



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

⑬ Fecha de presentación: **08.03.2007**

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

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.01.2009

⑯ Solicitante/s:

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

⑯ Inventor/es: **Nieto Toledano, María Ángela;
Álvarez de Frutos, Cristina y
Vega, Sonia**

⑯ Agente: **No consta**

⑭ 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.**

⑮ 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 tana-toférica (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.

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 5 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 10 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).

15 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 20 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, 25 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 30 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 35 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 40 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 45 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 50 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 55 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 60 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.

5 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 natiréutico CNP, inhibidor de la activación de las MAPKs mediada 10 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 15 anticuerpos la unión del ligando al FGFR3 (Aveizer y cols., 2003).

Descripción de la invención

Descripción breve

20 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:

25 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.

30 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:

35 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

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

45 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).

50 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.

55 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:

60 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,

65 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.

5 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.

10

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.

35 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 reminiscientes 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).

40 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.

45 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.

50 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 etiopatogenia 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 5 la ganancia de función del FGFR3 inducidos por cualquier mecanismo o las acondroplasias generadas por la presencia aberrante de Snail1 independientes el 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 10 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 15 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: acondroplasia (ACH), 20 tanatoforía 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.

25 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 30 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 35 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 40 los resultados obtenidos en la presente invención sobre Snail1 pueden ser trasladados a Snail2.

40 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%.

45 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 h/Snail2, ya sea la identificación en forma de un transcripto 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 50 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; Lambolez y Rossier, 2000; Egger y cols., 2000; Folz y Nepluev, 2000 y Pfaffl, 2001).

55 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.

60 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).

65 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).

Por otro lado, este procedimiento de diagnóstico de condrodisplasia puede realizarse utilizando 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.

5 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:

10 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

15 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).

30 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.

35 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.

45 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).

50 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.

60 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.

65 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:

ES 2 310 469 A1

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

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

10 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.

25 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).

30 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:

35 - 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).

40 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.

45 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).

50 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.

55 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.

60 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:

65 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.

5 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).

10 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:

15 - 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
 20 - 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).

25 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.

30 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.

35 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.

40 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.

45 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: acondro-droplasia (ACH), tanatoforia displásica (TD) e hipocondroplasia (HCH).

50 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.

55 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, donde 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

30 Ejemplo 1

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

35 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 paraformaldehido al 4% en PBS/DEPC toda la noche. A continuación se embebieron en gelatina y cortaron con un vibratomo para 40 obtener secciones de 50 µm. 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.

45 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

50 *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-Snail1-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).

55 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 60 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 µg/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 trajeron 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 CTCCCCTAGGCCCTCTGTT (SEQ ID NO10); *mp21*, AGGAGCCAGGCCAAGATGGT (SEQ ID NO11) y GCTTGACACCCCACGGTATTCA (SEQ ID NO12); *mSnail1*, CCACACTGGTGAGAAGGCCATT (SEQ ID NO13) y TCTTCACATCCGAGTGGGTTG (SEQ ID NO14).

35 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 trajeron con colagenasa 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 1,5.106 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 tanatofórica 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*

15 **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.

20 **Referencias**

- Avizier D, Golembio 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.

- 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.

- Chen L, Adar R, Yang X, Monsonego 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, 2^a 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.

- 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.

- 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.

- Faulí i Trillo C (1993) "Tratado de Farmacia Galénica", Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

- Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, D DM, Chambon P (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10887-10890.

- Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P (1997) Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem. Biophys. 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.
- 5 - **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.
- 10 - **Hawker CJ and Wooley KL (2005)** *Science* 19 (309): 1200-5.
- 15 - **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.
- 20 - **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.
- 25 - **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.
- 30 - **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 chondrodisplasias. *Curr. Opin. Pediatr.* 9(4):437-442.
- 35 - **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.
- 40 - **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.
- 45 - **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.
- 50 - **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.
- **Lambolez B and Rossier J (2000)** Quantitative RT-PCR. *Nat Biotechnol*, 18, 5.
- 55 - **Legeai-Mallet L, Benoist-Lassel 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.
- 60 - **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 SNAI1 retrogene. *J Biol Chem* 277, 38803-9.
- 65 - **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 signalling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development*, 125:4977-88.
- 70 - **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.

ES 2 310 469 A1

- **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. *Nucleic 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.* 18:1131-1143.

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 acardroplasia produced by targeting FGFR3. *PNAS* 96(8):4455-4460.

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

45 - **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.

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

55

60

65

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:

5 a) identificación de la presencia de Snail1, en una muestra biológica de origen óseo de un mamífero, preferentemente un ser humano, y

10 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.

15 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.

20 3. Procedimiento de identificación según la reivindicación 2 **caracterizado** porque la enfermedad pertenece al siguiente grupo: acondrodroplasia (ACH), tanatoforía displásica (TD) e hipocondroplasia (HCH).

25 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.

25 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.

30 8. Procedimiento de identificación según la reivindicación 4 **caracterizado** porque Snail1 es el gen o proteína Snail12 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 transcríp

35 tivo 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.

40 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.

45 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,

50 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.

60 15. Procedimiento de identificación y evaluación según la reivindicación 14 **caracterizado** porque el animal transgénico utilizado es el ratón transgénico transgSnail1-ER.

ES 2 310 469 A1

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.

5

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:

15 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,
20 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.

25 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.

30 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:

35 - 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).

40 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 codificador de la proteína Snail humana y que incluye, al menos, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

45 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,
50 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,
55 junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

60 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.

65 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:

65 - 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'-UUU GUU CUA UGG CUC GAA GCA GCU G-3' (SEQ ID NO20).

5 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.

10 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), tanatoforía displásica (TD) e hipocondroplasia (HCH).

15 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

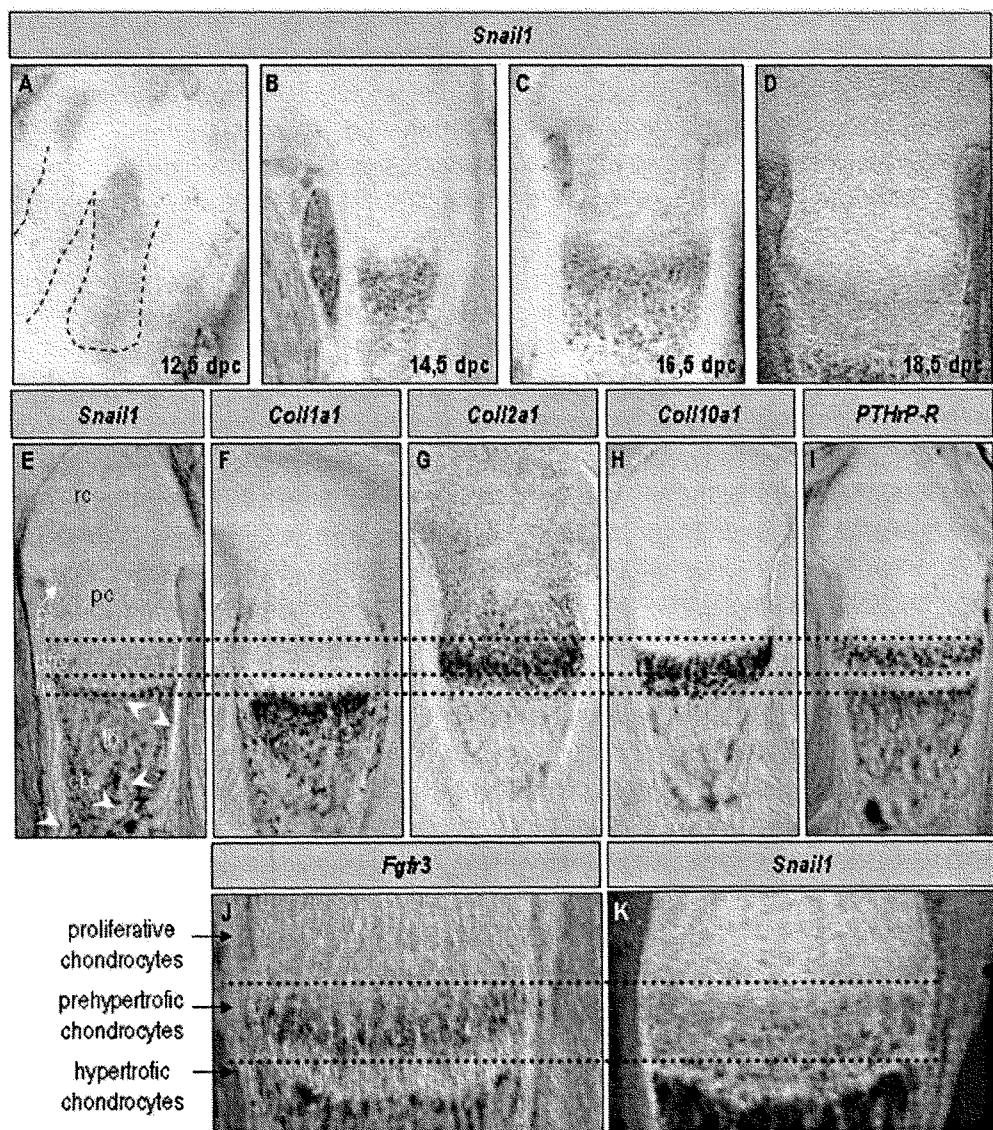


Figura 1

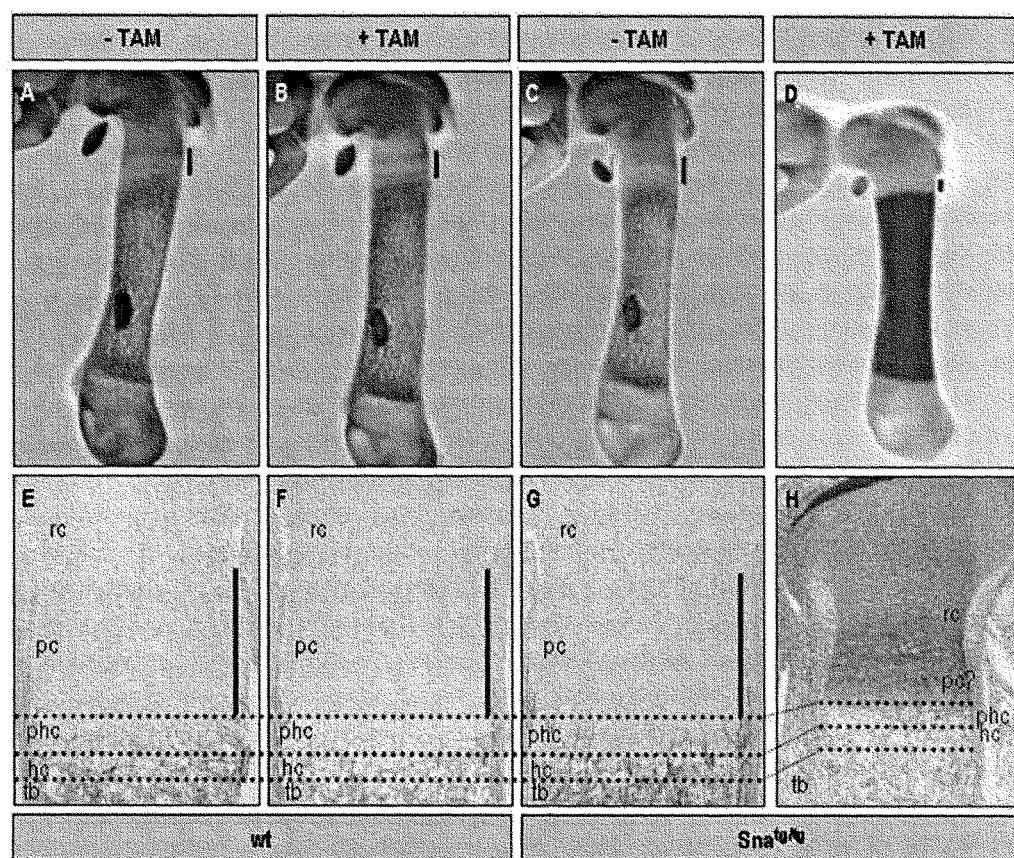


Figura 2

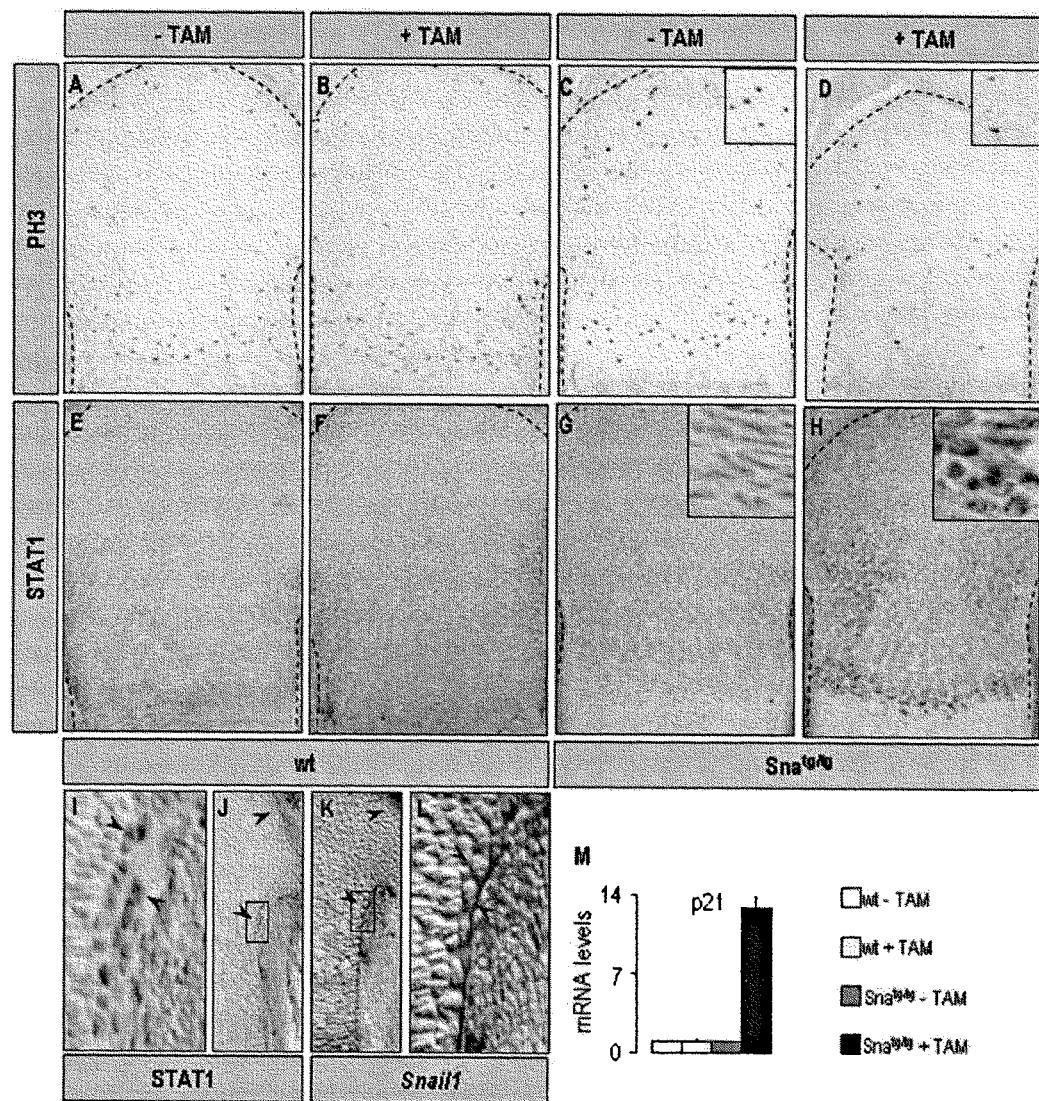


Figura 3

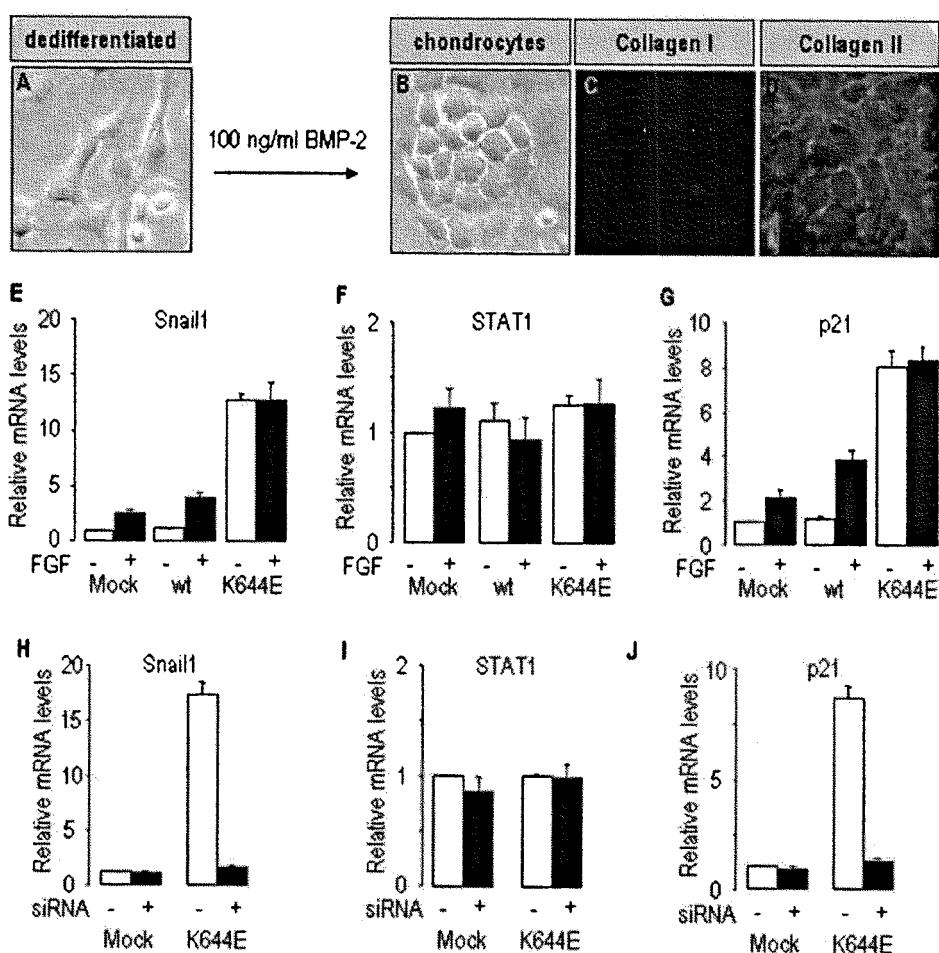


Figura 4

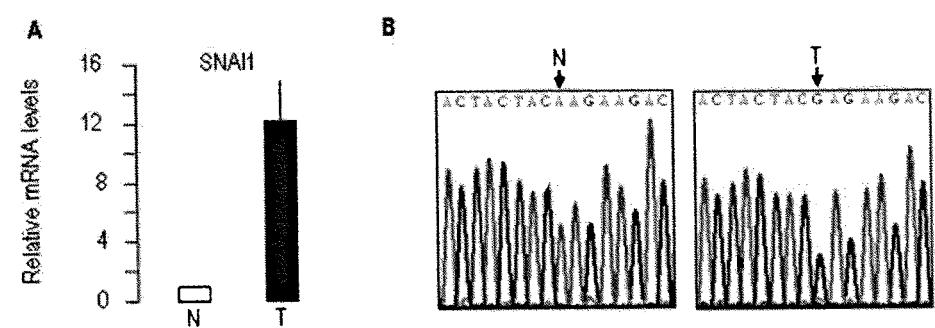


Figura 5

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 COMPO-
 10 SICIONES FARMACÉUTICAS, PROCEDIMIENTO DE DIAGNÓSTICO DE CONDRODISPLASIAS Y
 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 | cgagttgac taccgacctt gcgcgacccg gtgaccccgatcaccttagt cgctctggcc | 60 |
| | aac atg ccg cgc tcc ttc ctg gtc agg aag ccg tcc gac ccc cgc cgg Met Pro Arg Ser Phe Leu Val Arg Lys Pro Ser Asp Pro Arg Arg | 108 |
| | 1 5 10 15 | |
| 40 | aag ccc aac tat agc gag ctg cag gac gcg tgt gtg gag ttc acc ttc Lys Pro Asn Tyr Ser Glu Leu Gln Asp Ala Cys Val Glu Phe Thr Phe | 156 |
| | 20 25 30 | |
| 45 | cag cag ccc tac gac cag gcc cac ctg ctg gcc atc cct ccg ccc Gln Gln Pro Tyr Asp Gln Ala His Leu Leu Ala Ala Ile Pro Pro Pro | 204 |
| | 35 40 45 | |
| 50 | gag gtc ctc aac ccc gcc gct tcg ctg ccc acc ctc atc tgg gac tct Glu Val Leu Asn Pro Ala Ala Ser Leu Pro Thr Leu Ile Trp Asp Ser | 252 |
| | 50 55 60 | |
| 55 | ctc ctg gta ccc caa gtg cgg ccg gtt gcc tgg gcc acc ctc ccg ctg Leu Leu Val Pro Gln Val Arg Pro Val Ala Trp Ala Thr Leu Pro Leu | 300 |
| | 65 70 75 | |
| 60 | cgg gag agc ccc aag gcc gta gag ctg acc tcg ctg tcc gat gag gac Arg Glu Ser Pro Lys Ala Val Glu Leu Thr Ser Leu Ser Asp Glu Asp | 348 |
| | 80 85 90 95 | |
| 65 | agt ggc aaa agc tcc cag ccg ccc agc ccg ccc tcg ccg gcg ccg tcg Ser Gly Lys Ser Ser Gln Pro Pro Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Ser | 396 |
| | 100 105 110 | |

ES 2 310 469 A1

| | | |
|----|---|---|
| 5 | tcc ttc tcg tcc acc tcg gcc tcg tcc ctg gag gcc gag gcc ttc atc Ser Phe Ser Ser Thr Ser Ala Ser Ser Leu Glu Ala Glu Ala Phe Ile 115 120 125 | 444 |
| 10 | gcc ttc cct ggc ttg ggc caa ctt ccc aag cag ctg gcc agg ctc tcg Ala Phe Pro Gly Leu Gly Gln Leu Pro Lys Gln Leu Ala Arg Leu Ser 130 135 140 | 492 |
| 15 | gtg gcc aag gac ccc cag tcg cgg aag atc ttc aac tgc aaa tat tgt Val Ala Lys Asp Pro Gln Ser Arg Lys Ile Phe Asn Cys Lys Tyr Cys 145 150 155 | 540 |
| 20 | aac aag gag tac ctc agc ctg ggc gct ctg aag atg cac atc cga agc Asn Lys Glu Tyr Leu Ser Leu Gly Ala Leu Lys Met His Ile Arg Ser 160 165 170 175 | 588 |
| 25 | cac acg ctg cct tgt gtc tgc acg acc tgt gga aag gcc ttc tct agg His Thr Leu Pro Cys Val Cys Thr Thr Cys Gly Lys Ala Phe Ser Arg 180 185 190 | 636 |
| 30 | ccc tgg ctg ctt cag ggc cac gtc cgc acc cac act ggt gag aag cca Pro Trp Leu Leu Gln Gly His Val Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro 195 200 205 | 684 |
| 35 | ttc tcc tgc tcc cac tgc aac cgt gct ttt gct gac cgc tcc aac ctg Phe Ser Cys Ser His Cys Asn Arg Ala Phe Ala Asp Arg Ser Asn Leu 210 215 220 | 732 |
| 40 | cgt gcc cac ctc caa acc cac tcg gat gtg aag aga tac cag tgc cag Arg Ala His Leu Gln Thr His Ser Asp Val Lys Arg Tyr Gln Cys Gln 225 230 235 | 780 |
| 45 | gcc tgt gcc cga acc ttc tcc cgc atg tcc ttg ctc cac aag cac caa Ala Cys Ala Arg Thr Phe Ser Arg Met Ser Leu Leu His Lys His Gln 240 245 250 255 | 828 |
| 50 | gag tct ggc tgc tcc gga ggc cct cgc tga ccctgctacc tccccatcct Glu Ser Gly Cys Ser Gly Gly Pro Arg 260 | 878 |
| 55 | cgctggcata ttccccggagc tcaccctcct cctcaactgcc aggactcctt ccagccttgg tccggggacc tgtggcgtcc atgtctggac ctgggtcctg cttggctctc ttgggtggcct | 938 998 |
| 60 | ttgccgcagg tggctgatgg agtgcctttg taccgcucca gagcctccta cccctcagta ttcatgaggt gtagcctctg gacacagctg cttcgagcca tagaactaaa gccaaccac tggctggaa gcttgaaccc cgctcagggg accccacttc cctacccccc tcaaggaccc ttcaggccac cttctttgag gtacaacaga ctatgcaata gttccccc tcccacaccc gtccagctgt aaccatgcct cagcagggtg gttactggac acatgtccag gtgcccctgg gcctggcaa ctgtttcagc ccccgccccc atttgcctg gtgacacctg tttcacagca gtttaactgt ctcagaaggg accatgaata atggccatca cttgttaggg gccaagtgg gtgcttcagc ctggccaatg tgtctccag aactatttg gggcccaaca ggtggccccc | 1058 1118 1178 1238 1298 1358 1418 1478 |

ES 2 310 469 A1

| | | |
|----|---|------|
| 5 | ggagaaaat gtttacattt taaaggtatt tatattgtaa gcagcattt gtatagttaa | 1538 |
| | tatgtacagt ttattgatat tcaataaaaat ggttaatttataactaaaa aaaaaaaaaaa | 1598 |
| | aaaaaaaaaaa aaaaa | 1613 |
| 10 | <210> 2 | |
| | <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 | |
| | 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*

30 <220>

<221> CDS

<222> (71)..(865)

<223> Secuencia codificante de Snail1 humano

35 <400> 3

ggcacggcct agcgagtgg 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 cg gct 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 | tcc | 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 | cg | 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 | cg | 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 | g | tg | gt | g | c | gg | ac | tt | c | tc | g | at | tc | c | 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 | ccctcgaggc | | | | 875 |
| His | Gln | Glu | Ser | Gly | Cys | Ser | Gly | Cys | Pro | Arg | | | | | | |
| | | | | | | | | | | 255 | | 260 | | | | |
| 55 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| tccctttcc | tctccatacc | tgccccgtcc | tgacagcctt | ccccagctcc | agcaggaagg | | | | | | | | | | | 935 |
| accccacatc | tttctcaactg | ccatggatt | ccctcctgag | tgccccactt | ctggccacat | | | | | | | | | | | 995 |
| cagccccaca | ggactttgat | gaagaccatt | ttctgggtct | gtgtcctctg | cctgggctct | | | | | | | | | | | 1055 |
| 55 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ggaagaggcc | ttcccatggc | catttctgtg | gagggaggcc | agctggcccc | cagccctggg | | | | | | | | | | | 1115 |
| ggattcctga | gctggcctgt | ctgcgtgggt | ttttgtatcc | agagctgttt | ggatacagct | | | | | | | | | | | 1175 |
| 60 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| gctttgagct | acaggacaaa | ggctgacaga | ctcaactggga | agctcccacc | ccactcaggg | | | | | | | | | | | 1235 |
| gacccccactc | ccctcacaca | cacccccc | caaggaaccc | tcaggccacc | ctccacgagg | | | | | | | | | | | 1295 |
| 65 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| tgtgactaac | tatgcaataa | tccacccca | ggtgcagccc | cagggcctgc | ggaggcggtg | | | | | | | | | | | 1355 |

ES 2 310 469 A1

| | |
|-----|--|
| 5 | gcagactaga gtctgagatg ccccgagccc aggcagctat ttcagcctcc tgtttggcgg 1415 |
| 10 | ggtggcacct gtttcccggg caatttaaca atgtctgaaa agggactgtg agtaatggct 1475 |
| 15 | gtcacttgtc gggggcccaa gtggggtgct ctggtctgac cgatgtgtct cccagaacta 1535 |
| 20 | ttctggggc ccgacaggtg ggcctggag gaagatgtt acattttaa aggtacactg 1595 |
| 25 | gtatttatat ttcaaacatt ttgtatcaag gaaacgtttt gtatagttat atgtacagtt 1655 |
| 30 | tattgatatt caataaagca gttaatttat atattaaaaa aaaaaaaaaa aaa 1708 |
| 35 | <210> 4 |
| 40 | <211> 264 |
| 45 | <212> PRT |
| 50 | <213> <i>Homo sapiens</i> |
| 55 | <400> 4 |
| 60 | Met Pro Arg Ser Phe Leu Val Arg Lys Pro Ser Asp Pro Asn Arg Lys 1 5 10 15 |
| 65 | Pro Asn Tyr Ser Glu Leu Gln Asp Ser Asn Pro Glu Phe Thr Phe Gln 20 25 30 |
| 70 | Gln Pro Tyr Asp Gln Ala His Leu Leu Ala Ala Ile Pro Pro Pro Glu 35 40 45 |
| 75 | Ile Leu Asn Pro Thr Ala Ser Leu Pro Met Leu Ile Trp Asp Ser Val 50 55 60 |
| 80 | Leu Ala Pro Gln Ala Gln Pro Ile Ala Trp Ala Ser Leu Arg Leu Gln 65 70 75 80 |
| 85 | Glu Ser Pro Arg Val Ala Glu Leu Thr Ser Leu Ser Asp Glu Asp Ser 85 90 95 |
| 90 | Gly Lys Gly Ser Gln Pro Pro Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Ser Ser 100 105 110 |
| 95 | Phe Ser Ser Thr Ser Val Ser Ser Leu Glu Ala Glu Ala Tyr Ala Ala 115 120 125 |
| 100 | Phe Pro Gly Leu Gly Gln Val Pro Lys Gln Leu Ala Gln Leu Ser Glu 130 135 140 |
| 105 | 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

30 Ser Gly Cys Ser Gly Cys Pro Arg
 260

35 <210> 5
 <211> 2084
 <212> DNA
 <213> Mouse

40 <220>
 <221> CDS
 <222> (116)..(925)
 <223> Secuencia codificante de Snail2 de ratón

45 <400> 5
 caggagccg ggtgacttca gaggcgctg cctgtccccc gccgcacctg agccaccg 60

atgctataagg accggccgcct ggaccgttat ccgccccgcgc ccgccccgcag ccacc atg
 50 Met 118

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 Leu His Ser Pro Leu Pro Ser Gly Leu Ser Pro Leu Thr Gly Tyr Ser 70 | | 75 | 80 | 358 |
| 10 | tca tcc ttg ggg cgt gta agt ccc ccg cct tcc tct gac act tca tcc Ser Ser Leu Gly Arg Val Ser Pro Pro Ser Ser Asp Thr Ser Ser 85 | 90 | | 95 | 406 |
| 15 | aag gat cac agt ggt tca gaa agt ccc att agt gac gaa gag gag aga Lys Asp His Ser Gly Ser Glu Ser Pro Ile Ser Asp Glu Glu Glu Arg 100 | 105 | | 110 | 454 |
| 20 | ctg cag ccc aag ctt tca gac ccc cat gcc atc gaa gct gag aag ttt Leu Gln Pro Lys Leu Ser Asp Pro His Ala Ile Glu Ala Glu Lys Phe 115 | 120 | 125 | | 502 |
| 25 | cag tgc aat tta tgc aat aag acc tat tct acg ttc tct ggg ctg gcc Gln Cys Asn Leu Cys Asn Lys Thr Tyr Ser Thr Phe Ser Gly Leu Ala 130 | 135 | 140 | 145 | 550 |
| 30 | aaa cac aag cag ctg cac tgt gat gcc cag tct agg aaa tcg ttc agc Lys His Lys Gln Leu His Cys Asp Ala Gln Ser Arg Lys Ser Phe Ser 150 | 155 | | 160 | 598 |
| 35 | tgc aag tac tgt gac aag gaa tat gtg agc ctg ggt gcc ctg aag atg Cys Lys Tyr Cys Asp Lys Glu Tyr Val Ser Leu Gly Ala Leu Lys Met 165 | 170 | | 175 | 646 |
| 40 | cac att cga acc cac aca ttg cct tgt gtc aag atc tgt ggc aag His Ile Arg Thr His Thr Leu Pro Cys Val Cys Lys Ile Cys Gly Lys 180 | 185 | | 190 | 694 |
| 45 | gct ttc tcc aga ccc tgg ctg ctt caa gga cac att aga act cac act Ala Phe Ser Arg Pro Trp Leu Leu Gln Gly His Ile Arg Thr His Thr 195 | 200 | 205 | | 742 |
| 50 | ggg gaa aag cct ttc tct tgc cct cac tgc aat agg gct ttt gca gac Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys Pro His Cys Asn Arg Ala Phe Ala Asp 210 | 215 | 220 | 225 | 790 |
| 55 | aga tca aac ctg agg gca cat ctg cag acc cac tct gat gta aag aaa Arg Ser Asn Leu Arg Ala His Leu Gln Thr His Ser Asp Val Lys Lys 230 | 235 | | 240 | 838 |
| 60 | tac cag tgc aaa aac tgc tcc aaa acc ttc tcc aga atg tcg ctt ctg Tyr Gln Cys Lys Asn Cys Ser Lys Thr Phe Ser Arg Met Ser Leu Leu 245 | 250 | 255 | | 886 |
| 65 | cat aaa cat gag gag tct ggc tgc tgt gtg gca cac tga gtggcgcaac His Lys His Glu Glu Ser Gly Cys Cys Val Ala His 260 | 265 | | | 935 |
| | cagtgtttac tcaaacagaa tgcatttctt cactccaatg acaaatgaca aatgaaaagtc caaagacatt ttctcatgtg cttaccaacc aaatagtatg tataaaacca caaaagagtc | | | | 995 |
| | acacacacac acacacacac acacacacac acacacacag agagagagag agagagagag | | | | 1055 |
| | | | | | 1115 |

ES 2 310 469 A1

| | | |
|----|--|------|
| 5 | agagagacag acagacagac agacagatac acacacacta cagaacagaa tctatgtact | 1175 |
| | taaagttaat tcgttctatg tgaagttaa aattatattt actgacagct agattgaaag | 1235 |
| | gataaaagat aagaatctt ctctttaaag atgaagtgaa aagcacattg catctttct | 1295 |
| 10 | tactaagaaa gaatacagag atttacactg ctgccaaacc atttcaacca aaggaacagt | 1355 |
| | atttcttctt aatagaattt taatagtgtt tccaagagga agagagtctg ccagacacta | 1415 |
| | tctcagggtgc cttataaagt actccaagtt tacttcctt aatgtatgtat gcctgggtgt | 1475 |
| 15 | catcagtgaa tgacagcctt ttctggatta cctacaatgt tttaaaacta tattgttaag | 1535 |
| | agaaaaaaaaa ccaaaaacaa gaaaaagaac agaacacaag agaatgtattt aaagtattct | 1595 |
| 20 | tgttttattt ttgccatgtg tgccttgaa gaggaggaa agacaaactt caaacattcc | 1655 |
| | tggtgctgtg cccatgtctt tcttttaaa aaagaatctt aatgttttat aatacaaagt | 1715 |
| | aatgaaaatg tgcaaaagaa tttcttagac attcagtaat gtacttagac ttttggaaat | 1775 |
| 25 | tcatgtgatg gatcagtaa tacaatgccc ctccaagtgc ctgtcttaat gacttgtgt | 1835 |
| | gttcatgtgatc tgatgtaaat ttgtgtttat ttttatacaa ctgaatgtgaa tctgtatgaa | 1895 |
| 30 | agtgggtac ggttaatagc cacgcctata ttcaaccaga atacttgta aatcaatgtc | 1955 |
| | cttttttaaa aagtaacttt caaggtctct ttttacaat aaacatttt gagtaaaaaaa | 2015 |
| 35 | aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 2075 |
| | aaaaaaaaaa | 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

Lys Ala Phe Ser Arg Pro Trp Leu Leu Gln Gly His Ile Arg Thr His
195 200 205

35 Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys Pro His Cys Asn Arg Ala Phe Ala
210 215 220

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

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

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

<210> 7

55 <211> 2101

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

60 <220>

<221> CDS

<222> (165)..(971)

<223> Secuencia codificante de Snai12 humano

65

ES 2 310 469 A1

<400> 7

| | | |
|----|--|-----|
| 5 | agttcgtaaa ggagccgggt gacttcagag gcgcggcccc gtccgtctgc cgcaccttag | 60 |
| | cacggccctt gcccggcctt ggcccgccgc gatgctgttag ggaccggcgtt gtcctccgc | 120 |
| | cggaccgtta tccgcgcgg ggcgcggcca gaccggctgg caag atg ccg cgc tcc | 176 |
| | Met Pro Arg Ser | |
| 10 | 1 | |
| | 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 cca tct gac acc tcc tcc aag gac cac agt | 464 |
| | Arg Val Ser 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 | |
| 70 | 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 tgcatttctt cactccgaag ccaaattgaca aataaagtcc aaaggcattt tctcctgtgc tgaccaacca aataatatgt atagacacac acacatatgc acacacacac | | | 1051 |
| 30 | acacacaccc acagagagag agctgcaaga gcatgaaatt catgtgttta aagataatcc tttccatgtg aagtttaaaa ttactatata tttgctgtat gctagattga gagaataaaa gacagtaacc tttctcttca aagataaaaat gaaaaggcaca ttgcatcttt tcttcctaaa aaaatgcaaa gatttacatt gctgccaat catttcaact gaaaagaaca gtattgcttt | | | 1111 |
| 35 | gtaatagagt ctgtaatagg atttccata ggaagagatc tgccagacgc gaactcaggt gccttaaaaaa gtattccaag tttactccat tacatgtcgg ttgtctggtt gccattgtt aactaaagcc tttttttagt tacctgttagt gctttaaagt atattttaa aaggaggaa | | | 1171 |
| 40 | aaaaataaca agaacaacaaac acaggagaat gtattaaaag tattttgtt ttgtttgtt tttgccaatt aacagtatgt gccttgggg aggagggaaa gattagctt gaacattcct | | | 1231 |
| 45 | ggcgcatgct ccattgtctt actatttaa aacattttaa taattttga aaattaatta aagatggaa taagtgc当地 agaggattct tacaaattca ttaatgtact taaactattt | | | 1291 |
| 50 | caaatgcata ccacaaatgc aataatacaa tacccttcc aagtgccttt ttaaatttga tagttgatga gtcaatgtaa atttgtgttt atttttatat gattgaatga gttctgtatg | | | 1351 |
| 55 | aaactgagat gttgtctata gctatgtcta taaacaacct gaagacttgt gaaatcaatg tttctttttt aaaaaacaat tttcaagttt ttttacaat aaacagttt gatttaaaat | | | 1411 |
| 60 | ctcgtttgc tactatttc agagacttta cttgcttcat gattagtacc aaaccactgt acaagaatt gtttgttaac aagaaaaaaaaaa | | | 1471 |
| 65 | <210> 8 <211> 268 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | | | 1531 |

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 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 gaggccatat cc

22

<210> 10

30 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

35 <220>

<223> Oligo_mGapdh_B

<400> 10

40

ctcccttaggc ccctcctgtt

20

<210> 11

45 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

50 <220>

<223> Oligo_mP21_A

<400> 11

55

aggagccagg ccaagatgg

20

<210> 12

60 <211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

65 <220>

<223> Oligo_mP21_B

ES 2 310 469 A1

<400> 12 22
 gctttgacac ccacggatt ca
 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
 tttcacatc cgagtgggt tg 22
 35 <210> 15
 <211> 25
 <212> RNA
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> siRNA_I_A
 45 <400> 15
 cggaagauu ucaacugcaa auauu 25
 50 <210> 16
 <211> 25
 <212> RNA
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> siRNA_I_Bcomplem
 60 <400> 16
 aauauuugca 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 caaacccacu cggaaugugaa gagau 25

<210> 18

15 <211> 25
<212> RNA
<213> Artificial

20 <220>
<223> siRNA_II_Bcomplem

<400> 18

25 aucucuuac auccgagugg guuug 25

<210> 19

30 <211> 25
<212> RNA
<213> Artificial

35 <220>
<223> siRNA_III_A

<400> 19

40 cagcugcuuc gagecauaga acuua 25

<210> 20

45 <211> 25
<212> RNA
<213> Artificial

50 <220>
<223> siRNA_III_Bcomplem

<400> 20

55 uuaguucuau ggcucgaaagc 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



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **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, N° 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, N° 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 | WO 2007012970 A1 (CENTRO DE INVESTIGACION BIOMOLECULAR APLICADA SL) 01.02.2007, reivindicaciones 19,22. | 18,21, 24-27 |
| A | | 20,23 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

O: referido a divulgación no escrita

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

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

A: refleja el estado de la técnica

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 M ^a D. García Grávalos | Página 1/2 |
|--|---|---------------|

INFORME DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

Nº de solicitud: 200700619

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)