENTO DE DIAGNÓSTICO DE CONDRODISPLASIAS Y  
10 SUS APLICACIONES

<130> SnailCondrod

15 <160> 21

<170> PatentIn version 3.3

20 <210> 1  
<211> 1613  
<212> DNA  
<213> Mouse

25 <220>  
<221> CDS  
<222> (64)..(858)

30 <223> Secuencia codificante de Snail1 de ratón

<400> 1

35 cggagttgac taccgacctt gcgcgacccg gtgaccccga ctacctaggt cgctctggcc 60

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 2 310 469 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 cctgctacc tccccatcct	878
	Glu Ser Gly Cys Ser Gly Gly Pro Arg	
	260	
50	cgctggcacc tccccggagc tcaccctcct cctcaactgcc aggaactcctt ccagccttgg	938
	tccggggacc tgtggcgctcc atgtctggac ctggttcctg cttggctctc ttggtggcct	998
55	ttgcgcgagg tggtgatgg agtgcccttg taccgcccc gagcctccta ccctcagta	1058
	ttcatgaggt gtagcctctg gacacagctg cttcgagcca tagaactaaa gccaaccac	1118
	tggtctgggaa gcttgaacct cgtcagggg accccacttc cctacctccc tcaaggacct	1178
	ttcaggccac cttctttgag gtacaacaga ctatgcaata gttccccctcc cccccaccc	1238
60	gtccagctgt aacctgcct cagcaggggtg gttactggac acatgtccag gtgcccctgg	1298
	gcctgggcaa ctgtttcagc ccccgccccc atttgtcctg gtgacacctg tttcacagca	1358
	gtttaactgt ctcagaaggg accatgaata atggccatca cttgttaggg gccaaagtggg	1418
65	gtgcttcagc ctggccaatg tgtctcccag aactatcttg gggcccaaca ggtggccccg	1478

# ES 2 310 469 A1

```

ggagaaagat gtttacattt taaaggtatt tatattgtaa gcagcatttt gtatagttaa 1538
tatgtacagt ttattgatat tcaataaaaat ggtaattta tataactaaaa aaaaaaaaaa 1598
5 aaaaaaaaaa aaaaaa 1613

<210> 2
10 <211> 264
    <212> PRT
    <213> Mouse

15 <400> 2
    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
60 Ala Lys Asp Pro Gln Ser Arg Lys Ile Phe Asn Cys Lys Tyr Cys Asn
    145          150          155          160
65 Lys Glu Tyr Leu Ser Leu Gly Ala Leu Lys Met His Ile Arg Ser His
    165          170          175
70 Thr Leu Pro Cys Val Cys Thr Thr Cys Gly Lys Ala Phe Ser Arg Pro
    180          185          190

```



# ES 2 310 469 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> 1708

25

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

30

<221> CDS

<222> (71)..(865)

<223> Secuencia codificante de Snail humano

35

<400> 3

ggcacggcct agcgagtgggt tcttctgcgc tactgctgcg cgaatcggcg accccagtgc 60

40

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  
1 5 10

45

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  
15 20 25

50

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

55

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

60

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

65

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

# ES 2 310 469 A1

	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	
5	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	
10	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	
15	ctc tct gag gcc aag gat ctc cag gct cga aag gcc ttc aac tgc aaa	541
	Leu Ser Glu Ala Lys Asp Leu Gln Ala Arg Lys Ala Phe Asn Cys Lys	
	145 150 155	
20	tac tgc aac aag gaa tac ctc agc ctg ggt 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	
25	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	
30	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	
35	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	
40	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	
45	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	
50	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	
55	tcctctctcc tctccatacc tgccccctgcc tgacagcctt cccagctcc agcaggaagg	935
	acccacatc cttctcactg ccatggaatt ccctcctgag tgccccactt ctggccacat	995
60	cagccccaca ggactttgat gaagaccatt ttctggttct gtgtcctctg cctgggctct	1055
	ggaagaggcc ttcccatggc catttctgtg gagggagggc agctggcccc cagccctggg	1115
	ggattcctga gctggcctgt ctgcgtgggt ttttgtatcc agagctgttt ggatacagct	1175
65	gctttgagct acaggacaaa ggctgacaga ctactggga agctcccacc ccaactcaggg	1235
	gacccactc ccctcacaca cccccccca caaggaaccc tcaggccacc ctccacgagg	1295
	tgtgactaac tatgcaataa tccaccccca ggtgcagccc cagggcctgc ggaggcggtg	1355

# ES 2 310 469 A1

gcagactaga gtctgagatg ccccagagccc aggcagctat ttcagcctcc tgtttggtgg 1415  
 ggtggcacct gtttcccggg caatttaaca atgtctgaaa agggactgtg agtaatggct 1475  
 5 gtcacttgtc gggggcccaa gtggggtgct ctggctctgac cgatgtgtct cccagaacta 1535  
 ttctgggggc ccgacaggtg ggcctgggag gaagatgttt acatttttaa aggtacactg 1595  
 10 gtatttatat ttcaaacatt ttgtatcaag gaaacgtttt gtatagttat atgtacagtt 1655  
 tattgatatt caataaagca gttaatttat atattaaaaa aaaaaaaaaa aaa 1708

15 <210> 4

<211> 264

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

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

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

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

45 Leu Ala Pro Gln Ala Gln Pro Ile Ala Trp Ala Ser Leu Arg Leu Gln  
 65 70 75 80

50 Glu Ser Pro Arg Val Ala Glu Leu Thr Ser Leu Ser Asp Glu Asp Ser  
 85 90 95

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

60 Phe Ser Ser Thr Ser Val Ser Ser Leu Glu Ala Glu Ala Tyr Ala Ala  
 115 120 125

65 Phe Pro Gly Leu Gly Gln Val Pro Lys Gln Leu Ala Gln Leu Ser Glu  
 130 135 140

Ala Lys Asp Leu Gln Ala Arg Lys Ala Phe Asn Cys Lys Tyr Cys Asn  
 145 150 155 160

# ES 2 310 469 A1

Lys Glu Tyr Leu Ser Leu Gly Ala Leu Lys Met His Ile Arg Ser His  
 165 170 175  
 5 Thr Leu Pro Cys Val Cys Gly Thr Cys Gly Lys Ala Phe Ser Arg Pro  
 180 185 190  
 10 Trp Leu Leu Gln Gly His Val Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe  
 195 200 205  
 15 Ser Cys Pro His Cys Ser Arg Ala Phe Ala Asp Arg Ser Asn Leu Arg  
 210 215 220  
 20 Ala His Leu Gln Thr His Ser Asp Val Lys Lys Tyr Gln Cys Gln Ala  
 225 230 235 240  
 25 Cys Ala Arg Thr Phe Ser Arg Met Ser Leu Leu His Lys His Gln Glu  
 245 250 255  
 Ser Gly Cys Ser Gly Cys Pro Arg  
 260  
 30 <210> 5  
 <211> 2084  
 <212> DNA  
 35 <213> Mouse  
 <220>  
 <221> CDS  
 40 <222> (116)..(925)  
 <223> Secuencia codificante de Snai12 de ratón  
 <400> 5  
 45 cagggagccg ggtgacttca gaggcgcctg cctgtccccc gccgcacctg agccaccgcg 60  
 atgctatagg accgccgcct ggaccgttat ccgcccgcgc ccgcccgcag ccacc atg 118  
 Met  
 50 1  
 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  
 55 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  
 60 tat gaa agt tac cct ata cct gtc ata cca aaa cca gag atc ctc acc 262  
 Tyr Glu Ser Tyr Pro Ile Pro Val Ile Pro Lys Pro Glu Ile Leu Thr  
 35 40 45  
 65 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

# ES 2 310 469 A1

	50		55		60		65	
5	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							
		70			75		80	
10	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	
15	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	
20	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	
25	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
30	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	
35	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	
40	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	
45	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	
50	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
55	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	
60	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	
65	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			
65	cagtgttttac tcaaacagaa tgcattttctt cactccaatg acaaatgaca aatgaaagtc							995
	caaagacatt ttctcatgtg cttaccaacc aaatagtatg tataaaacca caaaagagtc							1055
	acacacacac acacacacac acacacacac acacacacag agagagagag agagagagag							1115

## ES 2 310 469 A1

```

agagagacag acagacagac agacagatac acacacacta cagaacagaa tctatgtact 1175
taaagttaat tcgttctatg tgaagtttaa aattatattt actgacagct agattgaaag 1235
5 gataaaagat aagaatcttt ctctttaaag atgaagtga aagcacattg catcttttct 1295
tactaagaaa gaatacagag atttactg ctgccaaacc atttcaacca aaggaacagt 1355
10 atttcttctt aatagaattg taatagtgtt tccaagagga agagagtctg ccagacacta 1415
tctcaggtgc cttataaagt actccaagtt tacttcctta aatgtatgat gcctggttgt 1475
15 catcagtga tgcagcctt ttctggatta cctacaatgt tttaaaacta tattgttaag 1535
agaaaaaaaa ccaaaaacaa gaaaaagaac agaacacaag agaatgtatt aaagtattct 1595
tgttttattt ttgcatgtg tgccttgga gaggagggaa agacaaactt caaacattcc 1655
20 tgggtgcgtgt cccatgtctt tctttttaaa aaagaatctt aatgttttat aatacaaagt 1715
aatgaaaatg tgcaaaagaa tttcttagac attcagtaat gtacttagac ttttgaaaat 1775
25 tcatgtgatg gatgcagtaa tacaatgcc ctccaagtgc ctgtcttaat gacttgtgta 1835
gttgatgaac tgatgtaa tttgttttat ttttatacaa ctgaatgaac tctgtatgaa 1895
30 agtgaggtac ggttaatagc cagcctata ttcaaccaga atacttgtga aatcaatgtc 1955
cttttttaaa aagtaacttt caaggtctct tttttacaat aaacattttt gagtaaaaaa 2015
35 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2075
aaaaaaaaa 2084

```

<210> 6

40 <211> 269

<212> PRT

<213> Mouse

45 <400> 6

```

Met Pro Arg Ser Phe Leu Val Lys Lys His Phe Asn Ala Ser Lys Lys
1           5           10           15

```

50

```

Pro Asn Tyr Ser Glu Leu Asp Thr His Thr Val Ile Ile Ser Pro Tyr
20           25           30

```

55

```

Leu Tyr Glu Ser Tyr Pro Ile Pro Val Ile Pro Lys Pro Glu Ile Leu
35           40           45

```

60

```

Thr Ser Gly Ala Tyr Ser Pro Ile Thr Val Trp Thr Ser Ser Ala Ala
50           55           60

```

65

```

Pro Leu His Ser Pro Leu Pro Ser Gly Leu Ser Pro Leu Thr Gly Tyr
65           70           75           80

```

## ES 2 310 469 A1

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

<210> 7

<211> 2101

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (165)..(971)

<223> Secuencia codificante de Snai12 humano

# ES 2 310 469 A1

<400> 7		
	agttcgtataa ggagccgggt gacttcagag ggcgccggccc gtccgtctgc cgcacctgag	60
5	cacggcccct gcccgagcct ggcccgcgc gatgctgtag ggaccgcgt gtccctccgc	120
	cggaccgtta tccgcgcgcg gcgcccgcga gaccgcgtgg caag atg ccg cgc tcc	176
		Met Pro Arg Ser
		1
10	ttc ctg gtc aag aag cat ttc aac gcc tcc aaa aag cca aac tac agc	224
	Phe Leu Val Lys Lys His Phe Asn Ala Ser Lys Lys Pro Asn Tyr Ser	
	5 10 15 20	
15	gaa ctg gac aca cat aca gtg att att tcc ccg tat ctc tat gag agt	272
	Glu Leu Asp Thr His Thr Val Ile Ile Ser Pro Tyr Leu Tyr Glu Ser	
		25 30 35
20	tac tcc atg cct gtc ata cca caa cca gag atc ctc agc tca gga gca	320
	Tyr Ser Met Pro Val Ile Pro Gln Pro Glu Ile Leu Ser Ser Gly Ala	
		40 45 50
25	tac agc ccc atc act gtg tgg act acc gct gct cca ttc cac gcc cag	368
	Tyr Ser Pro Ile Thr Val Trp Thr Thr Ala Ala Pro Phe His Ala Gln	
		55 60 65
30	cta ccc aat ggc ctc tct cct ctt tcc gga tac tcc tca tct ttg ggg	416
	Leu Pro Asn Gly Leu Ser Pro Leu Ser Gly Tyr Ser Ser Ser Leu Gly	
		70 75 80
35	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
40	ggc tca gaa agc ccc att agt gat gaa gag gaa aga cta cag tcc aag	512
	Gly Ser Glu Ser Pro Ile Ser Asp Glu Glu Glu Arg Leu Gln Ser Lys	
		105 110 115
45	ctt tca gac ccc cat gcc att gaa gct gaa aag ttt cag tgc aat tta	560
	Leu Ser Asp Pro His Ala Ile Glu Ala Glu Lys Phe Gln Cys Asn Leu	
		120 125 130
50	tgc aat aag acc tat tca act ttt tct ggg ctg gcc aaa cat aag cag	608
	Cys Asn Lys Thr Tyr Ser Thr Phe Ser Gly Leu Ala Lys His Lys Gln	
		135 140 145
55	ctg cac tgc gat gcc cag tct aga aaa tct ttc agc tgt aaa tac tgt	656
	Leu His Cys Asp Ala Gln Ser Arg Lys Ser Phe Ser Cys Lys Tyr Cys	
		150 155 160
60	gac aag gaa tat gtg agc ctg ggc gcc ctg aag atg cat att cgg acc	704
	Asp Lys Glu Tyr Val Ser Leu Gly Ala Leu Lys Met His Ile Arg Thr	
		165 170 175 180
65	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
65	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	



# ES 2 310 469 A1

	200	205	210	
5	ttt tct tgc cct cac tgc aac aga gca ttt gca gac agg tca aat ctg Phe Ser Cys Pro His Cys Asn Arg Ala Phe Ala Asp Arg Ser Asn Leu 215 220 225			848
10	agg gct cat ctg cag acc cat tct gat gta aag aaa tac cag tgc aaa Arg Ala His Leu Gln Thr His Ser Asp Val Lys Lys Tyr Gln Cys Lys 230 235 240			896
15	aac tgc tcc aaa acc ttc tcc aga atg tct ctc ctg cac aaa cat gag Asn Cys Ser Lys Thr Phe Ser Arg Met Ser Leu Leu His Lys His Glu 245 250 255 260			944
20	gaa tct ggc tgc tgt gta gca cac tga gtgacgcaat caatgtttac Glu Ser Gly Cys Cys Val Ala His 265			991
25	tcgaacagaa tgcattttctt cactccgaag ccaaattgaca aataaagtcc aaaggcattt tctcctgtgc tgaccaacca aataatatgt atagacacac acacatatgc acacacacac			1051 1111
30	acacacacccc acagagagag agctgcaaga gcatggaatt catgtgttta aagataatcc tttccatgtg aagtttataaa ttactatata tttgctgatg gctagattga gagaataaaa			1171 1231
35	gacagtaacc tttctcttca aagataaaaat gaaaagcaca ttgcatcttt tcttcctaaa aaaatgcaaa gatttacatt gctgccaaat catttcaact gaaaagaaca gtattgcttt			1291 1351
40	gtaatagagt ctgtaatagg atttcccata ggaagagatc tgccagacgc gaactcaggt gccttaaaaa gtattccaag ttactccat tacatgtcgg ttgtctggtt gccattgttg			1411 1471
45	aactaaagcc tttttttgat tacctgtagt gctttaaagt atatttttaa aaggaggaggaa aaaaataaca agaacaaaac acaggagaat gtattaaaag tattttttgtt ttgtttttgtt			1531 1591
50	tttgccaatt aacagtatgt gccttggggg aggagggaaa gattagcttt gaacattcct ggcgcatgct ccattgtctt actatttttaa aacatttttaa taatttttga aaattaatta			1651 1711
55	aagatgggaa taagtgcaaa agaggattct taaaaattca ttaatgtact taaactattt caaattgcata ccacaaatgc aataatacaa tacccttcc aagtgccttt ttaaattgta			1771 1831
60	tagttgatga gtcaatgtaa atttgtgttt atttttatat gattgaatga gttctgtatg aaactgagat gttgtctata gctatgtcta taaacaacct gaagacttgt gaaatcaatg			1891 1951
	tttctttttt aaaaaacaat tttcaagttt tttttacaat aaacagtttt gatttaaaaat ctcgtttgta tactattttc agagacttta cttgcttcat gattagtacc aaaccactgt			2011 2071
	acaaagaatt gtttggttaac aagaaaaaaa			2101
	<210> 8			
	<211> 268			
65	<212> PRT			
	<213> <i>Homo sapiens</i>			

# ES 2 310 469 A1

<400> 8

5	Met	Pro	Arg	Ser	Phe	Leu	Val	Lys	Lys	His	Phe	Asn	Ala	Ser	Lys	Lys	1	5	10	15
10	Pro	Asn	Tyr	Ser	Glu	Leu	Asp	Thr	His	Thr	Val	Ile	Ile	Ser	Pro	Tyr	20	25	30	
15	Leu	Tyr	Glu	Ser	Tyr	Ser	Met	Pro	Val	Ile	Pro	Gln	Pro	Glu	Ile	Leu	35	40	45	
20	Ser	Ser	Gly	Ala	Tyr	Ser	Pro	Ile	Thr	Val	Trp	Thr	Thr	Ala	Ala	Pro	50	55	60	
25	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	
35	Lys	Asp	His	Ser	Gly	Ser	Glu	Ser	Pro	Ile	Ser	Asp	Glu	Glu	Glu	Arg	100	105	110	
40	Leu	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Asp	Pro	His	Ala	Ile	Glu	Ala	Glu	Lys	Phe	115	120	125	
45	Gln	Cys	Asn	Leu	Cys	Asn	Lys	Thr	Tyr	Ser	Thr	Phe	Ser	Gly	Leu	Ala	130	135	140	
50	Lys	His	Lys	Gln	Leu	His	Cys	Asp	Ala	Gln	Ser	Arg	Lys	Ser	Phe	Ser	145	150	155	160
55	Cys	Lys	Tyr	Cys	Asp	Lys	Glu	Tyr	Val	Ser	Leu	Gly	Ala	Leu	Lys	Met	165	170	175	
60	His	Ile	Arg	Thr	His	Thr	Leu	Pro	Cys	Val	Cys	Lys	Ile	Cys	Gly	Lys	180	185	190	
65	Ala	Phe	Ser	Arg	Pro	Trp	Leu	Leu	Gln	Gly	His	Ile	Arg	Thr	His	Thr	195	200	205	
	Gly	Glu	Lys	Pro	Phe	Ser	Cys	Pro	His	Cys	Asn	Arg	Ala	Phe	Ala	Asp	210	215	220	

# ES 2 310 469 A1

Arg Ser Asn Leu Arg Ala His Leu Gln Thr His Ser Asp Val Lys Lys  
225 230 235 240

5 Tyr Gln Cys Lys Asn Cys Ser Lys Thr Phe Ser Arg Met Ser Leu Leu  
245 250 255

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

<210> 9

15 <211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

20 <220>

<223> Oligo\_mGapdh\_A

<400> 9

25 ctgagcaaga gaggcctat cc

22

<210> 10

30 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

35 <220>

<223> Oligo\_mGapdh\_B

<400> 10

40 ctccttaggc ccctcctgtt

20

<210> 11

45 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

50 <220>

<223> Oligo\_mP21\_A

<400> 11

55 aggagccagg ccaagatggt

20

<210> 12

60 <211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

65 <220>

<223> Oligo\_mP21\_B

## ES 2 310 469 A1

	<400> 12	
	gctttgacac ccacggtatt ca	22
5	<210> 13	
	<211> 22	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligo_mSnail1_A	
15	<400> 13	
	ccacactggt gagaagccat tc	22
20	<210> 14	
	<211> 22	
	<212> DNA	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligo_mSnail1_B	
30	<400> 14	
	tcttcacatc cgagtgggtt tg	22
35	<210> 15	
	<211> 25	
	<212> RNA	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> siRNA_I_A	
45	<400> 15	
	cggaagaucu ucaacugcaa auauu	25
50	<210> 16	
	<211> 25	
	<212> RNA	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> siRNA_I_Bcomplem	
60	<400> 16	
	aaauuuugca guugaagauc uuccg	25
65	<210> 17	
	<211> 25	

## ES 2 310 469 A1

	<212> RNA	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> siRNA_II_A	
	<400> 17	
10	caaaccacu cggaugugaa gagau	25
	<210> 18	
15	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> siRNA_II_Bcomplem	
	<400> 18	
25	aucucuucac auccgagugg guuug	25
	<210> 19	
30	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> siRNA_III_A	
	<400> 19	
40	cagcugcuuc gagccauaga acuaa	25
	<210> 20	
45	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> siRNA_III_Bcomplem	
	<400> 20	
55	uuaguucuau ggcucgaagc agcug	25
	<210> 21	
60	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
65	<220>	
	<223> RNAm_snail	

## ES 2 310 469 A1

<400> 21

gatgcacatc cgaagccac

19

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 310 469

⑫ Nº de solicitud: 200700619

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 08.03.2007

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	SEKI K. et al. "Mouse Snail Family Transcriptions Repressors Regulate Chondrocyte, Extracellular Matrix, Type II Collagen, and Aggrecan". The Journal of Biological Chemistry. 2003. Vol. 274, Nº 43, páginas 41862-41870. Especialmente, página 41862, resumen, columna 2, párrafos 3-4; página 41864, columna 1, párrafo 2; columna 2, párrafo 2; página 41865, figura 2; página 41866, columna 1, párrafo 4; página 41867, figura 3; página 41867, figura 4.	1-12
X	US 20060003956 A1 (CASADOME DO et al.) 05.01.2006, página 2, párrafos 0019,0021,0022,0026-0027; reivindicación 1.	13-17,19,22
X	WO 2004065602 A1 (UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID) 05.08.2004, reivindicaciones 2,7-8.	13-17
X	BOUTET A et al. "Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney". The EMBO Journal. 2006. Vol. 25, Nº 23, páginas 5603-5613. Especialmente, página 5603, resumen, columna 2, párrafo 3; página 5611, columna 2, párrafo 2; página 5612, columna 2, párrafo 2.	13-17
X A	WO 2007012970 A1 (CENTRO DE INVESTIGACION BIOMOLECULAR APLICADA SL) 01.02.2007, reivindicaciones 19,22.	18,21,24-27,20,23

#### 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

Mª D. García Grávalos

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**A61P 19/00** (2006.01)