

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 339**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2005 E 05812548 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 1805519**

54 Título: **Proteínas Wnt y detección y tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

21.09.2004 US 612098 P
05.01.2005 WO PCT/US2005/000267

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2014

73 Titular/es:

RHODE ISLAND HOSPITAL (100.0%)
593 EDDY STREET
PROVIDENCE, RI 02902, US

72 Inventor/es:

WANDS, JACK R. y
KIM, MIRAN

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 445 339 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas Wnt y detección y tratamiento de cáncer

5 **Declaración con respecto a investigación patrocinada federalmente**

[0001] La presente invención se realizó con el apoyo del Gobierno bajo las subvenciones de los Institutos Nacionales de Salud N° CA035711 y AA002666. El Gobierno tiene algunos derechos en la presente invención.

10 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

[0002] La presente solicitud es una continuación en parte de la Solicitud Internacional N° PCT/US05/000267, presentada el 5 de enero de 2005, que reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/612.098, presentada el 21 de septiembre de 2004.

15

Campo técnico

[0003] La presente invención se refiere a la detección y el tratamiento de cáncer de hígado.

20 **Antecedentes**

[0004] El carcinoma hepatocelular (HCC) es el principal tumor maligno primario del hígado. Aunque se han identificado factores etiológicos virales, los mecanismos moleculares que contribuyen a la progresión tumoral durante la hepatocarcinogénesis siguen siendo en gran medida desconocidos. La familia de proteínas Frizzled está compuesta de diez o más proteínas de siete dominios transmembrana que actúan como receptores para proteínas Wnt. La red de señalización de Wnt/Frizzled influye en diversos procesos biológicos que varían de la determinación del destino de una célula a la motilidad y proliferación celular.

25

[0005] La β -catenina es una proteína multifactorial con un papel en la adhesión célula-célula que implica refuerzo del enlace de catenina y α -catenina con el citoesqueleto de actina. En ausencia de señalización de Wnt/Frizzled, la β -catenina se fosforila por interacciones con glucógeno sintasa quinasa (GSK)-3 β , y forma un complejo con axina y la proteína de poliposis adenomatosa del colon (APC). Posteriormente se dirige degradación a la β -catenina por el sistema de ubiquitin proteasoma. Por el contrario, la unión de un ligando Wnt con su receptor Frizzled estabiliza la β -catenina intracelular mediante la inhibición de la actividad enzimática de GSK-3 β . Posteriormente, la β -catenina se trasloca al núcleo en asociación con factores de dominio de grupo de alta movilidad tales como Tcf/Lef. Este complejo se asocia con regulación positiva de la transcripción de genes relacionados con la migración celular y el regulador del crecimiento.

35

[0006] La implicación de la ruta de transducción de señal de Wnt/ β -catenina en la patogénesis molecular del carcinoma hepatocelular humano (HCC) se ha descrito por Philippe Merle *et al.*, (Gastroenterology 2004; 127: 1110-1122) y se ha indicado sobreexpresión del receptor Frizzled-7 (FDZ7) humano en HCC. Sin embargo, los mecanismos moleculares que pueden conducir a la regulación positiva del gen FZD7 eran desconocidos y no se analizaron las interacciones receptor-ligando específicas de FZD7.

40

[0007] FZD7 se describió adicionalmente en Jennifer Willert *et al.*, (BMC Developmental Biology 2002, 2: 8) como un gen sensible a Wnt3A en células de carcinoma embrionario humano. Otras proteínas Wnt, tales como Wnt3 o Wnt11, no se han analizado en este estudio. Además, esta divulgación se restringe a células de carcinoma embrionario humano, sin mencionar o sugerir ningún papel o expresión de Wnt3A u otras proteínas Wnt en HCC o células del hígado.

45

[0008] Finalmente, se ha descrito un requisito de actividad de Wnt11 para regulación de los movimientos de gastrulación en vertebrados en el documento WO 03/092705 A1 y se creyó que Wnt11 señalizaba a través de FZD7. No se menciona la expresión de Wnt11 en otras células, tales como células del hígado, o regulación negativa de FZD7 a través de Wnt11.

50

55 **Descripción resumida**

[0009] La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que Wnt 3, 8b y 11 son ligandos de Frizzled 7, que normalmente está sobreexpresado al nivel de ARNm y proteínas en HCC, por ejemplo, en HCC relacionado con virus de hepatitis B (VHB). Las células de cáncer de hígado que sobreexpresan Frizzled 7 muestran motilidad y migración celular potenciadas. La sobreexpresión parece ser un acontecimiento temprano durante el proceso multietapa de la transformación de hepatocitos, y por lo tanto Frizzled 7 y Wnt 3, 8b y 11 son nuevas dianas moleculares para la terapia de cáncer de hígado.

60

[0010] En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona un método para identificar un agente anti cáncer de hígado. El método incluye seleccionar un compuesto de ensayo que se une con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína Wnt 3 o Wnt 11 o un fragmento de unión a FZD del mismo; y determinar si el compuesto de ensayo es capaz de (i) reducir la señalización de Wnt/FZD 7 en una célula de hígado, (ii) reducir la motilidad de células de cáncer de hígado, (iii) reducir la acumulación de β -catenina en una célula de cáncer de hígado; o (iv) tratar el cáncer de hígado *in vitro* o en un animal no humano *in vivo*; en el que un compuesto de ensayo que es capaz de al menos uno de (i) a (iv) es un agente anti cáncer de hígado. En algunas realizaciones, la selección de un compuesto de ensayo puede incluir proporcionar un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de Wnt 3 o Wnt 11 o un fragmento de unión a FZD del mismo, poner en contacto el polipéptido con un compuesto de ensayo, detectar la unión entre el polipéptido y el compuesto de ensayo, y seleccionar el compuesto de ensayo si se une al polipéptido. El polipéptido con el que se une un compuesto de ensayo puede ser (i) un polipéptido de origen natural, (ii) un polipéptido recombinante, (iii) un polipéptido expresado en la superficie de una célula o (iv) un polipéptido aislado. Cuando el polipéptido incluye la secuencia de aminoácidos de una proteína Wnt 3, el polipéptido puede incluir cualquiera de SEC ID N°: 8 a 12. Cuando el polipéptido incluye la secuencia de aminoácidos de una proteína Wnt 11, el polipéptido puede incluir cualquiera de SEC ID N°: 22 a 26. En ciertas realizaciones, el polipéptido incluye cualquiera de SEC ID N°: 7 a 13 y 21 a 27 y al menos una secuencia no Wnt. El compuesto de ensayo puede seleccionarse del grupo que consiste en polipéptidos, ácidos ribonucleicos, moléculas pequeñas (por ejemplo, moléculas pequeñas orgánicas) y ácidos desoxirribonucleicos.

[0011] Los agentes antineoplásicos identificados por los métodos para identificar un agente anti cáncer de hígado descrito en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo anti Wnt, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, receptores FZD7, fragmentos de unión a Wnt de receptores FZD7, y otros compuestos de unión a Wnt. Los agentes antineoplásicos identificados por estos métodos pueden usarse en el tratamiento de cáncer, por ejemplo, cáncer de hígado. Adicionalmente, un agente antineoplásico identificado por estos métodos puede usarse para fabricar un medicamento para tratar cáncer de hígado o reducir la motilidad de células de cáncer de hígado en un paciente.

[0012] En otro aspecto, la invención incluye un método para identificar un agente anti cáncer de hígado candidato. El método incluye (a) proporcionar un primer polipéptido que: (i) comprende un polipéptido de FZD 7 o un fragmento del mismo; y (ii) presenta capacidad de unión a Wnt (por ejemplo Wnt 3 u 11); (b) proporcionar un segundo polipéptido que: (i) comprende un polipéptido de Wnt 3 o Wnt 11 o un fragmento del mismo; y (ii) presenta capacidad de unión a FZD 7; (c) poner en contacto el primer y segundo polipéptidos en presencia de un compuesto de ensayo; y (d) comparar el nivel de unión entre el primer y segundo polipéptidos en presencia del compuesto de ensayo con el nivel de unión en ausencia del compuesto de ensayo, en el que un nivel reducido de unión en presencia del compuesto de ensayo que en su ausencia indica que el compuesto de ensayo es un agente antineoplásico candidato. El método puede incluir además: (e) determinar si el agente anticáncer de hígado candidato es capaz de: (i) reducir la señalización de Wnt/FZD 7 en una célula que exprese FZD 7; (ii) reducir la motilidad de células de cáncer de hígado; (iii) reducir la acumulación de β -catenina en una célula de cáncer de hígado; o (iv) tratar el cáncer de hígado *in vitro* o en un animal no humano *in vivo*; en el que un candidato que es capaz de al menos uno de (i) a (iv) es un agente anti cáncer de hígado. El compuesto de ensayo puede seleccionarse del grupo que consiste en polipéptidos, ácidos ribonucleicos, moléculas pequeñas (por ejemplo, moléculas orgánicas pequeñas) y ácidos desoxirribonucleicos. El polipéptido de Wnt puede incluir, por ejemplo, SEC ID N°: 8 a 12 y/o 22 a 26. El polipéptido de FZD puede incluir, por ejemplo, SEC ID N°: 1, 2 y/o 3.

[0013] En ciertas realizaciones, el primer polipéptido es una primera proteína de fusión que comprende un polipéptido de FZD (por ejemplo, polipéptido de FZD7) fusionado con (i) un dominio de activación de la transcripción de un factor de transcripción o (ii) un dominio de unión a ADN de un factor de transcripción; el segundo polipéptido es una segunda proteína de fusión que comprende un polipéptido de Wnt (por ejemplo, un polipéptido de Wnt 3 u 11) fusionado con (i) un dominio de activación de la transcripción de un factor de transcripción o (ii) un dominio de unión a ADN de un factor de transcripción, en el que el polipéptido de Wnt está fusionado con un dominio diferente del que se fusiona con el polipéptido de Wnt; y la unión del primer y segundo polipéptido se detecta como reconstitución de un factor de transcripción.

[0014] Los agentes antineoplásicos (y/o agentes antineoplásicos candidatos) identificados por los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse en el tratamiento de cáncer, por ejemplo, cáncer de hígado. Adicionalmente, los agentes antineoplásicos (y/o agentes antineoplásicos candidatos) identificados por los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer, por ejemplo, cáncer de hígado.

[0015] En otro aspecto más, la invención proporciona un método para determinar si una célula de hígado es, o está en riesgo de convertirse en, una célula cancerosa. El método incluye (a) proporcionar una célula de hígado de ensayo; (b) determinar si el nivel de expresión de Wnt3 de la célula es mayor que el de una célula de control; y (c) clasificar la célula de ensayo como (i) una célula cancerosa o (ii) en riesgo de convertirse en una célula cancerosa, si el nivel de expresión de Wnt3 de la célula de ensayo es mayor que el de la célula de control. Cuando el método

incluye determinar el nivel de expresión de Wnt3 de la célula, el método puede incluir además: (c) determinar si el nivel de expresión de Wnt11 de la célula de ensayo es menor que el de una célula de control, en la que un nivel menor de expresión de Wnt11 indica que la célula de ensayo es, o está en riesgo de convertirse en, una célula cancerosa. Cuando el método incluye determinar el nivel de expresión de Wnt11 de la célula, el método puede

5 incluir además: (c) determinar si el nivel de expresión de FZD7 de la célula de ensayo es mayor que el de una célula de control, en la que un nivel mayor de expresión de FZD7 indica que la célula de ensayo es, o está en riesgo de convertirse en, una célula cancerosa.

[0016] En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para determinar si un paciente padece o está

10 en riesgo de cáncer de hígado, por ejemplo, si una muestra tisular de ensayo viene de un paciente que padece o está en riesgo de cáncer. El método puede incluir: proporcionar una muestra tisular de ensayo de hígado (tal como tejido de hígado tumoral o peritumoral) obtenido de un paciente, y (b) determinar si el nivel de expresión de Wnt3 es mayor, y opcionalmente además si el nivel de expresión de Wnt11 es menor, en la muestra tisular de ensayo que en la de una muestra tisular comparable obtenida de un individuo sano, en el que un nivel mayor de expresión de Wnt3

15 y/o un nivel menor de expresión de Wnt11 en la muestra tisular de ensayo es un indicio de que la muestra es de un paciente que padece o está en riesgo de cáncer. Cuando el método incluye determinar el nivel de expresión de Wnt3, el método puede incluir además: (c) determinar si el nivel de expresión de Wnt11 en la muestra tisular de ensayo es menor que el de una muestra tisular obtenida de un individuo sano, en el que un nivel de expresión menor de Wnt11 es un indicio de que la muestra viene de un paciente que padece o está en riesgo de cáncer. Cuando el

20 método incluye determinar el nivel de expresión de Wnt11, el método puede incluir además: (c) determinar si el nivel de expresión de Wnt3 en la muestra tisular de ensayo es mayor que el de una muestra tisular obtenida de un individuo sano, en el que un nivel de expresión mayor de Wnt3 es un indicio de que el paciente padece o está en riesgo de cáncer.

25 **[0017]** En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, la determinación del nivel de expresión de Wnt3 o Wnt11 puede incluir determinar la cantidad de ARNm de Wnt3 o Wnt11 en la célula, por ejemplo, usando un ensayo de transferencia de Northern o un ensayo de RT-PCR. En otras realizaciones, la determinación del nivel de expresión puede incluir determinar la cantidad de proteína Wnt3 o Wnt11 en la célula, por ejemplo, usando un anticuerpo anti Wnt, por ejemplo, un anticuerpo que se une a SEC ID N°: 7 u 80.

30 **[0018]** En otro aspecto más, la invención incluye un anticuerpo o una composición para su uso en el tratamiento de cáncer de hígado en un paciente. El uso incluye administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto que reduce la señalización de Wnt/FZD7 en células que expresan FZD7 del paciente y que es opcionalmente no letal para las células que expresan FZD7. En una realización, el compuesto es un compuesto que reduce la expresión de

35 Wnt3 en el paciente y/o aumenta la expresión de Wnt11 en el paciente. En otra realización, el compuesto es un compuesto que se une a Wnt3 en el paciente. El compuesto puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido, un ARN bicatenario (ARNbc) que incluye una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones fisiológicas con una secuencia de nucleótidos de Wnt, o una construcción genética que codifica un polipéptido de Wnt (por ejemplo, un polipéptido de Wnt11) y/o anticuerpo anti Wnt (por ejemplo, anticuerpo anti Wnt3). El compuesto puede

40 administrarse por cualquier vía, por ejemplo, por administración al hígado del paciente. En ciertas realizaciones, el compuesto es un anticuerpo que se une a SEC ID N°: 80. En otras realizaciones, el compuesto es un ARNip que comprende SEC ID N°: 81, 82 u 83.

45 **[0019]** En otro aspecto más, la invención incluye un compuesto para su uso en el tratamiento de cáncer de hígado o para su uso en la motilidad de una célula de cáncer de hígado en un paciente. El método incluye administrar a la célula una cantidad eficaz de un compuesto capaz de reducir la señalización de Wnt/FZD7 en la célula y que es opcionalmente no letal para la célula. En una realización, el compuesto es un compuesto que reduce la expresión de Wnt3 en el paciente. En otra realización, el compuesto es un compuesto que se une a Wnt3. El compuesto puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido, o un ARN bicatenario (ARNbc) que incluye una secuencia de

50 nucleótidos que hibrida en condiciones fisiológicas con una secuencia de nucleótidos de Wnt, un ARNip que reduce la expresión de Wnt3 en el paciente o un anticuerpo anti Wnt3. El compuesto puede administrarse por cualquier vía, por ejemplo, por administración al hígado del paciente. En ciertas realizaciones, el compuesto es un anticuerpo que se une a SEC ID N°: 80. En otras realizaciones, el compuesto es un ARNip que comprende SEC ID N°: 81, 82 u 83.

55 **[0020]** También se describe en la presente memoria el uso de un compuesto que reduce la señalización de Wnt/FZD7 en células que expresan FZD7 en la fabricación de (i) un medicamento para el tratamiento de cáncer de hígado o (ii) un medicamento que reduce la motilidad de células de cáncer de hígado. Opcionalmente, el medicamento es no letal para células que expresen FZD7. En una realización, el compuesto es un compuesto que reduce la expresión de FZD7 y/o Wnt3 en el paciente y/o aumenta la expresión de Wnt11 en el paciente. El

60 compuesto puede ser un compuesto que se une a Wnt 3, Wnt 8b, Wnt 11, FZD7 o FZD8 en el paciente. El compuesto puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido, un ARN bicatenario (ARNbc) que incluye una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones fisiológicas con una secuencia de nucleótidos de Wnt, un receptor FZD7 aislado o un fragmento de unión a Wnt3 del mismo, una construcción genética que codifica un polipéptido de Wnt (por ejemplo, un polipéptido de Wnt11) o forma truncada de FZD7 (por ejemplo, una forma de

65 FZD7 carece del dominio intracelular y/o transmembrana de FZD7) y/o un anticuerpo anti FZD y/o anti Wnt (por

ejemplo, anticuerpo anti Wnt3).

[0021] En ciertos aspectos, la invención incluye un anticuerpo anti Wnt3 que se une con la secuencia de aminoácidos LRAKYS-LFKPPTERDL (SEC N°: 80). El anticuerpo puede incluirse en una composición farmacéutica adecuada para administración a un paciente.

[0022] También se describe el uso de cualquiera de los compuestos descritos en la presente memoria en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de una afección descrita en la presente memoria, por ejemplo, cáncer, por ejemplo, cáncer de hígado. La composición puede usarse en el tratamiento de cáncer y/o para reducir la motilidad de una célula cancerosa de acuerdo con los usos descritos en la presente memoria. La composición puede estar en cualquier forma descrita en la presente memoria, por ejemplo, una composición líquida o sólida. En ciertas realizaciones, el compuesto es un anticuerpo que se une con la secuencia de aminoácidos LRAKYS-LFKPPTERDL (SEC N°: 80). En otras realizaciones, el compuesto es un ARNip, por ejemplo, un ARNip que comprende la secuencia de ácido nucleico WNT3-1: 5'-GGAAAAAUGCCACUGCAUC-3' (SEC N°: 81), WNT3-2: 5'-GGAGUGUAUUCGCAUCUAC-3' (SEC ID N°: 82) y/o WNT3-3: 5'-GGCUUAUCUUUGCACAUGU-3' (SEC N°: 83).

[0023] También se describen en la presente memoria ácidos nucleicos (por ejemplo, un cebador descrito en la Tabla 1, posteriormente) que son útiles para detectar proteínas Wnt.

[0024] A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Se describen posteriormente métodos y materiales adecuados, aunque pueden usarse en la práctica o ensayo de la presente invención métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

[0025] Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

[0026]

La Figura 1A es un conjunto de imágenes de geles de SDS-PAGE bidimensionales teñidos con plata que ilustran un patrón de proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) fraccionados de células Huh7 después del tratamiento con heparina (Hep +) o sin tratamiento (Hep -) de las células Huh7. Las fracciones de NaCl 0,25 M de cromatografía de afinidad de heparina se separaron en geles de IPG no lineales de pH 3-10 unidimensionales y geles de NuPAGE de gradiente 4-12% bidimensionales. Un punto proteico (rodeado; denominado en lo sucesivo en la presente memoria "punto 2") de la fracción no tratada con heparina mostró expresión aumentada.

La Figura 1B es un espectro de masas de péptidos tripticos obtenidos del punto 1. El punto 1 se escindió, destiñó y digirió con tripsina. Las masas peptídicas se analizaron en un instrumento PBSII. Los picos marcados (*) representan péptidos que coincidieron con las masas calculadas de los péptidos Wnt-11 humanos.

La Figura 1C son imágenes de geles de agarosa que ilustran la detección de ARNm de ligando Wnt en diversas líneas celulares de carcinoma hepatocelular usando RT-PCR. Se detectó ARNm de Wnt-3 en todas las líneas celulares de HCC y se detectó ARNm de Wnt-11 en 3 líneas de HCC pero no en células focus. No fueron detectables otros ARNm de Wnt por RT-PCR.

La Figura 2A es un gráfico de barras que ilustra los niveles de ARNm de Wnt3 como se determina por qRT-PCR en líneas celulares de HCC. Se usaron los niveles de ARNr18S como controles internos, y los niveles de ARNm de Wnt3 y Wnt11 se expresaron como números de copias por 10^9 ARNr18S. Los niveles de expresión (media \pm DT) de ARNm de Wnt3 en líneas celulares de HCC fueron $370,0 \pm 10,3$ en HepG2, $381,3 \pm 12,7$ en Hep3B, $95,2 \pm 6,3$ en Huh7 y $210,4 \pm 9,5$ copias por 10^9 ARNr18S.

La Figura 2B es un gráfico de barras que ilustra los niveles de ARNm de Wnt11 como se determina por qRT-PCR en líneas celulares de HCC. Los niveles de ARNr18S se usaron como controles internos, y los niveles de ARNm de Wnt11 se expresaron como números de copias por 10^9 ARNr18S. Los niveles de expresión de ARNm de Wnt11 fueron $8.499,3 \pm 845,0$ en HepG2, $290,9 \pm 40,1$ en Hep3B y $3,57 \pm 0,2$ copias por 10^9 ARNr18S en células Huh7. No se pudo detectar ARNm de Wnt11 en células focus con qRT-PCR, lo que es coherente con el resultado de RT-PCR convencional.

La Figura 3A es un gráfico de barras que ilustra la expresión de ARNm de Wnt3 en tejidos de HCC humanos. Los niveles de ARNm se midieron por qRT-PCR. Las barras blancas representan los niveles de ARNm en tejidos de hígado normales. Las barras negras representan niveles de ARNm en tejidos de HCC. Las barras grises representan niveles de ARNm en tejidos peritumorales correspondientes. Los experimentos se realizaron por duplicado y los datos se expresan como la media \pm DT. Setenta y cinco por ciento de los HCC y 59% de los tejidos peritumorales mostraron niveles de expresión de ARNm de Wnt3 aumentados por encima del valor de la

media \pm 3 DT en tejidos de hígados normales. Setenta y uno por ciento de los tejidos de HCC tenían niveles de expresión de ARNm de Wnt3 aumentados en comparación con los de los tejidos peritumorales correspondiente.

La Figura 3B es un gráfico de barras que ilustra la expresión de ARNm de Wnt11 en tejidos de HCC humanos. Los niveles de ARNm se midieron por qRT-PCR. Las barras blancas representan niveles de ARNm en tejidos de hígado normales. Las barras negras representan niveles de ARNm en tejidos de HCC. Las barras grises representan niveles de ARNm en tejidos peritumorales correspondientes. Los experimentos se realizaron por duplicado y los datos se expresan como la media \pm DT. Cuarenta y uno por ciento de los tejidos de HCC mostraron expresión reducida incluso por debajo del nivel de punto de corte menor de los tejidos de hígado normales, mientras que ninguno lo hizo en tejidos peritumorales ($P = 0,0036$ por ensayo exacto de Fischer). Sesenta y cinco por ciento de las muestras emparejadas también mostraron expresión reducida de ARNm de Wnt11 en tumores en comparación con tejidos peritumorales correspondientes.

La Figura 3C es un gráfico de barras que ilustra la expresión de ARNm de FZD7 en tejidos de HCC humanos. Los niveles de ARNm se midieron por qRT-PCR. Las barras blancas representan los niveles de ARNm en tejidos de hígado normales. Las barras negras representan niveles de ARNm en tejidos de HCC. Las barras grises representan los niveles de ARNm en tejidos peritumorales correspondientes. Los experimentos se realizaron por duplicado y los datos se expresan como la media \pm DT. Cincuenta y nueve por ciento de tejidos tanto HCC como peritumorales mostraron expresiones de ARNm de FZD7 aumentadas en comparación con las de tejidos de hígado normales. Setenta y uno por ciento de las muestras emparejadas mostraron expresión aumentada de ARNm de FZD7 en tumores en comparación con tejidos peritumorales correspondientes ($P = 0,031$ por ensayo de rangos con signo de Wilcoxon).

Las Figuras 4A-4D son imágenes de tejidos de HCC y peritumorales humanos teñidos inmunohistoquímicamente (aumento x400). Figura 4A: control negativo. Figura 4B: tejidos peritumorales teñidos con β -catenina. Los hepatocitos mostraron tinción membranosa típica. Figura 4C: tejidos de HCC teñidos con β -catenina, que presentan acumulación nuclear de β -catenina. Obsérvese la tinción nuclear además de la tinción citoplasmática aumentada de β -catenina. Figura 4D: tejidos de HCC, que no presentan acumulación nuclear o citoplasmática de β -catenina.

La Figura 5A es una imagen compuesta de transferencias de Western que ilustra el efecto de la transfección con plásmido de Wnt3 en las actividades transcripcionales del factor de linfocitos T (Tcf) en las líneas celulares de HCC. Se cotransfectaron células Focus, Huh7 y Hep3B con plásmido de Wnt3 marcado con *myc* o plásmido pcDNA3.1/*myc*-His A, pSUPER8xTOPFLASH o pSUPER8xFOPFLASH, y plásmido de β -galactosidasa. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se privaron de suero durante 24 horas, y después se estimularon con MEM FBS 1%. Las células se recogieron a las 2 horas y 24 horas después de la estimulación y se sometieron a un ensayo de luciferasa y análisis de transferencia de Western para Wnt3 y β -catenina. Los análisis de transferencia de Western con anticuerpo policlonal de conejo anti Wnt3 mostraron un aumento de proteína Wnt3 después de la transfección. La especificidad del anticuerpo policlonal anti Wnt3 se verificó con anticuerpo monoclonal anti *myc*. Obsérvese el aumento de los niveles de β -catenina celulares en células Focus. Se usó proteína Hsp90 como control de carga interna.

La Figura 5B es un gráfico de barras que ilustra cambios en la actividad transcripcional de Tcf en líneas celulares de HCC después de la transfección con plásmido de Wnt3. Las actividades transcripcionales de Tcf aumentaron 3 veces en células Focus después de la transfección, en comparación con las de células Focus transfectadas con plásmido de control. Las actividades transcripcionales de Tcf se redujeron ligeramente en células Huh7 y no se cambiaron en células Hep3B después de la transfección. Las barras blancas indican células transfectadas con el plásmido de control (pcDNA) y las barras negras indican células transfectadas con plásmido de Wnt3.

La Figura 6A es un gráfico de barras que ilustra los efectos de anticuerpos anti Wnt3 en las actividades transcripcionales de Tcf en líneas celulares de HCC. Se sembraron células de HCC en placas de 12 pocillos y se transfectaron con pSUPER8xTOPFLASH o pSUPER8xFOPFLASH con plásmido de β -galactosidasa. Las células se privaron de suero durante 24 horas y las células se incubaron posteriormente con FBS MEM 1% que contenía anticuerpos anti Wnt3 (Wnt3-Ab; barras negras) o anticuerpos de control (10 μ g/ml) y se recogieron 24 horas después de la incubación. Se usó IgG de conejo normal como un anticuerpo de control (C-Ab; barras blancas). Las actividades transcripcionales de Tcf se redujeron en 60% en Huh7, 26% en Hep3B y 40% en células Focus con tratamiento con anticuerpo policlonal anti Wnt3.

La Figura 6B es un gráfico de barras que ilustra el efecto de los ARNip en la expresión de ARNm de Wnt3 endógeno. Se transfectaron ARNip de control y ARNip de Wnt3 (WNT3-3) a una concentración de 10 o 100 nM en células de HCC. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recogieron células y se midieron los niveles de expresión de ARNm de Wnt3 usando qRT-PCR. El ARNip Wnt3-3 provocó una reducción de los niveles de ARNm en 50-60% de media a una concentración de 100 nM en las 3 líneas celulares.

La Figura 6B es representativa de este efecto en células Huh7.

La Figura 6C es un gráfico de barras que ilustra los efectos de ARNip de Wnt3 en las actividades transcripcionales de Tcf o líneas celulares de HCC. Se cotransfectó ARNip de Wnt3 o ARNip de control en presencia de indicador de Tcf a las concentraciones indicadas (nM). Las actividades transcripcionales de Tcf se redujeron en 48,5% en Huh7, 33% en Hep3B y 43,5% en células Focus.

La Figura 7 son imágenes de cultivos celulares que ilustran la curación de heridas retardada en células Focus tratadas con anticuerpos anti Wnt3. Las células Focus se sembraron en una placa de 6 pocillos. Se hirieron células en monocapa confluyentes con puntas de micropipeta de 200 μ l de plástico estéril. Las células se trataron

después con medio bien con Ab anti Wnt3 o bien con IgG de conejo (anticuerpos de control (C Ab); 10 µg/ml), y se fotografiaron en diferentes puntos temporales. Las células Focus tratadas con Ab anti Wnt3 mostraron curación de heridas retardada. Este efecto fue más prominente a las 24 horas. A las 24 horas, la mayor parte de la herida estaba cubierta con células migrantes y/o en proliferación en células tratadas con C Ab, mientras que

5 persistía en las tratadas con Ab anti Wnt3.
Las Figuras 8A-8E ilustran secuencias de aminoácidos humanos y de ratón de FZD7, FZD8, Wnt3, Wnt 8b y Wnt 11 ejemplares, incluyendo motivos de unión potenciales.

Descripción detallada

10 **[0027]** La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que partículas Frizzled (FZD) particulares, por ejemplo, FZD 7 y 8, están asociadas con ciertos cánceres, tales como cáncer de hígado, y que Wnt3, 8b y 11 son ligandos de FZD. En consecuencia, la presente memoria proporciona, entre otros, métodos para
15 usar proteínas Wnt y FZD, genes, anticuerpos específicos de FZD y sondas en el diagnóstico y tratamiento de cáncer y para explorar compuestos de ensayo con respecto a una capacidad para tratar cáncer. También se desvelan compuestos útiles para tratar cáncer tal como cáncer de hígado.

Ácidos nucleicos, proteínas, vectores y células hospedadoras

20 **[0028]** Las expresiones “Frizzled”, “FZD”, “proteína Frizzled” y “receptor Frizzled” se refieren a una familia de proteínas de mamífero relacionadas con los genes Frizzled de *Drosophila*, que desempeñan un papel en el desarrollo de la polaridad tisular. La familia Frizzled comprende al menos 10 genes de mamífero. Los receptores Frizzled ejemplares incluyen Frizzled 1, Frizzled 2, Frizzled 3, Frizzled 4, Frizzled 5, Frizzled 6, Frizzled 7, Frizzled 8, Frizzled 9 y Frizzled 10. Los receptores Frizzled están implicados en un modelo dinámico de transducción de señal
25 transmembrana análogo a los receptores acoplados a proteína G con dominios de unión a ligando amino terminales.

[0029] Las expresiones “proteína Wnt” “ligando Wnt” y “Wnt” se refieren a una familia de proteínas de mamífero relacionadas con el gen de polaridad de segmentos de *Drosophila*, wingless. En seres humanos, la familia Wnt de genes típicamente codifica glicoproteínas ricas en cisteína de 38 a 43 kDa que tienen una secuencia señal hidrófoba
30 y una secuencia consenso de oligosacárido ligado a asparagina (véase por ejemplo, Shimizu *et al.*, Cell Growth Differ 8: 1349-1358 (1997)). La familia Wnt contiene al menos 19 miembros de mamífero. Las proteínas Wnt ejemplares incluyen Wnt-1, Wnt-2, Wnt-2b (también conocida como Wnt-13), Wnt-3, Wnt-3A, Wnt-4, Wnt-5A, Wnt-5B, Wnt-6, Wnt-7A, Wnt-7B, Wnt-8A, Wnt-8B, Wnt-10A, Wnt-10B, Wnt-11, Wnt 14, Wnt 15 y Wnt 16.

35 **[0030]** Además de los ligandos Wnt, se ha aislado una familia de proteínas relacionadas con Frizzled secretadas (sFRP). Las sFRP parecen actuar como moduladores endógenos solubles de la señalización de Wnt compitiendo con los receptores Frizzled transmembrana por la unión de ligandos Wnt secretados. Las sFRP pueden antagonizar la función de Wnt uniéndose con la proteína y bloqueando el acceso a su receptor de señalización de superficie celular, o pueden potenciar la actividad de Wnt facilitando la presentación de ligando a los receptores Frizzled.

40 **[0031]** La expresión “ruta de señalización de Wnt/FZD” se refiere a una ruta de transducción de señal intracelular que se inicia por una interacción entre un receptor Frizzled, por ejemplo, FZD7, y uno o más de sus ligandos, por ejemplo, una proteína Wnt, por ejemplo, Wnt3, 8b u 11. Típicamente, una interacción Wnt/FZD implica la unión de una proteína Wnt, por ejemplo, Wnt3, 8b u 11, con un receptor Frizzled, por ejemplo, FZD 7, lo que conduce a la
45 activación de una ruta de transducción de señal. En algunos casos, la activación de la ruta de señalización de Wnt/Frizzled conducirá a inducción de genes inducibles por FZD y/o Wnt corriente abajo. Un “producto génico regulado por Wnt/FZD corriente abajo” es una proteína o ARN que está regulado (por ejemplo, regulado positiva o negativamente) como resultado de la señalización por una ruta de señalización de Wnt/FZD.

50 **[0032]** La invención puede incluir el uso de ciertos ácidos nucleicos de FZD y Wnt. Por ejemplo, la presente invención puede incluir el uso de ciertos ácidos nucleicos de FZD 7, tales como los que codifican las secuencias de aminoácidos de los receptores FZD 7 humano y de ratón ejemplares (SEC ID N°: 1 y 3, respectivamente) expuestos en la Figura 8A. Como otro ejemplo, la invención incluye el uso de ciertos ácidos nucleicos de Wnt3 y 11, tales como los que codifican las secuencias de aminoácidos de las proteínas humana y de ratón Wnt 3 (SEC ID N°: 7 y 13,
55 respectivamente) y 11 (SEC ID N°: 21 y 27, respectivamente) ejemplares expuestas en las Figuras 8A a 8E.

[0033] También se describe y/o reivindica el uso de ciertos fragmentos de ácidos nucleicos de FZD y Wnt, por ejemplo, un fragmento de una secuencia de ácido nucleico que codifica SEC ID N°: 1, 3, 4, 6, 7, 13, 14, 20, 21 o 27. Los fragmentos de ácidos nucleicos de FZD o Wnt codifican al menos un fragmento útil de un polipéptido de FZD o
60 Wnt (por ejemplo, un polipéptido humano o de roedor), respectivamente, tal como un dominio de unión (por ejemplo, un dominio CDR) u otro fragmento útil. Por ejemplo, un fragmento útil de un ácido nucleico de FZD puede codificar un fragmento de un receptor FZD que tiene actividad de unión, por ejemplo, un fragmento correspondiente a SEC ID N°: 3 o 5. Como otro ejemplo, un fragmento útil de un ácido nucleico de Wnt puede codificar un fragmento de un polipéptido de Wnt que tiene actividad de unión, por ejemplo, un fragmento correspondiente a cualquiera o más de
65 SEC ID N°: 8 a 12, 15 a 19 y 22 a 26.

[0034] Los ácidos nucleicos de FZD y Wnt descritos en la presente memoria incluyen tanto ARN como ADN, incluyendo ADN genómico y ADN sintético (por ejemplo, químicamente sintetizado). Los ácidos nucleicos pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Cuando sea monocatenario, el ácido nucleico puede ser una cadena con sentido o una cadena antisentido. Los ácidos nucleicos pueden sintetizarse usando análogos o derivados de oligonucleótidos (por ejemplo, nucleótidos de inosina o fosforotioato). Dichos oligonucleótidos pueden usarse, por ejemplo, para preparar ácidos nucleicos que tengan capacidades de formación de pares de bases alteradas o resistencia a nucleasas aumentada.

[0035] Un “ácido nucleico aislado” es un ácido nucleico cuya estructura no es idéntica a la de ningún ácido nucleico de origen natural o a la de ninguno que abarque más de tres genes separados. El término abarca por lo tanto, por ejemplo, (a) un ADN que tiene la secuencia de parte de una molécula de ADN genómico de origen natural pero no está flanqueada por ambas de las secuencias codificantes que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en el que aparece de forma natural; (b) un ácido nucleico incorporado en un vector o en el ADN genómico de un procarionta o eucariota de manera que la molécula resultante no sea idéntica a ningún ADN genómico o de vector de origen natural; (c) una molécula separada tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que es parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica una proteína de fusión. Específicamente se excluyen de la presente definición ácidos nucleicos presentes en mezclas de (i) moléculas de ADN, (ii) células transfectadas; y (iii) clones celulares, por ejemplo, ya que estos aparecen en una biblioteca de ADN tal como una biblioteca de ADNc o ADN genómico.

[0036] En algunas realizaciones, la invención incluye el uso de secuencias de ácido nucleico que son sustancialmente homólogas de un ácido nucleico de FZD o Wnt. Una secuencia de ácido nucleico que es “sustancialmente homóloga” de un ácido nucleico de FZD o Wnt es al menos 75% homóloga de secuencias de ácido nucleico de FZD o Wnt que codifican cualquiera de SEC ID N°: 1 a 27. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico sustancialmente homólogas pueden ser al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o al menos aproximadamente 99% homólogas de secuencias que codifican SEC ID N°: 1 a 27. Para fines de comparación de ácidos nucleicos, la longitud de la secuencia de ácido nucleico de referencia será de al menos 50 nucleótidos, pero puede ser mayor, por ejemplo, al menos 60 nucleótidos o más nucleótidos.

[0037] Como se usa en la presente memoria, el “porcentaje de homología” de dos secuencias de aminoácidos o dos secuencias de ácido nucleico se determina usando el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90: 5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, *et al.* (1990); J. Mol. Biol. 215: 403-410. Se realizan búsquedas de nucleótidos por BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas de moléculas de ácido nucleico de FZD o Wnt usadas en la invención. Se realizan búsquedas de proteínas por BLAST con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas de un polipéptido de referencia. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, se utiliza BLAST con Huecos como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. Cuando se utilizan programas de BLAST y BLAST con Huecos, se usan los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase la Web en la dirección ncbi.nlm.nih.gov.

[0038] La invención también incluye el uso de ácidos nucleicos que hibridan en condiciones de hibridación rigurosas (como se definen en la presente memoria) con todas o una parte de las secuencias de nucleótidos que codifican cualquiera de los SEC ID N°: 1 a 27, o con un complemento de dichas secuencias de ácido nucleico. La parte hibridante de los ácidos nucleicos de hibridación es típicamente de al menos 15 (por ejemplo, 20, 25, 30, o 50) nucleótidos de longitud. La parte hibridante del ácido nucleico de hibridación es al menos aproximadamente 75% (por ejemplo, al menos 80%, 90%, 95% o 98%) idéntica a la secuencia de una parte de o todo un ácido nucleico que codifica un polipéptido de FZD o Wnt, o a su complemento. Pueden usarse ácidos nucleicos de hibridación del tipo descrito en la presente memoria, por ejemplo, como una sonda de clonación, un cebador (por ejemplo, un cebador de PCR) o una sonda de diagnóstico. La hibridación de la sonda oligonucleotídica con una muestra de ácido nucleico típicamente se realiza en condiciones rigurosas. La estabilidad del híbrido o doble cadena de ácido nucleico se expresa como la temperatura de fusión o T_m , que es la temperatura a la que una sonda se disocia de un ADN diana. Esta temperatura de fusión se usa para definir las condiciones de rigurosidad requeridas. Si van a identificarse secuencias que están relacionadas y son sustancialmente idénticas a la sonda, en lugar de idénticas, entonces es útil establecer en primer lugar la menor temperatura a la que se produce solamente hibridación homóloga con una concentración particular de sal (por ejemplo, SSC o SSPE).

[0039] Después, asumiendo que un emparejamiento erróneo de 1% da como resultado una reducción de 1 °C en la T_m , la temperatura del lavado final en la reacción de hibridación se reduce en consecuencia (por ejemplo, si se buscan secuencias que tengan >95% de identidad con la sonda, la temperatura de lavado final se reduce en 5 °C). En la práctica, el cambio de T_m puede ser de entre 0,5 °C y 1,5 °C por cada 1% de emparejamiento erróneo. Las condiciones rigurosas implican hibridar a 68 °C en SSC 5x/solución de Denhardt 5x/SDS 1,0%, y lavar en SSC 0,2x/SDS 0,1% a temperatura ambiente. Las condiciones moderadamente rigurosas incluyen lavar en SSC 3x a 42

°C. Los parámetros de concentración salina y temperatura pueden variarse para conseguir el nivel óptimo de identidad entre la sonda y el ácido nucleico diana. Están fácilmente disponibles en la técnica directrices adicionales con respecto a dichas condiciones, por ejemplo, por Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N. Y.; y Ausubel *et al.* (eds.), 1995, Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, N. Y.) en la Unidad 2.10.

[0040] Los ácidos nucleicos que hibridan con la secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las SEC ID N°: 1 a 27 se consideran "oligonucleótidos antisentido".

10 **[0041]** También se incluyen en la invención construcciones genéticas (por ejemplo, vectores y plásmidos) que incluyen un ácido nucleico de FZD y/o Wnt descrito en la presente memoria, unidas operativamente con una secuencia de transcripción y/o traducción para permitir la expresión, por ejemplo, vectores de expresión. Un ácido nucleico seleccionado, por ejemplo, una molécula de ADN que codifica un polipéptido de FZD o Wnt, está "unido operativamente" con otra molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un promotor, cuando se sitúa de tal modo que la
15 otra molécula pueda dirigir la transcripción y/o traducción del ácido nucleico seleccionado. Por ejemplo, el ácido nucleico seleccionado puede situarse adyacente a la otra molécula de ácido nucleico.

[0042] También se incluyen en la invención diversas células modificadas por ingeniería genética que contienen un ácido nucleico de FZD y/o Wnt descrito en la presente memoria. Por ejemplo, la invención incluye células
20 hospedadoras transformadas, es decir, células en las que (o en un antecesor de las que) se ha introducido, por medio de técnicas de ADN recombinante, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de FZD y/o Wnt. Se incluyen células tanto procariontas como eucariotas, por ejemplo, células de mamífero (por ejemplo, células del hígado), hongos y bacterias (tales como *Escherichia coli*) y similares. Una célula modificada por ingeniería genética ejemplar del tipo incluido en la invención es una célula de hígado que sobreexpresa un transgén de FZD 7.

25 **[0043]** Una célula que "sobreexpresa FZD" es una célula cancerosa y/o célula transgénica en la que la expresión de una proteína FZD particular tal como FZD 7 y/u 8, es al menos aproximadamente 1,5 veces, por ejemplo, al menos aproximadamente 2, 3, 4 o 5 veces, el nivel de expresión en una célula no cancerosa o célula no transgénica, respectivamente, del mismo tipo tisular. En algunas realizaciones, la expresión de FZD en una célula puede compararse con la expresión en una célula no cancerosa o no transgénica de un tipo tisular diferente o un panel de
30 células no cancerosas o no transgénicas de un tipo tisular diferente. Además, la expresión de un tipo de proteína FZD (por ejemplo, FZD 7) puede compararse con otras proteínas FZD en la misma célula. Se conocen bien en la técnica métodos para determinar el nivel de expresión de un gen particular. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, RT-PCR, PCR en tiempo real y uso de anticuerpos contra los productos génicos.

35 **[0044]** El uso de ciertos polipéptidos de FZD y Wnt también se incluye dentro de la presente invención. Los ejemplos de polipéptidos de FZD usados en la presente invención son polipéptidos de FZD humanos y de ratón, tales como los mostrados en las SEC ID N°: 1 y 3, respectivamente. Los ejemplos de polipéptidos de Wnt usados en la presente invención son polipéptidos de Wnt 3 y 11 humanos y de ratón, tales como los mostrados en SEC ID N°:
40 7, 13, 21 y 27. También se incluyen usados en la presente invención ciertos fragmentos de polipéptidos de FZD y Wnt, por ejemplo, fragmentos de SEC ID N°: 1, 3, 7, 13, 21 y 27. Los fragmentos de polipéptidos de FZD y Wnt pueden incluir al menos un dominio de unión, u otra parte útil de un polipéptido de FZD y Wnt de longitud completa. Por ejemplo, los fragmentos útiles de polipéptidos de FZD y Wnt incluyen, pero sin limitación, fragmentos que tienen actividad de unión (por ejemplo, SEC ID N°: 2, 5, 8 a 12 y 22 a 26).

45 **[0045]** Los términos "proteína" y "polipéptido" se refieren ambos a cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o modificación postraducciona (por ejemplo, glicosilación o fosforilación). Por lo tanto, las expresiones "proteína Frizzled", "proteína Wnt", "polipéptido de Frizzled" y "polipéptido de Wnt" incluyen proteínas aisladas de origen natural de longitud completa, así como polipéptidos producidos de forma recombinante
50 o sintética que corresponden a las proteínas de origen natural de longitud completa o a un fragmento del polipéptido de origen natural o sintético de longitud completa.

[0046] Como se ha analizado anteriormente, las expresiones "polipéptido de Frizzled" y "polipéptido de Wnt" incluyen fragmentos biológicamente activos de polipéptidos de FZD y Wnt de origen natural o sintético,
55 respectivamente. Los fragmentos de una proteína pueden producirse por cualquiera de una diversidad de métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, de forma recombinante, por digestión proteolítica o por síntesis química. Pueden generarse fragmentos internos o terminales de un polipéptido retirando uno o más nucleótidos de un extremo (para un fragmento terminal) o ambos extremos (para un fragmento interno) de un ácido nucleico que codifica el polipéptido. La expresión de dicho ADN mutado puede producir fragmentos polipeptídicos.
60 La digestión con endonucleasas "de recorte de extremos" pueden generar ADN que codifiquen una serie de fragmentos. También pueden generarse ADN que codifiquen fragmentos de una proteína, por ejemplo, por corte aleatorio, digestión de restricción, síntesis química de oligonucleótidos, amplificación de ADN usando la reacción en cadena de la polimerasa, o una combinación de los métodos anteriormente analizados. Los fragmentos también pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en este campo, por ejemplo, química de t-Boc o
65 FMOC de fase sólida de Merrifield convencional.

[0047] Un compuesto purificado o aislado es una composición que es al menos 60% en peso del compuesto de interés, por ejemplo, un polipéptido de FZD, polipéptido de Wnt o anticuerpo. Por ejemplo, la preparación puede ser al menos 75% (por ejemplo, al menos 90%, 95% o incluso 99%) en peso del compuesto de interés. La pureza puede medirse por cualquier método apropiado conocido en la técnica, por ejemplo, cromatografía en columna, 5 electroforesis en gel de poliacrilamida o análisis de HPLC.

[0048] En ciertas realizaciones, los polipéptidos de FZD y Wnt incluyen secuencias sustancialmente idénticas a todo o partes de un polipéptido de FZD y Wnt de origen natural. Los polipéptidos “sustancialmente homólogos” de las secuencias polipeptídicas de FZD y Wnt descritas en la presente memoria tienen una secuencia de aminoácidos 10 que es al menos 65% (por ejemplo, al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%, por ejemplo 100%), homóloga de una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 a 27 (medida como se describe en la presente memoria). Para fines de comparación, la longitud de la secuencia polipeptídica de FZD y Wnt de referencia puede ser de al menos 16 aminoácidos, por ejemplo, al menos 20 o 25 aminoácidos.

15 **[0049]** Una “sustitución de aminoácidos conservativa” es una en la que el resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, 20 tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

[0050] La invención también incluye el uso de proteínas de fusión (y ácidos nucleicos que codifican dichas 25 proteínas de fusión) en las que una parte de un polipéptido de FZD (por ejemplo, FZD 7) o Wnt (por ejemplo, Wnt 3 y/u 11) se fusiona con un polipéptido no relacionado (por ejemplo, un polipéptido marcador o un compañero de fusión) para crear una proteína de fusión. Por ejemplo, el polipéptido puede fusionarse con un marcador de hexahistidina o un marcador FLAG para facilitar la purificación de polipéptidos expresados de forma bacteriana o con un marcador de hemaglutinina o un marcador FLAG para facilitar la purificación de polipéptidos expresados en 30 células eucariotas. La invención también incluye, por ejemplo, el uso de polipéptidos aislados (y los ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos) que incluye una primera parte y una segunda parte, en los que la primera parte incluye, por ejemplo, un polipéptido de FZD o Wnt, y la segunda parte incluye un polipéptido no relacionado, por ejemplo, una región constante de inmunoglobulina (Fc) o un marcador detectable.

35 **[0051]** El compañero de fusión puede ser, por ejemplo, un polipéptido que facilite la secreción, por ejemplo, una secuencia secretora. Dicho polipéptido de fusión se denomina típicamente una preproteína. La secuencia secretora puede escindirse por la célula hospedadora para formar la proteína madura. Además dentro de la invención hay ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de FZD y/o Wnt fusionado con una secuencia polipeptídica para producir una preproteína inactiva. Las preproteínas pueden convertirse en la forma activa de la proteína por retirada 40 de la secuencia de inactivación.

II. Métodos para detectar cáncer

45 **[0052]** Sin quedar ligado a la teoría, parece que diversas proteínas FZD, por ejemplo, FZD 7 y 8 y ligandos de FZD, por ejemplo, Wnt3 y 11, son importantes en cáncer, por ejemplo, cáncer de hígado. En particular, los hepatocitos parecen sobreexpresar FZD 7 y Wnt3 temprano durante el proceso de transformación, por ejemplo, antes del desarrollo de HCC. De forma similar, dichas células con frecuencia infraexpresan FZD 8 y/o Wnt 11. Parece que Wnt 3, 8b y 11 son ligandos de FZD 7.

50 **[0053]** En consecuencia, la presente invención proporciona métodos para detectar células cancerosas, que facilitan el diagnóstico de la presencia y gravedad (por ejemplo, grado tumoral, carga tumoral y similares) del cáncer en un paciente, facilitando una determinación del pronóstico de un paciente y evaluando la sensibilidad del paciente a la terapia (por ejemplo, proporcionando una medida del efecto terapéutico mediante, por ejemplo evaluación de la carga tumoral durante o después de un régimen quimioterapéutico).

55 **[0054]** La detección puede basarse en la detección de un polinucleótido (por ejemplo, un polinucleótido de Wnt 3 y/o Wnt 11) que se expresa diferencialmente en una célula cancerosa (por ejemplo, en comparación con una célula no cancerosa) y/o detección de un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido de Wnt 3 y/o Wnt 11) codificado por un polinucleótido que se expresa diferencialmente en una célula cancerosa. Los métodos de detección de la invención 60 pueden realizarse *in vitro* o *in vivo*, en una muestra biológica, por ejemplo, células aisladas y/o tejidos completos.

[0055] Una “muestra biológica” como se usa en la presente memoria es una muestra de tejido o fluido biológico que contiene ácidos nucleicos o polipéptidos, por ejemplo, una proteína FZD 7, polinucleótido o transcrito. Dichas muestras incluyen, pero sin limitación, tejido obtenido de, por ejemplo, hígado, pulmón, ganglios linfáticos, colon, 65 estómago, páncreas, conducto biliar, intestino delgado y/o esófago. Las muestras biológicas también pueden incluir

secciones de tejidos tales como muestras de biopsia y autopsia, secciones congeladas tomadas para fines histológicos, sangre, plasma, suero, esputo, heces, lágrimas, mucus, bilis, saliva, linfa, pelo, piel, etc. Las muestras biológicas también incluyen explantes y cultivos celulares primarios y/o transformados derivados de tejidos de pacientes. Una muestra biológica se obtiene típicamente de un organismo eucariota, por ejemplo, un primate tal como un chimpancé o ser humano; vaca; caballo; cabra; oveja; perro; gato; un roedor, por ejemplo, cobaya, rata o ratón; conejo; ave; reptil; o pez. Una muestra se proporciona habitualmente retirando una muestra de células de un animal, pero también puede conseguirse proporcionando células previamente aisladas (por ejemplo, aisladas por otra persona, en otro momento y/o para otro fin), o realizando los métodos de la invención *in vivo*. Pueden usarse tejidos de archivo, que tienen historial de tratamiento o resultado.

10

[0056] En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para detectar una célula cancerosa detectando la expresión en la célula de transcrito (por ejemplo, un transcrito de Wnt3 y/o Wnt11) que se expresa diferencialmente en una célula cancerosa. Puede usarse cualquiera de una diversidad de métodos conocidos para detección incluyendo, pero sin limitación, detección de un transcrito por hibridación de ARNm con una sonda de hibridación apropiada; detección de un transcrito por una reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores oligonucleotídicos específicos; e hibridación *in situ* usando una sonda de hibridación apropiada. Los métodos pueden usarse para detectar y/o medir los niveles de ARNm de un gen que se expresa diferencialmente en una célula cancerosa. En algunas realizaciones, los métodos comprenden: a) poner en contacto una muestra con un polinucleótido que corresponde a un gen expresado diferencialmente descrito en la presente memoria en condiciones que permitan la hibridación; y b) detectar la hibridación, si la hubiera.

[0057] La detección de hibridación diferencial, en comparación con un control adecuado, es un indicio de la presencia en la muestra de un polinucleótido que se expresa diferencialmente en una célula cancerosa. Los controles apropiados incluyen, por ejemplo, una muestra que no es una célula cancerosa, una muestra que se sabe que no contiene un polinucleótido que se expresa diferencialmente en una célula cancerosa, y el uso de un polinucleótido marcado del mismo "sentido" que el polinucleótido que se expresa diferencialmente en la célula cancerosa. Se conocen en la técnica condiciones que permiten la hibridación y se han descrito en más detalle anteriormente. La detección también puede conseguirse por cualquier método conocido, incluyendo, pero sin limitación, hibridación *in situ*, PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y/o RT-PCR (transcripción inversa-PCR), o combinaciones de técnicas conocidas. Se conocen en la técnica una diversidad de marcadores y métodos de marcaje para polinucleótidos y pueden usarse en los métodos de ensayo de la invención. La especificidad de hibridación puede determinarse por comparación con controles apropiados.

[0058] Pueden usarse polinucleótidos que comprenden generalmente al menos 10 nt, al menos 12 nt o al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido descrito en la presente memoria, tales como los que tienen la secuencia representada en la presente memoria, para una diversidad de fines, tales como sondas o cebadores de PCR para detección y/o medición de los niveles de transcripción de un polinucleótido que se expresa diferencialmente en una célula cancerosa. Como se apreciará por el experto en la materia, la sonda puede marcarse de forma detectable y ponerse en contacto con, por ejemplo, una matriz que comprenda polinucleótidos inmovilizados obtenidos de una muestra de ensayo (por ejemplo, ARNm). Como alternativa, la sonda puede inmovilizarse en una matriz y la muestra de ensayo marcarse de forma detectable. El uso de estas y otras variaciones de los métodos de la invención están dentro de la experiencia de la técnica.

[0059] Pueden usarse sondas de nucleótidos para detectar la expresión de un gen correspondiente al polinucleótido proporcionado. En transferencias de Northern, se separa ARNm de forma electroforética y se pone en contacto con una sonda. Se detecta que una sonda hibrida con una especie de ARNm de un tamaño particular. La cantidad de hibridación puede cuantificarse para determinar cantidades relativas de expresión. Las sondas pueden usarse para hibridación *in situ* con células para detectar expresión. Las sondas también pueden usarse *in vivo* para detección de diagnóstico de secuencias de hibridación. Las sondas pueden marcarse con un isótopo radiactivo u otros tipos de marcadores detectables, por ejemplo, cromóforos, fluoróforos y/o enzimas. Se describen otros ejemplos de ensayos de hibridación de nucleótidos en el documento WO92/02526 y la Patente de Estados Unidos N° 5.124.246.

[0060] La PCR es otro medio para detectar pequeñas cantidades de ácidos nucleicos diana (véase, por ejemplo, Mullis *et al.*, Meth. Enzymol. (1987) 155: 335; Patente de Estados Unidos N° 4.683.195; y Patente de Estados Unidos N° 4.683.202). Pueden usarse dos oligonucleótidos cebadores que hibridan con los ácidos nucleicos diana para iniciar la reacción. Los cebadores pueden estar compuestos de secuencia dentro de o 3' y 5' de los polinucleótidos descritos en la presente memoria. Después de amplificación de la diana por métodos de PCR convencionales, los ácidos nucleicos diana amplificados pueden detectarse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transferencia de Southern. También puede detectarse ARNm o ADNc por técnicas de transferencia tradicionales (por ejemplo, transferencia de Southern, transferencia de Northern, etc.) descritas en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) (por ejemplo, sin amplificación por PCR). En general, el ARNm o ADNc generado de ARNm usando una enzima polimerasa puede purificarse y separarse usando electroforesis en gel, y transferirse a un soporte sólido, tal como nitrocelulosa. El soporte sólido puede exponerse a una sonda marcada y lavarse para retirar cualquier sonda no hibridada. Después

pueden detectarse dobles cadenas que contengan la sonda marcada.

[0061] Pueden realizarse métodos usando amplificación por PCR en el ADN de una o más células. El uso de la reacción en cadena de la polimerasa se describe en Saiki *et al.* (1985) *Science* 239: 487, y puede encontrarse una revisión de técnicas en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; pp. 14.2-14.33). Puede incluirse un marcador detectable en la reacción de amplificación. Los marcadores detectables adecuados incluyen fluorocromos (por ejemplo isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, Texas Red, ficoeritrina, aloficocianina, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína, 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína (HEX), 5-carboxifluoresceína (5-FAM) o N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA)), marcadores radiactivos (por ejemplo, ³²P, ³⁵S, ³H, etc.) y similares. El marcador puede ser un sistema de dos etapas, en el que el polinucleótido se conjuga con biotina, haptenos, etc. que tienen un compañero de unión de alta afinidad, por ejemplo avidina, anticuerpos específicos, etc., en el que el compañero de unión se conjuga con un marcador detectable. El marcador puede conjugarse con uno o ambos de los cebadores. Como alternativa, el grupo de nucleótidos usado en la amplificación está marcado, para incorporar el marcador en el producto de amplificación.

[0062] En una realización, se evalúa el nivel de expresión usando PCR en tiempo real. Se aísla ARN de una muestra de interés. Se diseñan cebadores de PCR para amplificar el gen específico de interés. La acumulación de producto de PCR se mide usando una sonda oligonucleotídica fluorogénica con doble marcaje. La sonda se marca con dos colorantes fluorescentes diferentes. El colorante indicador 5' terminal y el colorante interruptor 3' terminal. La sonda oligonucleotídica se selecciona para que sea homóloga de una secuencia diana interna presente en el amplión de PCR. Cuando la sonda está intacta, se produce transferencia de energía entre los dos fluoróforos, y se detiene la emisión de fluorescencia. Durante la fase de extensión de PCR, la sonda se escinde por actividad nucleasa 5' de Taq polimerasa. Por lo tanto, el indicador ya no está en proximidad al interruptor, y se mide el aumento de intensidad de emisión. Se proporciona un método ejemplar para detectar la expresión de FZD usando PCR en tiempo real en la sección de Ejemplos, posterior. Los cebadores también pueden usarse en otros métodos, por ejemplo, RT-PCR. Este ensayo proporciona una medida cuantitativa de ácido nucleico.

[0063] En otras realizaciones, se proporcionan métodos para detectar una célula cancerosa detectando la expresión de una proteína (por ejemplo, una proteína Wnt3 y/o Wnt11) que se expresa diferencialmente por la célula. Puede usarse cualquiera de una diversidad de métodos conocidos para detección, incluyendo pero sin limitación métodos que emplean compuestos de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo, como es útil en ELISA y/o métodos de transferencia de Western. Dichos anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales y pueden marcarse con un marcador detectable (por ejemplo, fluoróforo, cromóforo o isótopo, etc.). Cuando sea apropiado, el compuesto puede unirse con un soporte sólidos tal como un perla, placa, filtro, resina, etc. La determinación de la formación del complejo de compuesto/diana puede efectuarse poniendo en contacto el complejo con un compuesto adicional (por ejemplo, un anticuerpo secundario) que se une específicamente con el primer compuesto (o complejo). Como el primer compuesto, el compuesto adicional puede unirse con un soporte sólido y/o puede marcarse con un marcador detectable.

[0064] Los materiales necesarios para realizar los métodos de detección descritos en la presente memoria pueden proporcionarse como parte de un kit. Por lo tanto, la invención proporciona además kits para detectar la presencia y/o un nivel de un polinucleótido que se expresa diferencialmente en una célula cancerosa (por ejemplo, por detección de un ARNm codificado por el gen de interés expresado diferencialmente), y/o un polipéptido codificado por el mismo, en una muestra biológica. Pueden realizarse procedimientos que usan estos kits por laboratorios clínicos, laboratorios experimentales, practicantes médicos o individuos privados. Los kits de la invención para detectar un polipéptido codificado por un polinucleótido que se expresa diferencialmente en una célula cancerosa pueden comprender un resto, tal como un anticuerpo, que se une específicamente con el polipéptido. Los kits de la invención usados para detectar un polinucleótido que se expresa diferencialmente en una célula cancerosa pueden comprender un resto que hibrida específicamente con dicho polinucleótido. El kit puede proporcionar opcionalmente componentes adicionales que son útiles en el procedimiento incluyendo, por ejemplo, tampones, reactivos en desarrollo, marcadores, superficies reactivas, medios para la detección, muestras de control, patrones, instrucciones e información interpretativa.

[0065] La presente invención se refiere además a métodos para detectar/diagnosticar una afección neoplásica o preneoplásica en un mamífero (por ejemplo, un ser humano). "Diagnóstico" como se usa en la presente memoria generalmente incluye la determinación de la susceptibilidad de un paciente a una enfermedad o trastorno, la determinación de si un sujeto está aquejado en la actualidad por una enfermedad o trastorno, el pronóstico de un sujeto aquejado por una enfermedad o trastorno (por ejemplo, identificación de estados cancerosos premetastásicos o metastásicos, estadios del cáncer o sensibilidad del cáncer a la terapia) y terametría (por ejemplo, controlar la afección de un sujeto para proporcionar información con respecto al efecto o la eficacia de la terapia).

[0066] Un método de detección/diagnóstico ejemplar incluye: (a) obtener de un mamífero (por ejemplo, un ser humano) una muestra biológica (por ejemplo, tejido de hígado), (b) detectar en la muestra la presencia de un producto génico de Wnt3 y/o Wnt11 (por ejemplo, proteína o ARNm) y (c) comparar la cantidad del producto génico

de Wnt3 y/o Wnt11 presente con la de una muestra de control. De acuerdo con este método, la presencia en la muestra de niveles elevados de producto génico de Wnt3 y/o niveles reducidos de producto génico de Wnt11 indica que el sujeto tiene una afección neoplásica o preneoplásica, por ejemplo, cáncer de hígado o un riesgo de desarrollar cáncer de hígado.

5

[0067] La identificación de niveles elevados de proteína FZD 7 y/o Wnt 3 y/o niveles reducidos de proteína FZD 8 y/o Wnt 11 hace posible la identificación de pacientes que probablemente se beneficien de terapia especializada. Por ejemplo, puede explorarse una muestra biológica de un sujeto después de terapia primaria (por ejemplo, sujeto que se ha sometido a cirugía) con respecto a la presencia de niveles elevados de FZD 7 y/ Wnt 3 y/o niveles reducidos de proteína FZD 8 y/o Wnt 11, siendo dichos niveles indicativos del tejido tumoral residual. De forma similar, puede examinarse el tejido que rodea al sitio de corte de un tumor retirado quirúrgicamente (por ejemplo, tejido peritumoral) (por ejemplo, por inmunofluorescencia), siendo la presencia de niveles elevados de FZD 7 y/ Wnt 3 y/o niveles reducidos de FZD 8 y/o Wnt 11 (en relación con el tejido circundante) indicativa del desarrollo potencial de enfermedad en este tejido o retirada incompleta del tumor. La capacidad para identificar dichos pacientes hace posible adaptar la terapia a las necesidades del paciente particular. Los sujetos que se someten a terapia no quirúrgica, por ejemplo, quimioterapia o radioterapia, también pueden controlarse, siendo la presencia en muestras de dichos sujetos de niveles elevados de FZD 7 y/ Wnt 3 y/o niveles reducidos de FZD 8 y/o Wnt 11 indicativa de la necesidad de tratamiento continuado. Los expertos en la materia también apreciarán que la determinación del estadio del cáncer (por ejemplo, cáncer de hígado) para fines de optimizar los regímenes de tratamiento puede realizarse usando los métodos descritos en la presente memoria.

III. Métodos para identificar compuestos capaces de tratar cáncer

[0068] La invención proporciona métodos para explorar el compuesto de ensayo con respecto a una capacidad para tratar cáncer de hígado. Un "compuesto de ensayo" como se describe en la presente memoria es cualquier compuesto que pueda explorarse usando los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, un compuesto de ensayo puede ser, por ejemplo, una molécula orgánica o inorgánica pequeña (P.M. menor de 1.000 Da). Como alternativa o además, el compuesto de ensayo puede ser un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos aleatoria o predeterminada o un polipéptido sintético o de origen natural) o un ácido nucleico, tal como una molécula de ADN o ARN. Un compuesto de ensayo puede ser de origen natural (por ejemplo, una hierba o un producto natural), o sintético, o puede incluir componentes tanto naturales como sintéticos. Un compuesto de ensayo puede tener un peso de fórmula de menos de aproximadamente 10.000 gramos por mol, menos de 5.000 gramos por mol, menos de 1.000 gramos por mol, o menos de aproximadamente 500 gramos por mol. El compuesto de ensayo puede ser, por ejemplo, cualquier compuesto orgánico o inorgánico (por ejemplo, compuesto heteroorgánico u organometálico), un aminoácido, análogo de aminoácido, polipéptido, peptidomimético (por ejemplo, peptoide), oligopéptido (por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 10 a 20 o de 12 a 18 aminoácidos de longitud, preferentemente de 12, 15 o 18 aminoácidos de longitud), nucleótido, análogo de nucleótidos, polinucleótido, análogo de polinucleótidos, ácido ribonucleico, ácido desoxirribonucleico, oligonucleótido antisentido, ribozima, sacárido, lípido (por ejemplo, un esfingolípido) y/o un ácido graso o cualquier combinación de los mismos.

[0069] Los términos "antagonista" o "inhibidor" de la señalización de Wnt/FZD (por ejemplo, señalización de Wnt/FZD 7) se refieren a compuestos que, por ejemplo, se unen a proteínas Wnt (por ejemplo, Wnt 3, 8 y/u 11) y/o receptores FZD (por ejemplo FZD 7) y/o bloquean o inhiben parcial o totalmente la señalización de Wnt/FZD (por ejemplo, señalización de Wnt/FZD 7) como se mide en ensayos conocidos para señalización de Wnt/FZD (por ejemplo, medición de los niveles de β -catenina, expresión de oncogenes controlada por factores de transcripción Tcf y Lef u otros productos génicos regulados por Wnt/Frizzled corriente abajo). Los inhibidores incluyen, por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra proteínas Wnt o FZD (se describe un ejemplo de un anticuerpo anti Wnt 3 en la sección de Ejemplos, posteriormente), versiones modificadas de proteínas Wnt o FZD, ligandos de origen natural y sintéticos, antagonistas, agonistas, anticuerpos, moléculas químicas pequeñas y similares. Se describen en más detalle posteriormente ensayos para detectar inhibidores o antagonistas.

Bibliotecas de compuestos de ensayo

[0070] En ciertas realizaciones, exploraciones de la presente invención utilizan bibliotecas de compuestos de ensayo. Una "biblioteca" es una colección de compuestos (por ejemplo, como una mezcla o como compuestos individuales físicamente separados) sintetizada de diversas combinaciones de uno o más componentes de partida. Al menos algunos de los compuestos deben diferir de al menos algunos de los otros compuestos en la biblioteca. Una biblioteca puede incluir, por ejemplo, 5, 10, 50, 100, 1000 o incluso 10.000, 50.000 o 100.000, o más compuestos diferentes (es decir, no simplemente múltiples copias de los mismos compuestos, aunque algunos compuestos en la biblioteca pueden estar duplicados o representarse más de una vez). Cada uno de los diferentes compuestos estará presente en una cantidad tal que su presencia pueda determinarse por algún medio, por ejemplo, pueda aislarse, analizarse y/o detectarse con un receptor o sonda adecuada. La cantidad real de cada compuesto diferente necesario para que su presencia pueda determinarse variará debido a los procedimientos que de hecho se usen y puede cambiar a medida que avance la tecnología para el aislamiento, detección y análisis. Cuando los

compuestos están presentes en una mezcla en cantidades sustancialmente equimolares, por ejemplo, puede detectarse una cantidad de 100 picomoles de cada compuesto. Las bibliotecas pueden incluir tanto bibliotecas de compuestos individuales (por ejemplo, presentes sustancialmente como un único tipo de compuesto por pocillo, realizado mediante síntesis paralela o el método de agrupamiento y agrupamiento-división) y mezclas que contienen 5 cantidades sustancialmente equimolares de cada compuesto deseado (es decir, en las que ningún compuesto individual domina). Cualquiera de los formatos de biblioteca puede permitir la identificación de un compuesto activo descubierto en un ensayo.

10 **[0071]** Los compuestos de ensayo pueden explorarse individualmente o en paralelo. Un ejemplo de exploración en paralelo es una exploración farmacológica de alto rendimiento de grandes bibliotecas de productos químicos. Dichas bibliotecas de compuestos candidatos pueden generarse u obtenerse, por ejemplo, de Chembridge Corp., San Diego, CA. Como alternativa, pruebas de experimentación y anecdóticas previas pueden sugerir una clase o categoría de compuestos de potencial aumentado. Puede diseñarse y sintetizarse una biblioteca para abarcar dicha clase de productos químicos.

15 **[0072]** La síntesis de bibliotecas combinatorias se conoce bien en la técnica y se ha revisado (véase, por ejemplo, E. M. Gordon *et al.*, *J. Med. Chem.* (1994) 37: 1385-1401; DeWitt, S. H.; Czarnik, A. W. *Acc. Chem. Res.* (1996) 29: 114; Armstrong, R. W.; Combs, A. P.; Tempest, P. A.; Brown, S. D.; Keating, T. A. *Acc. Chem. Res.* (1996) 29: 123; Ellman, J. A. *Acc. Chem. Res.* (1996) 29: 132; Gordon, E. M.; Gallop, M. A.; Pa.tel, D. V. *Acc. Chem. Res.* (1996) 29: 20 144; Lowe, G. *Chem. Soc. Rev.* (1995) 309, Blondelle *et al.* *Trends Anal. Chem.* (1995) 14: 83; Chen *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* (1994) 116=2661; Patentes de Estados Unidos 5.359.115, 5.362.899 y 5.288.514; Publicaciones de PCT N° WO92/10092, WO93/09668, WO91/07087, WO93/20242, WO94/08051).

25 **[0073]** Pueden prepararse bibliotecas de compuestos de acuerdo con una diversidad de métodos, algunos de los cuales se conocen en la técnica. Por ejemplo, puede implementarse una estrategia de "división-agrupamiento" de la siguiente manera: se sitúan perlas de un soporte polimérico funcionalizado en una pluralidad de frascos de reacción; se conoce una diversidad de soportes poliméricos adecuados para síntesis peptídica de fase sólida, y algunos están disponibles en el mercado (para ejemplos, véase, por ejemplo, M. Bodansky "Principles of Peptide Synthesis", 2ª edición, Springer-Verlag, Berlín (1993)). A cada alícuota de perlas se añade una solución de un aminoácido activado 30 diferente, y se permite que las reacciones continúen para producir una pluralidad de aminoácidos inmovilizados, uno en cada frasco de reacción. Las alícuotas de perlas derivatizadas se lavan después, se "agrupan" (es decir, se recombinan), y el grupo de perlas se divide de nuevo, colocándose cada alícuota en un frasco de reacción separado. Después se añade otro aminoácido activado a cada alícuota de perlas. El ciclo de síntesis se repite hasta que obtenga una longitud peptídica deseada. Los restos de aminoácidos añadidos en cada ciclo de síntesis pueden 35 seleccionarse aleatoriamente; como alternativa, pueden seleccionarse aminoácidos para proporcionar una biblioteca "con preferencia", por ejemplo, una biblioteca en la que ciertas partes del inhibidor se seleccionan de forma no aleatoria, por ejemplo, para proporcionar un inhibidor que tenga homología o similitud estructural conocida con un péptido conocido capaz de interactuar con un anticuerpo, por ejemplo, el sitio de unión a antígeno de anticuerpo antiidiotípico. Se apreciará que pueden generarse fácilmente de este modo una amplia diversidad de compuestos 40 peptídicos, peptidomiméticos o no peptídicos.

[0074] La estrategia de "división-agrupamiento" puede dar como resultado una biblioteca de péptidos, por ejemplo, moduladores, que pueden usarse para preparar una biblioteca de compuestos de ensayo. En otra síntesis ilustrativa, se crea una "biblioteca de diversómeros" por el método de Hobbs DeWitt *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 45 6909 (1993)). También pueden usarse otros métodos de síntesis, incluyendo la técnica de la "bolsa de té" de Houghten (véase, por ejemplo, Houghten *et al.*, *Nature* 354: 84-86 (1991)) para sintetizar bibliotecas de compuestos.

[0075] Pueden explorarse bibliotecas de compuestos para determinar si cualquier miembro de la biblioteca tiene una actividad deseada y, si es así, identificar la especie activa. Se han descrito métodos para explorar bibliotecas 50 combinatorias (véase, por ejemplo, Gordon *et al.*, *J. Med. Chem.*, mencionado anteriormente). Pueden explorarse bibliotecas de compuestos solubles por cromatografía de afinidad con un receptor apropiado para aislar ligandos para el receptor, seguido de identificación de los ligandos aislados por técnicas convencionales (por ejemplo, espectrometría de masas, RMN y similares). Pueden explorarse compuestos inmovilizados poniendo en contacto los compuestos con un receptor soluble; preferentemente, el receptor soluble se conjuga con un marcador (por ejemplo, 55 fluoróforos, enzimas colorimétricas, radioisótopos, compuestos luminiscentes y similares) que pueden detectarse para indicar unión a ligando. Como alternativa, pueden liberarse selectivamente compuestos inmovilizados y permitir que se difundan a través de una membrana para interactuar con un receptor. Se han descrito anteriormente ensayos ejemplares útiles para explorar bibliotecas de compuestos de ensayo.

60 Métodos de exploración

[0076] La invención proporciona métodos para identificar compuestos capaces de tratar cáncer, por ejemplo, cáncer de hígado. Aunque los solicitantes no desean quedar ligados a ninguna teoría particular con respecto al mecanismo biológico implicado, se cree que dichos compuestos modulan específicamente (1) la señalización de 65 Wnt/FZD (por ejemplo, uniéndose con polipéptidos de FZD 7, Wnt 3 y/o Wnt 11 y/o reduciendo (por ejemplo,

evitando) la transcripción mediada por Wnt/FZD) y/o (2) la expresión de FZD 7, Wnt3 y/o Wnt11.

[0077] En ciertos aspectos de la presente invención, se consigue exploración de dichos compuestos (i) identificando de un grupo de compuestos de ensayo los que se unen a un polipéptido de FZD 7, Wnt 3 y/o Wnt 11, 5 modulan (es decir, aumentan o reducen) una interacción entre FZD 7 y su ligando (por ejemplo, Wnt 3, Wnt 8b y/o Wnt 11) y/o modulan (es decir, aumentan o reducen) la transcripción y/o traducción de FZD 7, Wnt3 y/o Wnt11; y, opcionalmente, (ii) ensayando adicionalmente dichos compuestos con respecto a su capacidad para modular la señalización de Wnt/FZD, reducir la motilidad de células cancerosas, reducir la acumulación de β -catenina en células cancerosas y/o para tratar cáncer *in vitro* o *in vivo*. Los compuestos de ensayo que se unen a polipéptidos de FZD 7, 10 Wnt 3 y/o Wnt 11, modulan una interacción entre FZD 7 y su ligando (por ejemplo, Wnt 3, Wnt 8b y/o Wnt 11) o modulan la transcripción y/o traducción de FZD 7, Wnt3 y/o Wnt11, se denominan en la presente memoria “agentes antineoplásicos candidatos”. Los agentes antineoplásicos candidatos ensayados adicionalmente y que se descubrió que eran capaces de modular la señalización de Wnt/FZD *in vitro* o *in vivo*, reducir la motilidad de células cancerosas, reducir la acumulación de β -catenina en células cancerosas y/o tratar cáncer se consideran “agentes 15 antineoplásicos”. En los métodos de exploración de la presente invención, los agentes antineoplásicos candidatos pueden, pero no necesariamente tienen que, ensayarse para determinar si son agentes antineoplásicos. Pueden llevarse a cabo ensayos de la presente invención en muestras biológicas, preparaciones de células completas y/o sistemas sin células *ex vivo*.

[0078] En un aspecto, la invención incluye métodos para explorar compuestos de ensayo para identificar compuestos que se unen a polipéptidos de FZD, por ejemplo, polipéptidos de FZD 7 y/o a polipéptidos de Wnt, por ejemplo, polipéptidos de Wnt 3 y/o 11. La unión de compuesto de ensayo con un polipéptido de FZD o Wnt puede detectarse, por ejemplo, *in vitro* inmovilizando de forma reversible o irreversible el compuesto o los compuestos de ensayo o el polipéptido de Wnt o FZD en un sustrato, por ejemplo, la superficie de un pocillo de una placa de 25 microtitulación de poliestireno de 96 pocillos. Se conocen bien en la técnica métodos para inmovilizar polipéptidos y otras moléculas pequeñas. Por ejemplo, las placas de microtitulación pueden recubrirse con un polipéptido de FZD o Wnt añadiendo el polipéptido en una solución (típicamente, a una concentración de 0,05 a 1 mg/ml en un volumen de 1-100 μ l) a cada pocillo, e incubando las placas a temperatura ambiente hasta 37 °C durante una cantidad de tiempo dada, por ejemplo, de 0,1 a 36 horas. Los polipéptidos no unidos a la placa pueden retirarse agitando el exceso de solución de la placa, y lavando después la placa (una vez o repetidas veces) con agua o un tampón. 30 Típicamente, el polipéptido está en agua o un tampón. La placa puede después lavarse con un tampón que carece del polipéptido unido. Para bloquear los sitios de unión a proteína libres en las placas, las placas pueden bloquearse con una proteína que no está relacionada con el polipéptido unido. Por ejemplo, pueden usarse 300 μ l de albúminas de suero bovino (BSA) a una concentración de 2 mg/ml en Tris-HCl. Los sustratos adecuados incluyen los sustratos que contienen una química de reticulación definida (por ejemplo, sustratos plásticos, tales como sustratos de 35 poliestireno, estireno o polipropileno de Corning Costar Corp. (Cambridge, MA), por ejemplo). Si se desea, puede usarse una partícula, por ejemplo, agarosa en perlas o sepharose en perlas, como el sustrato. Pueden después añadirse compuestos de ensayo a la placa recubierta y permitir que se una con el polipéptido de FZD o Wnt (por ejemplo, a 37 °C durante 0,5 - 12 horas). La placa puede después aclararse como se ha descrito anteriormente. Los 40 expertos en la materia apreciarán que son posibles muchas variaciones de este método. Por ejemplo, el método puede incluir recubrir un sustrato con un compuesto de ensayo y añadir polipéptidos de Wnt o FZD al compuesto unido a sustrato.

[0079] La unión de FZD o Wnt con un segundo compuesto, por ejemplo, un compuesto de ensayo descrito anteriormente o con un compañero de unión (por ejemplo, FZD 7 con Wnt 3 y/o 11; analizado en más detalles posteriormente), puede detectarse por cualquiera de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse en un inmunoensayo un anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido de FZD o Wnt (es decir, un anticuerpo anti FZD o un anticuerpo anti Wnt, por ejemplo, un anticuerpo anti Wnt 3 policlonal descrito en la sección de Ejemplos). Si se desea, el anticuerpo puede marcarse (por ejemplo, con fluorescencia o 50 con un radioisótopo) y detectarse directamente (véase, por ejemplo, West y McMahon, J. Cell Biol. 74: 264, 1977). Como alternativa, puede usarse un segundo anticuerpo para detección (por ejemplo, un anticuerpo marcado que se une con la parte Fc del anticuerpo anti FZD o anti Wnt). En un método de detección alternativo, el polipéptido de FZD o Wnt está marcado (por ejemplo, con un radioisótopo, fluoróforo, cromóforo o similares), y se detecta el marcador. En otro método más, se produce un polipéptido de FZD o Wnt como una proteína de fusión con una 55 proteína que puede detectarse de forma óptica, por ejemplo, proteína verde fluorescente (que puede detectarse con luz UV). En un método alternativo, el polipéptido se produce como una proteína de fusión con una enzima que tiene una actividad enzimática detectable, tal como peroxidasa de rábano rústico, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o glucosa oxidasa. Se han clonado genes que codifican todas estas enzimas y están disponibles para su uso por practicantes expertos. Si se desea, la proteína de fusión puede incluir un antígeno o epítopo que puede detectarse y 60 medirse con un anticuerpo policlonal o monoclonal usando métodos convencionales. Los antígenos adecuados incluyen enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano rústico, fosfatasa alcalina y β -galactosidasa) y polipéptidos no enzimáticos (por ejemplo, proteínas del suero, tales como BSA y globulinas, y proteínas de la leche, tales como caseínas).

[0080] En diversos métodos para identificar polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos de ensayo) que se unen con polipéptidos de FZD o Wnt, pueden usarse los ensayos de dos híbridos convencionales de interacciones proteína/proteína (véase, por ejemplo, Chien *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9578, 1991; Fields *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.283.173; Fields y Song, Nature, 340: 245, 1989; Le Douarin *et al.*, Nucleic Acids Research, 23: 876, 1995; Vidal *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 10315-10320, 1996; y White, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 10001-10003, 1996). Generalmente, los métodos de dos híbridos implican reconstitución de dos dominios separables de un factor de transcripción. Una proteína de fusión incluye el polipéptido de FZD o Wnt fusionado con un dominio de transactivador o dominio de unión a ADN de un factor de transcripción (por ejemplo, de Gal4). La otra proteína de fusión contiene un polipéptido de ensayo o un compañero de unión para el polipéptido incluido en la primera proteína de fusión, fusionado con el dominio de unión a ADN o un dominio transactivador de un factor de transcripción. La unión del polipéptido de FZD o Wnt con el polipéptido de ensayo o compañero de unión reconstituye el factor de transcripción. Puede detectarse reconstitución del factor de transcripción detectando la expresión de un gen (es decir, un gen indicador) que está unido operativamente con una secuencia de ADN que está unida con el dominio de unión a ADN del factor de transcripción. Están disponibles en el mercado kits para practicar diversos métodos de dos híbridos (por ejemplo, de Clontech; Palo Alto, CA).

[0081] En otro aspecto, la invención incluye métodos para explorar compuestos de ensayo para identificar un compuesto que modula una interacción proteína-proteína entre polipéptidos de FZD o Wnt. Se describe un método útil para exploración de alto rendimiento de compuestos capaces de modular las interacciones proteína-proteína entre reguladores de la transcripción en Lepourcelet *et al.*, Cancer Cell 5: 91-102 (2004) Típicamente, se proporciona un primer compuesto. El primer compuesto es un polipéptido de FZD (por ejemplo, FZD 7) o Wnt (por ejemplo, Wnt 3 u 11) o fragmento biológicamente activo del mismo. Se proporciona un segundo compuesto que es diferente del primer compuesto y está marcado. El segundo compuesto es un polipéptido de FZD (por ejemplo, FZD 7) o Wnt (por ejemplo, Wnt 3 u 11) o fragmento biológicamente activo del mismo. Se proporciona un compuesto de ensayo. El primer compuesto, segundo compuesto y compuesto de ensayo se ponen en contacto entre sí. Después se determina la cantidad de marcador unido con el primer compuesto. Un cambio en la interacción proteína-proteína entre el primer compuesto y el segundo compuesto como se evalúa por marcador unido es indicativo de la utilidad del compuesto de ensayo en la modulación de una interacción proteína-proteína entre el polipéptido de FZD y Wnt.

[0082] En ciertas realizaciones, el primer compuesto proporcionado se une con un soporte sólido. Los soportes sólidos incluyen, por ejemplo, resinas (por ejemplo, agarosa y perlas) y placas multipocillo. En ciertas realizaciones, el método incluye una etapa de lavado después de la etapa de contacto, para separar el marcador unido y no unido.

[0083] En ciertas realizaciones, se pone en contacto una pluralidad de compuestos de ensayo con el primer compuesto y segundo compuesto. Los diferentes compuestos de ensayo pueden ponerse en contacto con los otros compuestos en grupos o por separado. En ciertas realizaciones, cada uno de los compuestos de ensayo se pone en contacto tanto con el primer compuesto como con el segundo compuesto en un pocillo individual. Por ejemplo, el método puede explorar bibliotecas de compuestos de ensayo. Se han analizado en detalle anteriormente bibliotecas de compuestos de ensayo. Las bibliotecas pueden incluir, por ejemplo, productos naturales, productos químicos orgánicos, péptidos y/o péptidos modificados, incluyendo, por ejemplo, aminoácidos D, aminoácidos no convencionales y aminoácidos N sustituidos. Típicamente, las bibliotecas están en una forma compatible con exploración en placas multipocillo, por ejemplo, placas de 96 pocillos. El ensayo es particularmente útil para ejecución automática en un formato multipocillo en el que muchas de las etapas se controlan por ordenador y se llevan a cabo por equipamiento robótico. Las bibliotecas también pueden usarse en otros formatos, por ejemplo, bibliotecas químicas sintéticas fijadas a un soporte sólido y disponibles para liberación en microgotas.

[0084] En ciertas realizaciones, el primer compuesto es un polipéptido de FZD 7 o fragmento del mismo y el segundo compuesto es un polipéptido de Wnt, tal como Wnt 3 u 11, o un fragmento del mismo. En otras realizaciones, el primer compuesto es un polipéptido de Wnt, tal como un polipéptido de Wnt 3 u 11 o un fragmento del mismo, y el segundo compuesto es un polipéptido de FZD 7 o fragmento del mismo. El soporte sólido con el que se une el primer compuesto puede ser, por ejemplo, perlas de sepharose, perlas de SPA (microesferas que incorporan un producto de centelleo) o una placa multipocillo. Pueden usarse perlas de SPA cuando el ensayo se realiza sin una etapa de lavado, por ejemplo, en un ensayo de proximidad de centelleo. Pueden usarse perlas de sepharose cuando el ensayo se realiza con una etapa de lavado. El segundo compuesto puede marcarse con cualquier marcador que permita su detección, por ejemplo, un radiomarcador, un agente fluorescente, biotina, un marcador peptídico o un fragmento enzimático. El segundo compuesto también puede estar radiomarcado, por ejemplo, con ^{125}I o ^3H .

[0085] En ciertas realizaciones, la actividad enzimática de una enzima químicamente conjugada con, o expresada como una proteína de fusión con, el primer o segundo compuesto, se usa para detectar proteína unida. También se incluye un ensayo de unión en el que se usa un método inmunológico convencional para detectar proteína unida. En ciertas otras realizaciones, la interacción de polipéptidos de Wnt y FZD, o fragmentos de los mismos, se detecta por transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre un fluoróforo donante unido covalentemente con un polipéptido de FZD o Wnt (por ejemplo, un grupo fluorescente conjugado químicamente con FZD o Wnt, o una variante de la proteína verde fluorescente (GFP) expresada como una proteína quimérica FZD o Wnt-GFP) y un

fluoróforo aceptor unido covalentemente con una proteína de sustrato, en el que hay un solapamiento adecuado del espectro de emisión donador y el espectro de excitación aceptor para proporcionar transferencia de energía no radiante eficaz cuando los fluoróforos se ponen en proximidad cercana mediante la interacción proteína-proteína de polipéptidos de FZD y Wnt.

5

[0086] En otras realizaciones, la interacción proteína-proteína se detecta reconstituyendo dominios de una enzima, por ejemplo, beta-galactosidasa (véase Rossi *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 8405-8410 (1997)).

[0087] En otras realizaciones más, la interacción proteína-proteína se evalúa por formación de imágenes de relación de fluorescencia (Bacsikai *et al*, Science 260: 222-226 (1993)) de construcciones quiméricas adecuadas de polipéptidos de FZD y Wnt en células, o por variantes del ensayo de dos híbridos (Fearon *et al*, Proc Natl Acad Sci USA 89: 7958-7962 (1992); Takacs *et al*, Proc Natl Acad Sci USA 90: 10375-10379 (1993); Vidal *et al*, Proc Natl Acad Sci USA 93: 10321-10326 (1996)) empleando construcciones adecuadas de polipéptidos de FZD y Wnt y adaptada para un ensayo de alto rendimiento para detectar compuestos que inhiban la interacción de FZD/Wnt. Estas realizaciones tienen la ventaja de que se asegura la permeabilidad celular de los compuestos de ensayo.

[0088] Por ejemplo, en un ensayo, un polipéptido de FZD o Wnt o fragmento del mismo se adsorbe en placas de ELISA. Los polipéptidos de FZD o Wnt se exponen después a compuestos de ensayo, seguido de una proteína de fusión de compañero de unión-glutatión-S-transferasa (GST), por ejemplo, una proteína de fusión de GST-polipéptido de FZD o Wnt. La proteína unida se detecta con anticuerpo de cabra anti GST, IgG anti cabra acoplado con fosfatasa alcalina (AP) y sustrato de AP. Los compuestos que interfieren con interacciones proteína-proteína producen señales de AP reducidas en las placas de ELISA.

[0089] También se describen en la presente memoria métodos para identificar compuestos de ensayo que modulan (por ejemplo, aumentan o reducen) la expresión de un polipéptido de FZD y/o Wnt. El método incluye poner en contacto un ácido nucleico de FZD y/o Wnt con un compuesto de ensayo y medir después la expresión del polipéptido de FZD y/o Wnt codificado. En un aspecto relacionado, la invención presenta un método para identificar compuestos que modulan (por ejemplo, aumentan o reducen) la expresión de polipéptidos de FZD y/o Wnt midiendo la expresión de un polipéptido de FZD en presencia del compuesto de ensayo o después de la adición del compuesto de ensayo en: (a) una línea celular en la que se ha incorporado una construcción recombinante que incluye la secuencia de ácido nucleico de FZD y/o Wnt o fragmento o una variación alélica de la misma; o (b) una población celular o línea celular que expresa selectivamente de forma natural FZD y/o Wnt, y midiendo después la expresión de la proteína FZD y/o Wnt.

[0090] Puesto que los ácidos nucleicos de FZD y Wnt descritos en la presente memoria se han identificado, pueden clonarse en diversas células hospedadoras (por ejemplo, células de mamífero, células de insecto, bacterias u hongos) para llevar a cabo dichos ensayos en células completas.

[0091] Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de FZD y/o Wnt puede usarse para identificar un compuesto que modula (aumenta o reduce) la expresión de FZD y/o Wnt *in vivo* (por ejemplo, en una célula productora de FZD y/o Wnt). En dichas realizaciones, se cultivan células que expresan un FZD (por ejemplo FZD 7 y/u 8) y/o Wnt (por ejemplo, Wnt3, Wnt8b o Wnt11), se exponen a un compuesto de ensayo (o una mezcla de compuestos de ensayo) y se compara el nivel de expresión de FZD y/o Wnt con el nivel de expresión o actividad de FZD y/o Wnt en células que son de otro modo idénticas pero que no se han expuesto al compuesto o los compuestos de ensayo. Pueden usarse ensayos cuantitativos convencionales de expresión génica.

[0092] La expresión de FZD y Wnt puede medirse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por análisis de PCR de transferencia de Northern o análisis de protección de RNasa usando una molécula de ácido nucleico de la invención como una sonda. Otros ejemplos incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y separación de células activadas por fluorescencia (FACS). El nivel de expresión en presencia de la molécula de ensayo, en comparación con el nivel de expresión en su ausencia, indicará si el compuesto de ensayo modula o no la expresión de un polipéptido de FZD y/o Wnt.

[0093] Se describen además métodos para explorar compuestos de ensayo utilizando sistemas celulares que son sensibles a la alteración de uno o varios componentes de transcripción/traducción.

[0094] Los métodos incluyen identificar compuestos candidatos que interfieren con etapas en la precisión de la traducción de FZD y/o Wnt, tales como mantener una fase de lectura apropiada durante la traducción y terminar la traducción en un codón de parada. Este método implica construir células en las que solamente puede producirse un polipéptido indicador detectable si se ha alterado el proceso normal de detención en una fase de lectura o de terminación de la traducción en un codón de parada. Este método implica además poner en contacto la célula con un compuesto de ensayo para examinar si aumenta o reduce la producción del polipéptido indicador.

[0095] El sistema celular puede ser un extracto sin células, y el método implica medir la transcripción o traducción *in vitro*. Se seleccionan condiciones de modo que la transcripción o traducción del indicador aumente o se reduzca

por la adición de un modificador de la transcripción o un modificador de la traducción al extracto celular.

[0096] Un método para identificar compuestos candidatos se basa en un producto génico sensible a transcripción. Este método implica construir una célula en la que la producción de una molécula indicadora cambia (es decir, aumenta o se reduce) en condiciones en las que la transcripción celular de un ácido nucleico de FZD y Wnt cambia (es decir aumenta o se reduce). Específicamente, la molécula indicadora se codifica por un ácido nucleico unido transcripcionalmente con una secuencia construida y dispuesta para provocar un cambio relativo en la producción de la molécula indicadora cuando cambia la transcripción de un ácido nucleico de FZD y/o Wnt. Una secuencia génica que codifica el indicador puede, por ejemplo, fusionarse con parte de o todo el gen que codifica el producto génico sensible a transcripción y/o con parte de o todos los elementos genéticos que controlan la producción del producto génico. Como alternativa, el producto génico sensible a transcripción puede estimular la transcripción del gen que codifica el indicador, directa o indirectamente. El método implica además poner en contacto la célula con un compuesto de ensayo, y determinar si el compuesto de ensayo aumenta o reduce la producción de la molécula indicadora en la célula.

[0097] Como alternativa, el método para identificar compuestos candidatos puede basarse en un producto génico sensible a traducción. Este método implica construir una célula en la que la traducción celular de un ácido nucleico de FZD y/o Wnt cambia (es decir, aumenta o se reduce). Específicamente, la molécula indicadora se codifica por ácido nucleico unido traduccionalmente con una secuencia construida y dispuesta para provocar un aumento o una reducción relativa en la producción de la molécula indicadora cuando la transcripción de un ácido nucleico de FZD y/o Wnt cambia. Una secuencia génica que codifica el indicador puede, por ejemplo, fusionarse con parte de o todo el gen que codifica el producto génico sensible a traducción y/o con parte de o todos los elementos genéticos que controlan la producción del producto génico. Como alternativa, el producto génico sensible a traducción puede estimular la traducción del gen que codifica el indicador, directa o indirectamente. El método implica además poner en contacto la célula con un compuesto de ensayo, y determinar si el compuesto de ensayo aumenta o reduce la producción de la primera molécula indicadora en la célula.

[0098] Para estos y cualquier método descrito en los mismos, puede usarse una amplia diversidad de indicadores, proporcionando los indicadores típicos señales convenientemente detectables (por ejemplo, por espectroscopia). Como ejemplo, un gen indicador puede codificar una enzima que catalice una reacción que altera las propiedades de absorción de la luz.

[0099] Los ejemplos de moléculas indicadoras incluyen, pero sin limitación, β -galactosidasa, invertasa, proteína verde fluorescente, luciferasa, cloranfenicol acetiltransferasa, beta-glucuronidasa, exoglucanasa, glucoamilasa e indicadores radiomarcados. Por ejemplo, la producción de la molécula indicadora puede medirse por la actividad enzimática del producto génico indicador, tal como β -galactosidasa.

[0100] Puede usarse cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria para exploración de alto rendimiento de numerosos compuestos de ensayo para identificar agentes antineoplásicos candidatos. Por exploración de alto rendimiento se entiende que el método puede usarse para explorar un gran número de compuestos candidatos de forma relativamente fácil y rápida.

[0101] Habiendo identificado un compuesto de ensayo como un agente antineoplásico candidato, el compuesto puede ensayarse adicionalmente *in vivo* o *in vitro* usando técnicas conocidas en este campo para confirmar si es un agente antineoplásico, es decir, para determinar si puede modular la señalización de Wnt/FZD, motilidad de células cancerosas; y/o expresión de FZD y/o Wnt *in vitro* (por ejemplo, usando células aisladas o sistemas sin células) o *in vivo* (por ejemplo, usando un sistema de modelo animal, por ejemplo, roedor) si se desea.

[0102] Pueden realizarse ensayos *in vitro* de un compuesto candidato por medios conocidos por los expertos en la materia, tales como ensayos que implican el uso de células, por ejemplo, células de hígado de tipo silvestre, cancerosas y/o transgénicas. Se describen ensayos ejemplares para controlar la señalización de Wnt/FZD, expresión de FZD y Wnt y motilidad de células cancerosas, así como células útiles que pueden usarse en dichos ensayos, en la sección de Ejemplos, posterior.

[0103] Como alternativa o además, pueden realizarse ensayos *in vivo* de compuestos candidatos por medios conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el compuesto o los compuestos candidatos pueden administrarse a un mamífero, tal como un roedor (por ejemplo, ratón) o conejo. Dichos sistemas de modelos animales están aceptados en la técnica para ensayar agentes farmacéuticos potenciales para determinar su eficacia terapéutica en pacientes, por ejemplo, pacientes humanos. Son animales que son particularmente útiles para ensayos *in vivo* los animales de tipo silvestre o animales de tipo no silvestre (por ejemplo, ratones) que sobreproducen polipéptidos de FZD y/o Wnt, por ejemplo, animales que sobreexpresan un transgén de FZD o Wnt (por ejemplo, un transgén de FZD 7 o Wnt3) y/o que presentan producción reducida de polipéptidos de FZD 8 y/o Wnt11. Otros animales que son útiles para ensayos *in vivo* son animales criados para desarrollar cáncer de hígado. Se describen ciertos ratones transgénicos particularmente útiles que desarrollan cáncer de hígado en la sección de Ejemplos y se incluyen en la presente invención.

[0104] En un ensayo *in vivo* típico, se administra a un animal (por ejemplo, un ratón de tipo silvestre o transgénico), por cualquier vía considerada apropiada (por ejemplo, por inyección) una dosis de un compuesto candidato. Después pueden usarse métodos y criterios convencionales para controlar a los animales con respecto a la actividad deseada. Si es necesario, los resultados obtenidos en presencia del compuesto candidato pueden compararse con resultados en animales de control que no se tratan con el compuesto de ensayo.

Química médica

[0105] Una vez que se ha identificado un compuesto (o agente) de interés, pueden usarse principios convencionales de química médica para producir derivados del compuesto para ciclos adicionales de ensayo. Los derivados pueden explorarse para mejorar las propiedades farmacológicas, por ejemplo, eficacia, farmacocinética, estabilidad, solubilidad y eliminación. Los restos responsables de la actividad de un compuesto en los ensayos descritos anteriormente pueden definirse por examinación de las relaciones de estructura-actividad (SAR) como se practica habitualmente en la técnica. Un experto habitual en la química farmacéutica podría modificar los restos en un compuesto candidato o agente y medir los efectos de la modificación en la eficacia del compuesto o agente para producir de este modo derivados con potencia aumentada. Por ejemplo, véase Nagarajan *et al.* (1988) *J. Antibiot.* 41: 1430-8. Además, si la diana bioquímica del compuesto (o agente) se conoce o se determina, la estructura de la diana y el compuesto puede ayudar al diseño y optimización de derivados. Está disponible en el mercado software de modelación molecular (por ejemplo, Molecular Simulations, Inc.) para este fin.

IV. Anticuerpos

[0106] La invención presenta anticuerpos purificados o aislados que se unen, por ejemplo, se unen específicamente, con un polipéptido de Wnt, es decir, anticuerpos anti Wnt. Un anticuerpo “se une específicamente” con un antígeno particular, por ejemplo, un polipéptido de FZD 7, cuando se une con ese antígeno, pero reconoce y se une en un menor grado (por ejemplo, no reconoce y se une) con otras moléculas en una muestra. Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂ y moléculas producidas usando una biblioteca de expresión de Fab.

[0107] Un ejemplo de un tipo de anticuerpo incluido en la presente invención es el anticuerpo policlonal anti Wnt3 descrito en la sección de Ejemplos, posterior. Los expertos en la materia conocen bien métodos para producir anticuerpos policlonales.

[0108] Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo” se refiere a una proteína que comprende al menos una, por ejemplo, dos, regiones variables de cadena pesada (H) (abreviadas en la presente memoria VH) y al menos una, por ejemplo, dos regiones variables de cadena ligera (L) (abreviadas en la presente memoria VL). Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas “regiones determinantes de complementariedad” (“CDR”), intercalada con regiones que están más conservadas, denominadas “regiones marco conservadas” (FR). El alcance de la región marco conservada y las CDR se ha definido de forma precisa (véase, Kabat, B. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N° 91-3242, y Chothia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino terminal al carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0109] Un anticuerpo anti FZD o Wnt puede incluir además una región constante de cadena pesada o ligera, para formar de este modo una cadena de inmunoglobulina pesada y ligera, respectivamente. El anticuerpo puede ser un tetrámero de dos cadenas de inmunoglobulina pesadas y dos cadenas de inmunoglobulina ligeras, en las que las cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras están interconectadas por, por ejemplo, enlaces disulfuro. La región constante de cadena pesada está comprendida por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. La región constante de cadena ligera está comprendida por un dominio, CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos típicamente median en la unión del anticuerpo con tejidos o factores hospedadores, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

[0110] Un “fragmento de unión a FZD” y “fragmento de unión a Wnt” de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que conserva la capacidad para unirse específicamente con polipéptidos de FZD o Wnt, respectivamente, o con partes de los mismos. Los ejemplos de fragmentos de unión a polipéptido de un anticuerpo incluyen, pero sin limitación: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de una única rama de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético

que permite componerlos como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidos como Fv de cadena sencilla (scFv); véase por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242: 423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también están abarcados dentro de las expresiones “fragmento de unión a FZD” y “fragmento de unión a Wnt” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia.

[0111] Para producir anticuerpos, pueden usarse polipéptidos (o fragmentos antigénicos (por ejemplo, fragmentos de un polipéptido que parece probable que sea antigénico por criterios tales como alta frecuencia de restos cargados) o análogos de dichos polipéptidos), por ejemplo, los producidos por técnicas sintéticas de péptidos o recombinantes (véase, por ejemplo, *Solid Phase Peptide Synthesis*, mencionado anteriormente; Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente). En general los polipéptidos pueden acoplarse a una proteína vehículo, tal como KLH como se describe en Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente, mezclada con un adyuvante, e inyectarse en un mamífero hospedador. Un “vehículo” es una sustancia que confiere estabilidad en y/o ayuda a o potencia el transporte o la inmunogenicidad de una molécula asociada. Por ejemplo, pueden generarse proteínas FZD o Wnt, o fragmentos de las mismas, usando técnicas convencionales de PCR, y pueden clonarse en un vector de expresión pGEX (Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente). Pueden expresarse proteínas de fusión en *E. coli* y purificarse usando una matriz de afinidad de agarosa de glutatión como se describe en Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente.

[0112] Típicamente, se inyecta a diversos animales hospedadores polipéptidos de FZD y/o Wnt. Los ejemplos de animales hospedadores adecuados incluyen conejos, ratones, cobayas y ratas. Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedadora, incluyendo pero sin limitación Freund (adyuvante completo e incompleto), geles minerales adyuvantes tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Dichos procedimientos dan como resultado la producción de anticuerpos policlonales, es decir, poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de los animales inmunizados. Pueden purificarse anticuerpos a partir de sangre obtenida del animal hospedador, por ejemplo, por métodos de cromatografía de afinidad en los que se inmovilizan antígenos de polipéptidos de FZD y/o Wnt en una resina.

[0113] La presente invención también incluye anticuerpos monoclonales anti Wnt. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales (mAb) que son poblaciones homogéneas de anticuerpos específicos para un antígeno particular, usando polipéptidos de Wnt y tecnología de hibridoma convencional (véase, por ejemplo, Kohler *et al.*, Nature, 256: 495, 1975; Kohler *et al.*, Eur. J. Immunol., 6: 511, 1976; Kohler *et al.*, Eur. J. Immunol., 6: 292, 1976; Hammerling *et al.*, en Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, NY, 1981; Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente).

[0114] Típicamente, se producen anticuerpos monoclonales usando cualquier técnica que posibilite la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo, tales como las descritas en Kohler *et al.*, Nature, 256: 495, 1975, y Patente de Estados Unidos N° 4.376.110; la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kosbor *et al.*, Immunology Today, 4: 72, 1983; Cole *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2026, 1983); y la técnica de hibridoma de EBV (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1983). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, y cualquier subclase de las mismas. Los hibridomas que producen los mAb de la presente invención pueden cultivarse *in vitro* o *in vivo*.

[0115] Una vez producidos, los anticuerpos policlonales o monoclonales pueden ensayarse con respecto a reconocimiento, por ejemplo, reconocimiento específico, de polipéptidos de FZD o Wnt en un inmunoensayo, tal como un análisis de transferencia de Western o inmunoprecipitación usando técnicas convencionales, por ejemplo, como se describe en Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente. Son útiles en la presente invención anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos de FZD o Wnt (por ejemplo, FZD 7, Wnt 3 y/o Wnt 11). Por ejemplo, dichos anticuerpos pueden usarse en un inmunoensayo para detectar el polipéptido en una muestra, por ejemplo, una muestra tisular y/o para modular la señalización de FZD/Wnt (por ejemplo, para tratar cáncer, por ejemplo, cáncer de hígado).

[0116] Como alternativa o además, un anticuerpo monoclonal puede producirse de forma recombinante, por ejemplo, producirse por presentación de fagos o por métodos combinatorios como se describen en, por ejemplo, Ladner *et al.* Patente de Estados Unidos N° 5.223.409; Kang *et al.* Publicación Internacional N° WO 92/18619; Dower *et al.* Publicación Internacional N° WO 91/17271; Winter *et al.* Publicación Internacional WO 92/20791; Markland *et al.* Publicación Internacional N° WO 92/15679; Breitling *et al.* Publicación Internacional WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicación Internacional N° WO 92/01047; Garrard *et al.* Publicación Internacional N° WO 92/09690; Ladner *et al.* Publicación Internacional N° WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372; Hay *et al.* (1992) Hum Antibod Hybridomas 3: 81-85; Huse *et al.* (1989) Science 246: 1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) EMBO J 12: 725-734; Hawkins *et al.* (1992) J Mol Biol 226: 889-896; Clackson *et al.* (1991) Nature 352: 624-

628; Gram *et al.* (1992) PNAS 89: 3576-3580; Garrad *et al.* (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) Nuc Acid Res 19: 4133-4137; y Barbas *et al.* (1991) PNAS 88: 7978-7982.

5 **[0117]** Los anticuerpos anti FZD y Wnt pueden ser anticuerpos completamente humanos (por ejemplo, un anticuerpo realizado en un ratón que se ha modificado por ingeniería genética para producir un anticuerpo de una secuencia de inmunoglobulina humana), o anticuerpos no humanos, por ejemplo, anticuerpos de roedor (ratón o rata), conejo, caballo, vaca, cabra, primate (por ejemplo, mono), camello, burro, cerdo o ave.

10 **[0118]** Un anticuerpo anti FZD y anti Wnt puede ser uno en el que la región variable, o una parte de la misma, por ejemplo, las CDR, se genera en un organismo no humano, por ejemplo, una rata o ratón. El anticuerpo anti FZD y anti Wnt también pueden ser, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, con injertos de CDR o humanizados. El anticuerpo anti FZD y anti Wnt también pueden generarse en un organismo no humano, por ejemplo, una rata o ratón, y después modificarse, por ejemplo, en la región variable de marco conservada o constante, para reducir la antigenicidad en un ser humano.

15 **[0119]** Pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851, 1984; Neuberger *et al.*, Nature, 312: 604, 1984; Takeda *et al.*, Nature, 314: 452, 1984) para cortar y empalmar los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una
20 molécula en la que diferentes partes derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un mAAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana.

[0120] Como alternativa, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente de Estados Unidos 4.946.778; y Patentes de Estados Unidos 4.946.778 y 4.704.692) para producir
25 anticuerpos monocatenarios específicos para un polipéptido de FZD o Wnt. Se forman anticuerpos monocatenarios uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un enlace de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido monocatenario.

[0121] Pueden generarse por técnicas conocidas fragmentos de anticuerpo que reconocen y se unen a epítopos
30 específicos. Por ejemplo, dichos fragmentos pueden incluir pero sin limitación fragmentos F(ab')₂, que pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab, que pueden generarse reduciendo los enlaces disulfuro de fragmentos F(ab')₂. Como alternativa, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab (Huse *et al.*, Science, 246: 1275, 1989) para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

35 **[0122]** Pueden usarse anticuerpos policlonales y monoclonales (o fragmentos de los mismos) que se unen específicamente con un polipéptido de FZD y/o Wnt, por ejemplo, para detectar la expresión de FZD y/o Wnt en diversos tejidos de un paciente. Por ejemplo, un polipéptido de FZD 7 y/u 8 puede detectarse en inmunoensayos convencionales de tejidos biológicos o extractos. Los ejemplos de ensayos adecuados incluyen, sin limitación,
40 transferencia de Western, ELISA, radioinmunoensayos y similares.

V. Composiciones farmacéuticas

[0123] Puede incorporarse cualquier compuesto, agente, ácido nucleico, polipéptido o anticuerpo
45 farmacéuticamente activo (todos los cuales pueden denominarse en la presente memoria "compuestos activos"), en composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones típicamente incluyen el compuesto activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" puede incluir disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También pueden incorporarse compuestos activos
50 complementarios en las composiciones.

[0124] Puede formularse una composición farmacéutica para que sea compatible con su vía pretendida de
administración. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración entérica (por ejemplo, oral o rectal) y parenteral, por ejemplo, intravenosa (por ejemplo, en la vena porta del hígado), intradérmica, subcutánea,
55 transdérmica, transmucosa y pulmonar. La administración puede ser directamente en el hígado, por ejemplo, por inyección o por administración tópica durante la cirugía. Las soluciones o suspensiones usadas para inyección pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes
60 tales como ácido etilendiamintetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o frascos de dosis múltiple hechos de vidrio o plástico.

65 **[0125]** Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles

(cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersión. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida hasta el punto de que exista fácil inyectabilidad. Debería ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debería conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Puede conseguirse prevención de la acción de microorganismos por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol y cloruro sódico. Puede conseguirse absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0126] Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

[0127] Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para el fin de administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. También pueden prepararse composiciones orales usando un vehículo líquido para su uso como un colutorio. Pueden incluirse agentes de unión farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido alginico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un emoliente tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saporífero tal como menta, metil salicilato o saporífero de naranja.

[0128] Para administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de una pulverización de aerosol de un recipiente presurizado o dosificador que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas, tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

[0129] La administración sistémica también puede ser por medio transmucoso o transdérmico. Para administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para permear la barrera. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. Puede conseguirse administración transmucosa mediante el uso de pulverizaciones nasales o supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos). Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas como se conocen generalmente en la técnica.

[0130] En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilen vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Resultarán evidentes para los expertos en la materia métodos para la preparación de dichas formulaciones. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También pueden usarse suspensiones liposómicas como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.522.811.

[0131] Puede ser ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto para tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un compuesto activo que se calcula que produce el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

[0132] Puede determinarse la toxicidad y eficacia terapéutica de dichos compuestos por procedimientos

farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la relación DL50/DE50. Se prefieren compuestos que muestren índices terapéuticos altos. Aunque pueden usarse compuestos que muestren efectos secundarios tóxicos, debería tenerse cuidado en diseñar un sistema de suministro que dirija dichos compuestos al sitio de tejido afectado, por ejemplo, hígado para minimizar el daño potencial a las células sanas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

[0133] Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios de animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos queda preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en plasma en circulación que incluya la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición semimáxima de los síntomas) como se determina en cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar con más precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento.

[0134] Las expresiones “cantidad eficaz” y “eficaz para tratar”, como se usan en la presente memoria, se refieren a una cantidad o concentración de un compuesto descrito en la presente memoria utilizado durante un periodo de tiempo (incluyendo administración aguda o crónica y administración periódica o continua) que es eficaz dentro del contexto de su administración para provocar un efecto pretendido o resultado fisiológico. Para compuestos descritos en la presente memoria, una cantidad eficaz, por ejemplo, de un polipéptido (es decir, una dosificación eficaz), varía de aproximadamente 0,001 a 500 mg/kg de peso corporal, por ejemplo de aproximadamente 0,01 a 50 mg/kg de peso corporal, por ejemplo de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal. El polipéptido puede administrarse una vez por semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, por ejemplo entre 2 y 8 semanas, aproximadamente 3 y 7 semanas o durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. El experto en la materia apreciará que ciertos factores influyen en la dosificación y ritmo requeridos para tratar eficazmente a un paciente, incluyendo pero sin limitación el tipo de paciente para tratar, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del paciente, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un paciente con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto puede incluir un único tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos.

[0135] Con respecto a anticuerpos, los anticuerpos parcialmente humanos y anticuerpos completamente humanos tienen una semivida más larga dentro del cuerpo humano que otros anticuerpos. En consecuencia, son posibles dosificaciones menores y administración menos frecuente. Pueden usarse modificaciones tales como lipidación para estabilizar anticuerpos y para potenciar la captación y la penetración tisular. Se describe un método para lipidación de anticuerpos en Cruikshank *et al.* ((1997) *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 14: 193).

[0136] Si el compuesto es una molécula pequeña, las dosis ejemplares incluyen cantidades en miligramos o microgramos de la molécula pequeña por kilogramo de sujeto o peso de la muestra (por ejemplo, de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 500 miligramos por kilogramo, de aproximadamente 100 microgramos por kilogramo a aproximadamente 5 miligramos por kilogramo, o de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 50 microgramos por kilogramo. Se entiende además que las dosis apropiadas de una molécula pequeña dependen de la potencia de la molécula pequeña con respecto a la expresión o actividad para modular. Cuando se va a administrar una o más de estas moléculas pequeñas a un animal (por ejemplo, a un ser humano) para modular la expresión o actividad de un polipéptido o ácido nucleico de FZD o Wnt, un médico, veterinario o investigador puede, por ejemplo, prescribir una dosis relativamente baja al principio, aumentando posteriormente la dosis hasta que se obtenga una respuesta apropiada. Además, se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto animal particular dependerá de una diversidad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto, el momento de administración, la vía de administración, la tasa de secreción, cualquier combinación farmacológica y el grado de expresión o actividad para modular.

[0137] Pueden insertarse moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ADN de FZD 7, FZD 8, Wnt 3, Wnt8b y/o Wnt 11) en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Pueden suministrarse vectores de terapia génica a un sujeto por, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 5.328.470) o por inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que está incluido el vehículo de suministro génico. Como alternativa, cuando el vector de suministro génico completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o

más células que producen el sistema de suministro génico. Se describen construcciones ejemplares que pueden usarse potencialmente en métodos de terapia génica en la sección de Ejemplos, posterior.

[0138] Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dosificador junto con instrucciones para su administración.

VI. Cáncer y tratamientos para el mismo

[0139] El término “cáncer” se refiere a células animales que tienen la capacidad para crecimiento autónomo. Los ejemplos de dichas células incluyen células que tienen un estado anómalo o afección caracterizado por crecimiento celular de proliferación rápida. Se entiende que el término incluye crecimientos cancerosos, por ejemplo tumores; procesos oncogénicos, tejidos metastásicos, y células, tejidos u órganos transformados tumoralmente, independientemente del tipo histopatológico o el estadio de invasividad. También se incluyen tumores malignos de los diversos sistemas orgánicos, tales como sistemas respiratorio, cardiovascular, renal, reproductor, hematológico, neurológico, hepático, gastrointestinal y endocrino; así como adenocarcinomas que incluyen tumores malignos tales como la mayoría de los cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinoma de células no pequeñas del pulmón, cáncer del intestino delgado y cáncer del esófago. El cáncer que es “de origen natural” incluye cualquier cáncer que no se induzca experimentalmente por implantación de células cancerosas en un sujeto, e incluyen, por ejemplo, cáncer de aparición espontánea, cáncer provocado por exposición de un paciente a un carcinógeno o carcinógenos, cáncer resultante de la inserción de un oncogén transgénico o inactivación de un gen supresor de tumores, y cáncer provocado por infecciones, por ejemplo, infecciones virales. El término “carcinoma” se reconoce en la técnica y se refiere a tumores malignos de tejidos epiteliales o endocrinos. El término incluye carcinosarcomas, que incluyen tumores malignos compuestos de tejidos carcinomatosos y sarcomatosos. Un “adenocarcinoma” se refiere a un carcinoma derivado de tejido glandular o en el que las células tumorales forman estructuras glandulares reconocibles. La expresión “carcinoma hepatocelular” (HCC) se refiere a cáncer que surge de hepatocitos, el tipo celular principal del hígado.

[0140] El término “paciente” se usa a lo largo de la memoria descriptiva para describir a un animal, humano o no humano, roedor o no roedor, al que se proporciona tratamiento de acuerdo con los métodos de la presente invención. Se contemplan aplicaciones clínicas veterinarias y humanas. El término “paciente” incluye, pero sin limitación, aves, reptiles, anfibios y mamíferos, por ejemplo, seres humanos, otros primates, cerdos, roedores tales como ratones y ratas, conejos, cobayas, hámsteres, vacas, caballos, gatos, perros, ovejas y cabras. Los sujetos preferidos son seres humanos, animales de granja y mascotas domésticas tales como perros y gatos. El término “tratar (tratamiento)”, se usa en la presente memoria para indicar el retardo de la aparición de, inhibición, alivio de los efectos de o prolongación de la vida de un paciente que padece, una afección, por ejemplo, cáncer.

[0141] Los cánceres que pueden tratarse usando los métodos y composiciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación, cánceres del hígado, estómago, colon, recto, boca/faringe, esófago, laringe, páncreas, pulmón, intestino delgado, y conductos biliares, entre otros.

[0142] Los individuos considerados en riesgo de desarrollar cáncer de hígado pueden beneficiarse particularmente de la invención, principalmente porque el tratamiento profiláctico puede comenzar antes de que haya ninguna prueba de un tumor. Los individuos “en riesgo” incluyen, por ejemplo, individuos expuestos a carcinógenos, por ejemplo, por consumo, por ejemplo, por inhalación y/o ingestión, a niveles que se ha mostrado estadísticamente que promueven el cáncer en individuos susceptibles. También se incluyen individuos expuestos a un virus, por ejemplo, un virus de la hepatitis, por ejemplo, virus de la hepatitis B (VHB). También se incluyen individuos en riesgo debido a la exposición a radiación ultravioleta, o su ambiente, ocupación y/o herencia, así como los que muestran señales de una afección precancerosa. De forma similar, los individuos en etapas muy tempranas de cáncer o desarrollo de metástasis (es decir, solamente una o algunas células aberrantes están presentes en el cuerpo del individuo o en un sitio particular en un tejido de un individuo) pueden beneficiarse de dicho tratamiento profiláctico.

[0143] Los expertos en la materia apreciarán que un médico (o veterinario, según sea apropiado para el paciente que se diagnostique) puede diagnosticar a un paciente que padece o está en riesgo de cáncer usando los métodos descritos en la presente memoria, opcionalmente usando métodos adicionales, por ejemplo, evaluando el historial médico de un paciente, realizando otros ensayos de diagnóstico y/o empleando técnicas de formación de imágenes.

[0144] Una estrategia para tratar pacientes que padecen o están en riesgo de cáncer es modular la señalización de Wnt/FZD en el paciente. El objetivo es aumentar la señalización cuando la señalización es demasiado baja y reducir la señalización cuando la señalización es demasiado alta. La modulación de la señalización de Wnt/FZD queda en dos categorías básicas: disminuir (es decir, reducir, por ejemplo, eliminar) la señalización de Wnt/FZD y aumentar (es decir, complementar o proporcionar) señalización de Wnt/FZD cuando no hay actividad o es insuficiente. Si la señalización de Wnt/FZD debería inhibirse o aumentarse depende de la aplicación pretendida. La señalización de Wnt/FZD puede modularse usando los compuestos activos (por ejemplo, anticuerpos anti Wnt, ARNip, compuestos candidatos y/o agentes antineoplásicos) descritos en la presente memoria. Pueden usarse compuestos que reducen la actividad de señalización de Wnt/FZD, por ejemplo, reduciendo la expresión de FZD y/o

Wnt3 y/o interfiriendo con una interacción entre FZD 7 y su ligando (por ejemplo, Wnt 3, 8b y/u 11), por ejemplo, como tratamientos para cáncer, por ejemplo, cáncer de hígado. También pueden usarse compuestos que aumenten la actividad, por ejemplo, aumentando la expresión de FZD 8, por ejemplo, como tratamientos para el cáncer, por ejemplo, cáncer de hígado.

5

Reducción de la señalización de Wnt/FZD

[0145] Pueden usarse métodos conocidos en la técnica para reducir la expresión de una proteína particular en un paciente para reducir la señalización de Wnt/FZD. Por ejemplo, puede utilizarse un ácido nucleico antisentido eficaz para inhibir la expresión de un gen de FZD o Wnt endógeno, por ejemplo, gen de FZD 7 o Wnt 3. Como se usa en la presente memoria, la expresión "oligonucleótido antisentido" o "antisentido" describe un oligonucleótido que es un oligorribonucleótido, oligodesoxirribonucleótido, oligorribonucleótido modificado u oligodesoxirribonucleótido modificado que hibrida en condiciones fisiológicas con ADN que comprende un gen particular o con un transcrito de ARNm de ese gen y, por lo tanto, inhibe la transcripción de ese gen y/o la traducción de ese ARNm.

15

[0146] Se diseñan moléculas antisentido para interferir con la transcripción o traducción de un gen diana (por ejemplo, un gen que codifica FZD 7 o Wnt 3, 8b u 11) tras su hibridación con el gen diana o transcrito. El ácido nucleico antisentido puede incluir una secuencia de nucleótidos complementaria de un ARN de FZD o Wnt completo o solamente una parte del ARN. Por un lado, el ácido nucleico antisentido necesita ser suficientemente largo para hibridar eficazmente con ARN de FZD o Wnt. Por lo tanto, la longitud mínima es de aproximadamente 12 a 25 nucleótidos. Por otro lado, a medida que aumenta la longitud más allá de aproximadamente 150 nucleótidos, la eficacia en la inhibición de la traducción puede aumentar solo mínimamente, mientras que la dificultad para introducir el ácido nucleico antisentido en células diana puede aumentar significativamente. En consecuencia, una longitud apropiada del ácido nucleico antisentido puede ser de aproximadamente 15 a aproximadamente 150 nucleótidos, por ejemplo, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70 u 80 nucleótidos. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario de una región codificante de ARNm de FZD o Wnt o una región no codificante 5' o 3' de un ARNm de FZD o Wnt, o ambos. Un enfoque es diseñar el ácido nucleico antisentido para que sea complementario de una región en ambos lados del sitio de inicio de la traducción del ARNm de FZD o Wnt.

[0147] Basándose en las secuencias desveladas en la presente memoria, un experto la materia puede seleccionar fácilmente y sintetizar cualquiera de varias moléculas antisentido apropiadas para su uso de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, puede prepararse un "avance génico" que comprende una serie de oligonucleótidos de 15-30 nucleótidos complementarios de y que abarcan la longitud de un ARNm de FZD o Wnt, seguido de ensayo con respecto a la inhibición de la expresión de FZD o Wnt. Opcionalmente, pueden dejarse huecos de 5-10 nucleótidos entre los oligonucleótidos para reducir el número de oligonucleótidos sintetizados y ensayados.

[0148] El ácido nucleico antisentido puede sintetizarse químicamente, por ejemplo, usando un sintetizador de ácido nucleico comercial de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Como alternativa, los ácidos nucleicos antisentido pueden producirse usando técnicas de ADN recombinante. Un ácido nucleico antisentido puede incorporar solamente nucleótidos de origen natural. Como alternativa, pueden incorporar nucleótidos modificados de diversas formas o análogos de nucleótidos para aumentar su semivida *in vivo* o para aumentar la estabilidad de la doble cadena formada entre la molécula antisentido y su ARN diana. Los ejemplos de análogos de nucleótidos incluyen derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Dada la descripción de las dianas y secuencias, el diseño y producción de moléculas antisentido adecuadas está dentro de la experiencia habitual en la técnica. Para directrices con respecto a ácidos nucleicos antisentido, véase, por ejemplo, Goodchild, "Inhibition of Gene Expression by Oligonucleotides," en Topics in Molecular and Structural Biology, Vol. 12: Oligodeoxynucleotides (Cohen, ed.), MacMillan Press, Londres, pp. 53-77 (1989).

[0149] Puede conseguirse suministro de oligonucleótidos antisentido por cualquier método conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede realizarse suministro de oligonucleótidos antisentido para cultivo celular y/o trabajo *ex vivo* por métodos convencionales tales como el método de liposomas o simplemente mediante la adición de oligonucleótidos permeables a membrana.

[0150] El suministro de oligonucleótidos antisentido para aplicaciones *in vivo* puede conseguirse, por ejemplo, mediante inyección local de los oligonucleótidos antisentido en un sitio seleccionado, por ejemplo, un hígado. Este método se ha demostrado previamente para inhibición del crecimiento de la psoriasis y para inhibición de citomegalovirus. Véase, por ejemplo, Wraight *et al.*, (2001). Pharmacol Ther. 90(1): 89-104; Anderson *et al.*, (1996) Antimicrob Agents Chemother 40: 2004-2011; y Crooke *et al.*, (1996) J Pharmacol Exp Ther 277: 923-937.

[0151] De forma similar, pueden usarse técnicas de interferencia de ARN (ARNi) para inhibir la expresión de FZD o Wnt, además de o como alternativa al uso de técnicas antisentido. Por ejemplo, podrían sintetizarse dobles cadenas de ARN de interferencia pequeños (ARNip) dirigidos contra ácidos nucleicos de FZD o Wnt y usarse para evitar la expresión de la proteína o las proteínas codificadas. Se describen ARNip de Wnt3 ejemplares en la sección de Ejemplos posterior.

65

[0152] Otro enfoque para inhibir la señalización de Wnt/FZD implica administrar a un paciente un compuesto, por ejemplo, un compuesto candidato o agente antineoplásico, que se une con polipéptidos de FZD (por ejemplo, polipéptidos de FZD 7) y/o sus compañeros de unión (por ejemplo, Wnt 3, 8b y/u 11), evitando de este modo la interacción entre los dos. Dichos compuestos y agentes pueden, por ejemplo, unirse con el polipéptido de FZD (por ejemplo, con el dominio CRD del polipéptido de FZD) y/o con el polipéptido de Wnt (por ejemplo, con un dominio de unión del polipéptido de Wnt) de tal modo que se evite la interacción entre las proteínas. Dichos compuestos candidatos y agentes antineoplásicos pueden identificarse usando métodos de exploración descritos en la presente memoria. Son ejemplos de compuestos que pueden unirse con un polipéptido de Wnt, por ejemplo, Wnt 3, 8b y/u 11, un receptor FZD 7 o forma truncada del mismo, y un anticuerpo anti Wnt (o fragmento de unión a FZD del mismo), por ejemplo, el anticuerpo anti Wnt3 descrito en la sección de Ejemplos, posterior.

[0153] Otro enfoque más para inhibir la señalización de Wnt/FZD implica administrar a un paciente un vector (por ejemplo, un vector de terapia génica) que codifique una forma mutada (por ejemplo, truncada) de un receptor FZD, por ejemplo, un receptor FZD 7. La expresión de la forma mutada del receptor por las células del paciente que incorporan la construcción puede interferir con la señalización de Wnt/FZD en las células. Por ejemplo, puede usarse una construcción que codifica una forma secretada y soluble de un receptor FZD (por ejemplo, un receptor FZD 7). La expresión de dicha construcción por células diana provocaría que las células secretaran una forma soluble del receptor FZD que se uniría a polipéptidos de Wnt, haciéndolos incapaces de unirse a receptores FZD intactos en la superficie celular. Como alternativa o además, puede usarse una construcción que codifique una forma unida a membrana pero inactiva de un receptor FZD (es decir, un receptor FZD mutante incapaz de realizar alguna función realizada por un receptor FZD de tipo silvestre homólogo). La expresión de dicha construcción por células diana puede unir polipéptidos de Wnt o interferir con la señalización de Wnt/FZD mediante un mecanismo interno que no implica polipéptidos de Wnt. Otro enfoque más para inhibir la señalización de Wnt/FZD implica administrar a un paciente un vector (por ejemplo, un vector de terapia génica) que codifica un polipéptido de Wnt11, que es un supresor de la ruta de Wnt canónica en HCC. El vector puede derivar de un vector de ADN o ARN lineal o circular no replicante, o de un vector plasmídico o viral replicante autónomo. Se conocen en la técnica métodos para construir vectores de expresión adecuados, y están disponibles en el mercado materiales útiles.

Aumento de la señalización de Wnt/FZD

[0154] Puede proporcionarse señalización de Wnt/FZD nueva o complementaria *in vivo* aumentando la expresión de polipéptidos de FZD (por ejemplo, polipéptidos de FZD 8) y/o polipéptidos de Wnt (por ejemplo, polipéptidos de Wnt3) en el paciente. Por ejemplo, puede generarse un polipéptido de FZD o Wnt directamente dentro de un organismo, por ejemplo, un ser humano, expresando dentro de las células del organismo una construcción de ácido nucleico que contenga una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido de FZD (por ejemplo, un polipéptido de FZD 8) y/o polipéptido de Wnt (por ejemplo, polipéptido de Wnt3). Puede usarse cualquier vector de expresión apropiado adecuado para transfectar las células del organismo de interés para dichos fines.

VII. Animales transgénicos

[0155] La presente invención también presenta animales transgénicos que desarrollan cáncer de hígado y sobreexpresan FZD 7 en sus células de hígado. Dichos animales representan sistemas modelo para el estudio de cáncer de hígado y para el desarrollo de agentes terapéuticos que pueden modular la señalización de Wnt/FZD y tratar el cáncer.

[0156] Los animales transgénicos pueden ser, por ejemplo, animales de granja (cerdos, cabras, ovejas, vacas, caballos, conejos y similares), roedores (tales como ratas, cobayas y ratones), primates no humanos (por ejemplo, babuinos, monos y chimpancés), y animales domésticos (por ejemplo, perros y gatos).

[0157] Puede usarse cualquier técnica conocida en este campo para introducir transgenes en animales para producir las líneas fundadoras de animales transgénicos. Dichas técnicas incluyen, pero sin limitación, microinyección pronuclear (Patente de Estados Unidos N° 4.873.191); transferencia génica mediada por retrovirus en líneas germinales (Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82: 6148, 1985); dirección génica en células madre embrionarias (Thompson *et al.*, Cell 56: 313, 1989); y electroporación de embriones (Lo, Mol. Cell. Biol. 3: 1803, 1983). Son especialmente útiles los métodos descritos en Yang *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 3004-3009, 1997).

[0158] Para una revisión de técnicas que pueden usarse para generar y evaluar animales transgénicos, los expertos en la materia pueden consultar Gordon (Intl. Rev. Cytol. 115: 171-229, 1989), y pueden obtener directrices adicionales de, por ejemplo: Hogan *et al.* Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1986); Krimpenfort *et al.* (Bio/ Technology 9: 86, 1991), Palmiter *et al.* (Cell 41:343, 1985), Kraemer *et al.* (Genetic Manipulation of the Early Mammalian Embryo, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1985), Hammer *et al.* (Nature 315: 680, 1985), Purcel *et al.* (Science, 244: 1281, 1986), Wagner *et al.* (Patente de Estados Unidos N° 5.175.385) y Krimpenfort *et al.* (Patente de Estados Unidos N° 5.175.384).

65

Ejemplos

[0159] La invención se ilustra en parte por los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes de la invención de ningún modo.

5

Ejemplo 1. Identificación de ligandos Wnt naturales para inhibición del crecimiento de HCC

Métodos

10 *Preparación de HSPG de superficie celular y fraccionamiento por cromatografía de heparina-agarosa*

[0160] Se cultivaron células Huh7 hasta 70% de confluencia en MEM (Mediatech, Herndon, VA, Estados Unidos) FBS 10% (Sigma, St. Louis, MO). Los medios se cambiaron a MEM FBS 0% 24 horas después de la incubación, y las células se trataron con o sin heparina (50 µg/ml) en MEM FBS 0,1% durante 12 horas. Las células se lavaron 15 veces con PBS helado y las capas celulares se incubaron con tripsina cristalizada (20 µg/ml) en solución salina tamponada con Tris/EDTA durante 10 minutos en hielo. La actividad de tripsina se detuvo mediante la adición de inhibidor de tripsina de soja a una concentración final de 100 µg/ml. Las células contaminadas se retiraron por centrifugación a 400 x g durante 5 minutos a 4 °C de tripsinato.

20 **[0161]** El tripsinato se sometió a cromatografía de heparina-agarosa. Brevemente, el tripsinato se incubó con perlas de heparina (4%) agarosa durante una noche a 4 °C y las perlas se recogieron por centrifugación a 2000 x g durante 4 minutos, las perlas se lavaron con 20 volúmenes de NaCl 0,1 M en PBS. Se recogieron fracciones eluidas con NaCl 0,25, 0,5, 0,75 y 1,0 M en PBS.

25 *Electroforesis en gel bidimensional, digestión en gel y mapeo de péptidos.*

[0162] Se prepararon muestras fraccionadas de cromatografía de heparina-agarosa por precipitación y rehidratación con tampón de IPG para isoelectroenfoque (IEF). Se llevó a cabo IEF usando ZOOM IPGRunner (Invitrogen™, Carlsbad, CA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se rehidrataron tiras de ZOOM (pH 3-10) con muestras durante una noche, después se aplicó un método de rampa de tensión por etapas como sigue: 200 V durante 20 minutos, 450 V durante 15 minutos, 750 V durante 15 minutos y 2000 V durante 120 minutos. Los geles centrados se sometieron a SDS-PAGE usando geles ZOOM (Invitrogen) como electroforesis bidimensional. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron usando kit de Tinción de Plata SilverQuest (Invitrogen).

35 **[0163]** Los puntos proteicos escindidos de geles teñidos con plata se destiñeron y se secaron antes de la digestión enzimática con tripsina modificada de uso en secuencia (Promega, Madison, WI). Los péptidos tripticos se desalaron y se concentraron con ZipTip_{C18} (Millipore, Bedford, MA). Los péptidos tripticos concentrados se aplicaron a ProteinChip SEND y se realizó mapeo de epitopos usando PBSII (CIPHERGEN, Fremont, CA). Se realizó identificación de masas de péptidos con la herramienta de búsqueda de base de datos MS-fit en el programa Protein Prospector, disponible en <http://prospector.ucsf.edu>. Se aplicaron varias restricciones a la búsqueda inicial basándose en la localización del punto en el gel 2-D: especie = *Homo sapiens*, intervalo de pI = 6-9,5, intervalo de masas = 35 - 50 kDa.

Análisis de RT-PCR

45

[0164] Se extrajo ARN celular total usando Reactivo TRIzol® (Invitrogen) de líneas celulares HepG2, Hep3B, Huh7 y Focus. Se sintetizó ADNc de primera cadena de 250 ng de ARN total con hexámeros aleatorios y AMV RT usando Kit de Síntesis de ADNc de Primera Cadena para RT-PCR (AMV) (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) en 20 µl de la mezcla de reacción. Se realizó PCR en un termociclador (MJ Research Inc., Waltham, MA) usando 50 ng de ADNc y PCR de Alta Fidelidad Master (Roche Diagnostics). Los pares de cebadores para cada ligando Wnt se enumeran en la Tabla 1, posteriormente. La concentración final de cada cebador fue de 250 nM. Después de la desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 minutos, las reacciones se sometieron a 35 ciclos del siguiente programa térmico: 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min, seguido de una etapa de elongación final a 72 °C durante 10 min. Los productos amplificados se analizaron en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio.

55

Ensayo de qRT-PCR.

[0165] Se realizó extracción de ARN total y reacción RT de los tejidos del hígado y líneas celulares de HCC como se ha descrito anteriormente. Para determinar los niveles de expresión de ARNm de Wnt3, Wnt11 y FZD7, se realizó qRT-PCR usando el Sistema de Detección de PCR en Tiempo Real Multicolor iCycler iQ (Bio-Rad, Hercules, CA) con una mezcla compuesta de Mezcla Maestra de PCR Verde SYBR (Applied Biosystems, Foster City, CA), 400 nM de cada cebador y 5 ng de ADNc (ARN total equivalente) de muestras desconocidas. Las condiciones de termociclación comprendieron una etapa inicial a 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s. Las secuencias de cebadores para Wnt3, Wnt11, FZD7 y ARNr 18S fueron las siguientes:

65

- (1) Wnt3, 5'-ACTTCGGCGTGTTAGTGTCC-3' (directo) (SEC ID N°: 68) y 5'-CATTTGAGGTGCATGTGGTC-3' (inverso) (SEC ID N°: 69);
 (2) Wnt11, 5'-TTCCGATGCTCCTATGAAGG-3' (directo) (SEC ID N°: 70) y 5'-AGACACCCCATGGCACTTAC-3' (inverso) (SEC ID N°: 71);
 5 (3) FZD7, 5'-GCCGCTTCTACCACAGACT-3' (directo) (SEC ID N°: 72) y 5'-TTCATACCGCAGTCTCCCC-3' (inverso) (SEC ID N°: 73);
 (4) ARNr 18S, 5'-GGACACGGACAGGATTGACA-3' (directo) (SEC ID N°: 74) y 5'-ACCCACGGAATCGAGAAAGA-3' (inverso) (SEC ID N°: 75). Los tamaños de los amplicones fueron de 130 pb para Wnt3, 133 pb para Wnt11, 54 pb para FZD7 y 50 pb para ARNr 18S. Después de la visualización de los
 10 productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa 1,5% y bromuro de etidio, se escindieron los productos de PCR y se clonaron en el Vector pCR 2.1 (Invitrogen). Se realizó secuenciación en ambas direcciones usando cebadores directo T7 e inverso M13. Después de la confirmación de las secuencias de nucleótidos, se prepararon patrones para la PCR en tiempo real con diluciones 10 veces de cada producto de PCR clonado en el Vector pCR 2.1. Los números de copias de ARNm de Wnt3, Wnt11 y FZD7 se cuantificaron en muestras
 15 desconocidas midiendo los valores de Ct seguido de normalización para ARNr 18S después de comparación con curvas patrón para cada gen. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Preparación de plásmidos y Ab anti Wnt3.

- 20 **[0166]** Debido a que 22 aminoácidos del extremo C terminal del plásmido de Wnt3 humano estaban ausentes en el plásmido original (22), este se extendió a la secuencia de longitud completa usando tres ciclos de amplificación por PCR basándose en la secuencia de Wnt3 humana, que se clonó en pcDNA™3.1/myc-His A (Invitrogen) mediante sitios de enzimas de restricción HindIII y EcoRI. Las secuencias de los cebadores fueron:
 5'-TAGTTAAGCTTACCATGGAGCCCCACCTGCTC-3' (directo) (SEC ID N°: 76),
 25 5'-GCAGCTGACGTAGCAGCACCAGTGAAGATGCAGTG-3' (inverso-1) (SEC ID N°: 77),
 5'-GTAGATGCGAATACACTCCTGGCAGCTGACGTAGCA-3' (inverso-2) (SEC ID N°: 78),
 5'-TGCTTGAATTCCTTGCAGGTGTGCACGTCGTAGATGCGAATACA-3' (inverso -3) (SEC ID N°: 79).

- 30 **[0167]** Se prepararon anticuerpos policlonales de conejo contra un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 259-274 de Wnt3 humana (²⁵⁹LRAKYSLFKPPTERDL²⁷⁴) (SEC ID N°: 80). La secuencia peptídica no compartió homología significativa con otros miembros de la familia de Wnt u otras proteínas conocidas. La especificidad del anticuerpo se verificó por análisis de transferencia de Western usando líneas celulares de HCC transfectadas con plásmido de Wnt3 marcado con myc.

35 *Cultivo celular*

- [0168]** Se cultivaron líneas celulares Hep3B, Huh7 y Focus en MEM, complementado con FBS 10% y solución de aminoácidos no esencial de medio esencial mínimo 1X (Sigma). Las células HepG2 se excluyeron debido a la mutación de delección en el gen de β -catenina (31). Se realizaron experimentos de transfección a 70% de confluencia
 40 usando LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) o TransIT-LT1 (Mirus, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se analizó la actividad transcripcional de Tcf usando el Sistema de Ensayo de Luciferasa (Promega, Madison, WI) después de transfectar células con pSUPER8xTOPFLASH o pSUPER8xFOPFLASH (32). Los datos sin tratar para la actividad de luciferasa se normalizaron usando actividad β galactosidasa como un control de la transfección. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se repitieron tres veces para verificar los
 45 resultados.

Efectos de la sobreexpresión de Wnt3 en células de HCC.

- 50 **[0169]** Las células de HCC se transfectaron con plásmidos pcDNA3.1/myc-His A (plásmido de control) o de Wnt3 pSUPER8xTOPFLASH o pSUPER8xFOPFLASH, y plásmido de β -galactosidasa. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se incubaron con MEM FBS 0% durante 24 horas, y después se estimularon con MEM FBS 1%. Las células se recogieron a las 2 horas y 24 horas después de la estimulación, y se sometieron al ensayo de luciferasa y análisis de transferencia de Western para Wnt3 y β -catenina.

55 *Efectos de los anticuerpos anti Wnt3.*

- [0170]** Para los experimentos de bloqueo, las células se sembraron en placas de 12 pocillos y se transfectaron con pSUPER8xTOPFLASH o pSUPER8xFOPFLASH con plásmido de β -galactosidasa como se ha descrito anteriormente. Después de privación de suero durante 24 horas, las células se incubaron con MEM FBS 1% que
 60 contenía Ab anti Wnt3 o Ab de control (10 μ g/ml) y se recogieron 24 horas después de la incubación. Se usó IgG de conejo normal (Upstate, Waltham, MA) como un anticuerpo de control.

Efectos del ARNip.

- [0171]** Se obtuvieron ARNip de control y ARNip de Wnt3 (WNT3-1: 5'-GGAAAAAUGCCACUGCAUC-3' (SEC ID N°: 81),
 5 WNT3-2: 5'-GGAGUGUAUUCGCAUCUAC-3' (SEC ID N°: 82),
 WNT3-3: 5'-GGCUUAUCUUUGCACAUGU-3' (SEC ID N°: 83)) de Ambion (Austin, TX) y se transfectaron en células de HCC a una concentración de 10 o 100 nM con pSUPER8xTOPFLASH o pSUPER8xTOPFLASH, y plásmido de β -galactosidasa usando TransIT-LT1 o DharmaFECT 4 (Dharmacon, Chicago, IL). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se midieron los niveles de expresión de ARNm de Wnt3 y de la actividad transcripcional de Tcf por
 10 qRT-PCR y ensayo de luciferasa, respectivamente.

Efecto del bloqueo de Ab anti Wnt3 en la curación de heridas.

- [0172]** Se sembraron células Focus en una placa de 6 pocillos. Las células de monocapa confluyente se hirieron
 15 con puntas de micropipeta de 200 μ l de plástico estéril. Las células se trataron después con medio con Ab anti Wnt3 o IgG de conejo, y se fotografiaron en diferentes puntos temporales.

Análisis de transferencia de Western

- [0173]** Para extracción de proteína total, las células se homogeneizaron en tampón de lisis (Tris 30 mM, pH 7,5,
 20 cloruro sódico 150 mM, NP-40 1%, desoxicolato sódico 0,5%, SDS 0,1%, glicerol 10% y EDTA 2 mM) con inhibidores de proteinasa (Roche Diagnostics) y se sonicaron. La concentración de proteína se determinó usando el Kit de Ensayo de Proteínas BCA (Pierce, Rockford, IL) con BSA como un patrón. Se separaron cantidades iguales de proteínas (150 μ g) usando SDS-PAGE 12-15% y se transfirieron a membranas de PVDF (PerkinElmer, Wellesley,
 25 MA). Las membranas se bloquearon con BSA 5% en solución salina tamponada con Tris que contenía Tween 20 0,1% y después se incubaron durante una noche a 4 °C con un Ab anti myc monoclonal de ratón diluido a 1:1.000 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), un Ab policlonal de conejo anti Wnt3 diluido a 1:200, un Ab anti β -catenina monoclonal de ratón diluido a 1:1.000 (Transduction Laboratories, San Diego, CA) o un Ab policlonal de conejo anti hsp90 diluido a 1:2.000 (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Después de lavar con solución salina
 30 tamponada con Tris que contenía Tween 20 0,1%, la membrana se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo de HRP secundario diluido 1:10.000 y se visualizó usando la formación de imágenes por quimioluminiscencia Western Lightning (PerkinElmer).

Tejidos de HCC humanos

- [0174]** Se obtuvieron diecisiete pares de tejidos de hígado de HCC y coincidentes, no implicados, peritumorales de
 35 Corea del Sur y Sudáfrica. Doce pares de muestras fueron de pacientes Coreanos que se sometieron a resección quirúrgica. Nueve de los 12 pacientes eran hombres y la media de la edad fue de 52 (intervalo 22-67). Once pacientes fueron positivos para antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) y la etiología fue desconocida en el
 40 paciente restante. Siete pacientes (58%) tenían cirrosis de hígado subyacente. Cinco tejidos de hígado, obtenidos de los pacientes Coreanos que se sometieron a resección hepática para metástasis individual de cánceres colorrectales al hígado, actuaron como los controles para tejidos de hígado normales. Cuatro pacientes eran hombres y la mediana de la edad fue de 46 (intervalo 37-57). La examinación histológica no mostró ninguna patología en los
 45 tejidos de hígado peritumorales, circundantes.

Inmunohistoquímica para β -catenina.

- [0175]** Se desparafinizaron secciones incluidas en parafina, fijadas con formalina, en xileno y se rehidrataron por
 50 concentraciones decrecientes de etanol. Las secciones se sumergieron en tampón de citrato sódico 10 mM (pH 6,0), se hirieron en un horno microondas durante 10 minutos, y se enfriaron a temperatura ambiente para recuperación de epítomos. Los portaobjetos se procesaron después usando un Kit Universal DakoCyto-mation LSAB[®]+, Peroxidasa (DAKO Corp., Carpinteria, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las actividades peroxidasa endógena, de avidina y de biotina se bloquearon por incubación con peróxido de hidrógeno 3% y Kit de Bloqueo de Avidina/Biotina Endógena (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA). Las secciones se
 55 incubaron a 4 °C durante una noche con una dilución 1:500 de Ab monoclonal anti β -catenina humana. Para controles negativos, el anticuerpo primario se reemplazó con PBS. Los patrones de expresión de β -catenina se clasificaron en dos grupos de acuerdo con la presencia de tinción nuclear. También se comparó la tinción citoplasmática en tejidos tumorales con la de tejidos peritumorales.

- 60 *Análisis mutacional con respecto a exón 3 del gen de β -catenina.*

[0176] La mutación del exón 3 del gen de β -catenina se analizó por el método de Wong *et al.* (11) con algunas modificaciones. Brevemente, se amplificó un fragmento de 218 pb del exón 3 del gen de la β -catenina a partir de ADNc (50 ng) de HCC y tejidos de hígado peritumorales circundantes usando el Sistema de PCR de Alta Fidelidad

Expand (Roche Diagnostics). Las secuencias de cebadores fueron 5'-GATTTGATGGAGTTGGACATGG-3' (directa) (SEC ID N°: 84) y 5'-TGTTCTTGAGTGAAGGACTGAG-3' (inversa) (SEC ID N°: 85). Las condiciones de termociclación comprendían una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 58 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Después de la visualización de los productos de PCR, los productos de PCR se clonaron en el Vector pCR 2.1 (Invitrogen) y se secuenciaron posteriormente usando cebadores directo T7 e inverso M13. Se analizaron al menos 5 clones de cada producto de PCR para la secuenciación.

Resultados

10

Identificación de ligandos Wnt en líneas celulares de HCC.

[0177] Puesto que las proteínas Wnt se asocian principalmente con ECM en superficie celular, se realizó un intento de purificar HSPG en superficie celular incluyendo proteína o proteínas Wnt como una forma asociada en Huh7. Se sometieron Huh7-HSPG preparadas por tripsina a resina de afinidad de heparina-agarosa para prefraccionamiento. Las fracciones eluidas se aplicaron a SDS-PAGE y se compararon las bandas proteicas entre muestras tratadas y no tratadas con heparina. A partir de una fracción eluida de NaCl 0,25 M, era distinguible una banda proteica de 45 kDa aproximadamente en la fracción no tratada con heparina (datos no mostrados). Ya que el peso molecular estimado de las proteínas Wnt está en el intervalo de 35-45 kDa, se consideró que esta banda proteica incluía potencialmente proteínas Wnt. Para definir esta banda proteica, se realizó electroforesis bidimensional. Como se muestra en la Figura 1A, hubo varios puntos proteicos teñidos con plata que mostraban niveles diferentes de expresión proteica entre muestras tratadas y no tratadas con heparina. Los puntos proteicos de 35-55 kDa y pl 5-9,5 se consideraron candidatos para proteínas ligando Wnt. Se investigaron dos puntos proteicos regulados positivamente en muestras no tratadas con heparina ya que las proteínas Wnt pueden liberarse por tratamiento con heparina. Se sometieron puntos proteicos escindidos de geles bidimensionales teñidos con plata a digestión en gel, seguido de mapeo de péptidos por espectrometría de masas. Los análisis de datos revelaron que nueve péptidos coincidían con la proteína Wnt11 humana como se muestra en la Figura 1B. Para corroborar adicionalmente este hallazgo, se examinó la expresión de ARNm de Wnt por RT-PCR en líneas celulares de HCC usando 19 pares de cebadores específicos para todos los ligandos Wnt humanos conocidos. Como se muestra en la Figura 1C, solamente el ARNm de Wnt3 y Wnt11, entre los 19 genes de Wnt examinados, se expresaron en líneas celulares de HCC. Ninguno de los otros ARNm de Wnt conocidos se detectaron por RT-PCR. Después de identificarse Wnt3 y Wnt11 en líneas celulares de HCC, se examinaron los niveles de expresión de ARNm usando ensayo de RT-PCR en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR) en líneas celulares de HCC. Los niveles de expresión (media \pm ET) del ARNm de Wnt3 en líneas celulares de HCC fueron $370,0 \pm 10,3$ en HepG2, $381,3 \pm 12,7$ en Hep3B, $95,2 \pm 6,3$ en Huh7 y $210,4 \pm 9,5$ copias por 10^9 ARN ribosómico 18S (ARNr 18S). Los niveles de expresión de ARNm de Wnt11 fueron de $8.499,3 \pm 845,0$ en HepG2, $290,9 \pm 40,1$ en Hep3B y $3,57 \pm 0,2$ copias por 10^9 ARNr 18S en células Huh7. No pudieron detectarse ARNm de Wnt11 en células Focus con RT-PCR en tiempo real, lo que es coherente con el resultado de la RT-PCR convencional (Figura 2B).

40 *Expresión de ARNm de Wnt3, Wnt11 y FZD7 en tejidos de HCC humanos.*

[0178] Catorce de 17 (76,5%) tejidos de HCC y 10 de 17 (58,8%) peritumorales mostraron niveles de expresión de ARNm de Wnt3 aumentados en comparación con los de controles normales, cuando el nivel de punto de corte se definió como un valor de la media \pm 3 ET en tejidos de hígado normales. Solamente un tejido peritumoral mostró expresión reducida en comparación con tejidos de hígado normales. Entre 17 muestras emparejadas, 12 (70,6%) mostraron expresión de ARNm de Wnt3 aumentada en tumores en comparación con tejidos peritumorales correspondientes, pero no fue estadísticamente significativo ($P = 0,435$ por ensayo de rangos con signo de Wilcoxon) (Figura 3A). A diferencia de Wnt3, 11 de 17 (64,7%) muestras emparejadas mostraron expresión reducida de ARNm de Wnt11 en tumores en comparación con tejidos peritumorales, correspondientes, que no era estadísticamente significativa ($P = 0,227$ por ensayo de rangos con signo de Wilcoxon). Sin embargo, 7 de 17 tejidos tumorales (41,2%) mostraron expresión reducida incluso por debajo del nivel de punto de corte inferior de tejidos de hígado normales, mientras que ninguno lo hizo en tejidos peritumorales ($P = 0,0036$ por ensayo exacto de Fischer). Cinco de 17 (29,4%) tejidos tumorales mostraron expresión aumentada de ARNm de Wnt11 en comparación con tejidos de hígado normales, mientras que 9 de 17 (52,9%) tejidos peritumorales lo hicieron. Los tejidos tanto de HCC como peritumorales mostraron expresión de ARNm de FZD7 aumentada en 10 de 17 (58,8%) muestras en comparación con tejidos de hígado normales (Figura 3B). Doce de 17 (70,6%) muestras emparejadas mostraron expresión aumentada de ARNm de FZD7 en tumores en comparación con tejidos peritumorales correspondientes, y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P = 0,031$ por ensayo de rangos con signo de Wilcoxon) (Figura 3C).

60

Acumulación nuclear de β -catenina.

[0179] La tinción inmunohistoquímica mostró acumulación nuclear de β -catenina en 7 de 17 (41%) tejidos de HCC. No hubo acumulación nuclear de β -catenina en tejidos peritumorales, circundantes (Figura 7). Las 7 muestras con

acumulación nuclear de β -catenina también mostraron tinción aumentada para β -catenina en el citoplasma. Entre los 10 tejidos tumorales sin acumulación nuclear de β -catenina, una muestra mostró tinción citoplasmática aumentada para β -catenina, en comparación con su tejido peritumoral correspondiente.

- 5 **[0180]** Por análisis de secuenciación, se hallaron mutaciones en el exón 3 del gen de β -catenina en 4 de 17 (23,5%) muestras de HCC, mientras que no se halló ninguna en tejidos peritumorales, circundantes. Todas fueron mutaciones individuales de sentido erróneo que afectaban a los codones 35, 37 y 45 (dos I35S, una S37C y una S45F). Tres de las 7 (42,9%) muestras que mostraron acumulación nuclear de β -catenina por tinción inmunohistoquímica tuvieron mutaciones en la región responsable de fosforilación y ubiquitinización de β -catenina.
- 10 Una muestra que tenía una mutación en el gen de β -catenina (I35S) pero no tenía acumulación nuclear de β -catenina tenía tinción citoplasmática aumentada en tinción inmunohistoquímica. Las 4 muestras restantes que tenían acumulación nuclear de β -catenina pero no tenían ninguna mutación en el gen de la β -catenina tenían niveles de ARNm de FZD7 aumentados en comparación con tejidos peritumorales emparejados. Los niveles de ARNm de FZD7 también estaban aumentados 7-74 veces en comparación con el valor medio de tejidos de hígado normales.
- 15 Sin embargo, los niveles de expresión de ARNm de Wnt3 y/o Wnt11 no estaban relacionados con la acumulación nuclear de β -catenina.

Efectos de la sobreexpresión de Wnt3 en líneas celulares de HCC.

- 20 **[0181]** Para determinar el efecto de Wnt3 en la ruta de Wnt canónica en HCC, se examinaron cambios de la actividad transcripcional del factor de linfocitos T (Tcf) después de transfección con plásmido de Wnt3. La transfección con plásmido de Wnt3 dio como resultado aumentos notables tanto en ARNm (datos no mostrados) como en los niveles de expresión de proteínas, como se demuestra en la Figura 5A. La actividades transcripcionales de Tcf también mostraron aumentos de aproximadamente 3 veces en células Focus, en comparación con las de
- 25 controles, que eran estadísticamente significativos ($P < 0,01$). Sin embargo, las actividades transcripcionales de Tcf no estaban cambiadas en células Hep3B, e incluso se reducían en células Huh7, especialmente 24 horas después de la estimulación (Figura 5B). De forma coherente con estos resultados, el nivel de β -catenina celular aumentó en células Focus después de la transfección con plásmido de Wnt3, mientras que no cambió o se redujo en células Hep3B o Huh7, como se demuestra por análisis de transferencia de Western (Figura 5A).

30

Antagonismo de la señalización de Wnt3 por Ab anti Wnt3 o ARNip de Wnt3.

- [0182]** A continuación, se examinaron los efectos de la inhibición por Ab anti Wnt3 o ARNip en la ruta canónica en líneas celulares de HCC, debido a que las actividades transcripcionales de Tcf de línea basal y los niveles de β -catenina celular ya eran altos en células Huh7 y Hep3B, en comparación con células Focus (Figura 5). La incubación con Ab anti Wnt3 policlonal dio como resultado reducciones de las actividades luciferasa en 60% en Huh7, 26% en Hep3B y 40% en células Focus (Figura 6A). Para confirmar este efecto inhibitorio en la ruta canónica, se usaron ARNip para Wnt3. En primer lugar, se evaluaron las eficacias de inhibición de 3 tipos diferentes de ARNip en células Huh7 y Hep3B usando ensayo de qRT-PCR. Se descubrió que ARNip Wnt3-3 era el más eficaz (datos no mostrados) con una reducción media de los niveles de ARNm de 50-60% a una concentración de 100 nM (Figura 6B). De forma coherente con estas reducciones de ARNm, las actividades transcripcionales de Tcf también se redujeron en 48,5% en Huh7, 33% en Hep3B y 43,5% en células Focus (Figura 6C). Por lo tanto, se concluyó que la inhibición de Wnt3 podría dar como resultado la supresión de la ruta canónica en líneas celulares de HCC.

45 *Efectos del tratamiento con Ab anti Wnt3 en la curación de heridas en células de HCC.*

- [0183]** También se investigó si la inhibición de la actividad transcripcional de Tcf podría conducir a cambios funcionales del comportamiento de las células de HCC. El ensayo de curación de heridas usando células Focus mostró curación de heridas retardada en células tratadas con Ab anti Wnt3 y los cambios fueron más prominentes a
- 50 las 24 horas. A las 24 horas, la mayor parte de la herida estaba cubierta con células migratorias y/o proliferativas en células Focus tratadas con Ab de control, mientras que persistió en células tratadas con Ab anti Wnt3 (Figura 7).

- [0184]** Este estudio analizó el patrón de expresión de ligandos Wnt en el hígado y HCC. Se descubrió que se expresaban ARNm de Wnt3 y Wnt11 en la mayoría de las líneas celulares de HCC ensayadas usando métodos de
- 55 RT-PCR convencional y qRT-PCR. También se demostró expresión de Wnt11 a su nivel proteico usando tecnología proteómica. De forma coherente con estas observaciones en líneas celulares de HCC, también se confirmó expresión de ARNm de Wnt3 y Wnt11 en tejidos de hígado humano que incluían HCC.

- [0185]** Los patrones de expresión de Wnt3, Wnt11 y FZD7 se determinaron en tejidos de hígado humano incluyendo HCC y tejidos peritumorales correspondientes. Los niveles de ARNm de FZD7 en tejidos tumorales estaban más elevados que los de tejidos peritumorales correspondientes y tejidos de hígado normales. Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativa en la expresión de ARNm de Wnt3 entre HCC y tejidos peritumorales, 71% de los HCC mostraron expresión de Wnt3 aumentada en comparación con sus tejidos peritumorales correspondientes. Además, 77% de los HCC y 59% de los tejidos peritumorales mostraron niveles de expresión de

ARNm de Wnt3 aumentados por encima del valor de la media \pm 3 DT en tejidos de hígado normales. Estos hallazgos sugieren que la regulación positiva de Wnt3 podría ser un acontecimiento temprano durante la hepatocarcinogénesis y/o desempeñar un papel importante en la regeneración de hepatocitos durante la inflamación hepática y necrosis.

5 **[0186]** Además, 65% de las muestras de HCC emparejadas mostraron expresión reducida de ARNm de Wnt11 en tumores en comparación con tejidos peritumorales correspondientes. 41% de los tejidos tumorales mostraron niveles de expresión reducidos de Wnt11 incluso por debajo del nivel de punto de corte inferior de los tejidos de hígado normales. Estos hallazgos fueron compatibles con el papel de Wnt11 como un supresor de la ruta canónica.

10 **[0187]** También se descubrió que la sobreexpresión de Wnt3 activaba la ruta de Wnt canónica en células Focus, como se demuestra por un aumento de 3 veces de la actividad transcripcional Tcf y aumento de los niveles de β -catenina celulares. Sin embargo, las actividades transcripcionales de Tcf no estaban cambiadas en células Hep3B e incluso se redujeron ligeramente en células Huh7, incluso aunque las expresiones de proteínas y ARNm de Wnt3 aumentaban notablemente después de la transfección.

15 **[0188]** La inhibición de Wnt3 por Ab anti Wnt3 policlonal o ARNip redujo las actividades transcripcionales de Tcf en las 3 líneas celulares de HCC. Estos cambios fueron más prominentes en células Huh7 que tenían las mayores actividades transcripcionales de Tcf de línea basal. Además, el tratamiento de células Focus con Ab anti Wnt3 inhibió la curación de heridas, lo que sugiere que la consecuencia funcional de esta inhibición fue la reducción de la migración y proliferación celular.

20 **[0189]** Se observó acumulación nuclear y/o citoplasmática de β -catenina en 8 de 17 (47%) tejidos de HCC y la mitad de estos casos tenían mutaciones del gen de la β -catenina. Los 4 casos restantes con acumulación de β -catenina pero sin mutaciones tenían niveles elevados notables de FZD7 en tumores, lo que sugiere que la regulación positiva de FZD7 está directamente relacionada con la activación de la ruta de señalización de Wnt canónica en estos tumores. Los niveles de expresión de Wnt3 o Wnt11 no se relacionaban con la acumulación de β -catenina ni con la de FZD7.

25 **[0190]** En conclusión, se identificó Wnt3 y Wnt11 en líneas celulares de HCC y en tejidos de hígado humanos incluyendo tejidos de HCC. Los niveles de expresión de ARNm de Wnt3 estaban regulados positivamente en tejidos tanto HCC como peritumorales en comparación con los de los tejidos de hígado normales. La expresión de ARNm de Wnt11 estaba regulada negativamente en tejidos de HCC. La inhibición de Wnt3 por Ab anti Wnt3 o ARNip dio como resultado una reducción de la ruta de señalización de Wnt canónica y reducción de la curación de heridas, mientras que la estimulación de Wnt3 aumentó la actividad transcripcional de Tcf en células Focus. Estos hallazgos sugieren que Wnt3 es el ligando Wnt natural relacionado con la sobreexpresión de FZD7 y la activación de la ruta de señalización de Wnt canónica sin mutaciones de β -catenina durante la hepatocarcinogénesis.

Referencias

40 **[0191]**

1. Davila, J. A., Morgan, R. O., Shaib, Y., McGlynn, K. A., y El-Serag, H. B. 2004. Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based study. *Gastroenterology* 127: 1372-1380.
2. Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L., y Moon, R. T. 1995. Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol* 15: 2625-2634.
3. Liang, H., Chen, Q., Coles, A. H., Anderson, S. J., Pihan, G., Bradley, A., Gerstein, R., Jurecic, R., y Jones, S. N. 2003. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* 4: 349-360.
4. Maye, P., Zheng, J., Li, L., y Wu, D. 2004. Multiple mechanisms for Wnt11-mediated repression of the canonical Wnt signaling pathway. *J Biol Chem* 279: 24659-24665.
5. Iozzo, R. V., Eichstetter, I., y Danielson, K. G. 1995. Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy. *Cancer Res* 55: 3495-3499.
6. Lejeune, S., Huguet, E. L., Hamby, A., Poulson, R., y Harris, A. L. 1995. Wnt5a cloning, expression, and up-regulation in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res* 1: 215-222.
7. Weeraratna, A. T., Jiang, Y., Hostetter, G., Rosenblatt, K., Duray, P., Bittner, M., y Trent, J. M. 2002. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 1: 279-288.
8. Kinzler, K. W., y Vogelstein, B. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170.
9. Devereux, T. R., Stem, M. C., Flake, G. P., Yu, M.C., Zhang, Z. Q., London, S.J., y Taylor, J. A. 2001. CTNNB1 mutations and beta-catenin protein accumulation in human hepatocellular carcinomas associated with high exposure to aflatoxin B1. *Mol Carcinog* 31: 68-73.
10. Hsu, H. C., Jeng, Y. M., Mao, T.L., Chu, J. S., Lai, P. L., y Peng, S. Y. 2000. Beta-catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. *Am J Pathol* 157: 763-770.

11. Wong, C. M., Fan, S. T., y Ng, I. O. 2001. Beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer* 92: 136-145.
12. Huang, H., Fujii, H., Sankila, A., Mahler-Araujo, B. M., Matsuda, M., Cathomas, G., y Ohgaki, H. 1999. Beta-catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Pathol* 155: 1795-1801.
13. Laurent-Puig, P., Legoix, P., Bluteau, O., Belghiti, J., Franco, D., Binot, F., Monges, G., Thomas, G., Bioulac-Sage, P., y Zucman-Rossi, J. 2001. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 120: 1763-1773.
14. Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Ishiguro, H., Fujita, M., Tokino, T., *et al.* 2000. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 24: 245-250.
15. Merle, P., de la Monte, S., Kim, M., Herrmann, M., Tanaka, S., Von Dem Bussche, A., Kew, M.C., Trepo, C., y Wands, J. R. 2004. Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127: 1110-1122.
16. Merle, P., Kim, M., Herrmann, M., Gupte, A., Lefrancois, L., Califano, S., Trepo, C., Tanaka, S., Vitvitski, L., Monte, S.D., *et al.* 2005. Oncogenic role of the frizzled-7/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*.
17. Lin, X., y Perrimon, N. 1999. Dally cooperates with Drosophila Frizzled 2 to transduce Wingless signalling. *Nature* 400:281-284.
18. Willert, K, Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R, 3rd, y Nusse, R 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423: 448-452.
19. Bradley, R. S., y Brown, A. M. 1990. The proto-oncogene int-1 encodes a secreted protein associated with the extracellular matrix. *Embo J* 9: 1569-1575.
20. Reichsman, F., Smith, L., y Cumberledge, S. 1996. Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wntless protein and promote signal transduction. *J Cell Biol* 135: 819-827.
21. Dhoot, G. K, Gustafsson, M. K., Ai, X., Sun, W., Standiford, D. M., y Emerson, C. P., Jr. 2001. Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. *Science* 293: 1663-1666.
22. Roelink, H., Wang, J., Black, D. M., Solomon, E., y Nusse, R 1993. Molecular cloning and chromosomal localization to 17q21 of the human WNT3 gene. *Genomics* 17: 790-792.
23. Shimizu, H., Julius, M. A., Giarre, M., Zheng, Z., Brown, A. M., y Kitajewski, J. 1997. Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ* 8: 1349-1358.
24. Katoh, M. 2001. Molecular cloning and characterization of human WNT3. *Int J Oncol* 19: 977-982.
25. Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destree, O., Kielman, M., y Clevers, H. 2005. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 129: 626-638.
26. Kirikoshi, H., Sekihara, H., y Katoh, M. 2001. Molecular cloning and characterization of human WNT11. *Int J Mol Med* 8: 651-656.
27. Zhu, H., Mazor, M., Kawano, Y., Walker, M. M., Leung, H. Y., Armstrong, K., Waxman, J., y Kypta, R. M. 2004. Analysis of Wnt gene expression in prostate cancer: mutual inhibition by WNT11 and the androgen receptor. *Cancer Res* 64: 7918-7926.
28. Smolich, B. D., McMahon, J. A., McMahon, A. P., y Papkoff, J. 1993. Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. *Mol Biol Cell* 4: 1267-1275.
29. Cha, M. Y., Kim, C. M., Park, Y. M., y Ryu, W. S. 2004. Hepatitis B virus X protein is essential for the activation of Wnt/beta-catenin signaling in hepatoma cells. *Hepatology* 39: 1683-1693.
30. Veeman, M. T., Slusarski, D. C., Kaykas, A., Louie, S. H., y Moon, R. T. 2003. Zebrafish prickles, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr Biol* 13: 680-685.
31. Carruba, G., Cervello, M., Miceli, M. D., Farruggio, R., Notarbartolo, M., Vircuso, L., Giannitrapani, L., Gambino, R., Montalto, G., y Castagnetta, L. 1999. Truncated form of beta-catenin and reduced expression of wild-type catenins feature HepG2 human liver cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 886: 212-216.
32. Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., y Clevers, H. 1997. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 275: 1784-1787.

Tabla 1. Pares de cebadores usados para la detección de ARNm del ligando Wnt

Wnt	Secuencia	SEC ID N°
GAPDH	Sentido: 5'-GAAATCCCATCACCATCTTCCAG-3'	28
	Anti sentido: 5'-ATGAGTCCTCCACGATACCAAAG-3'	29
Wnt1	Sentido: 5'-TGTTGCCTGGCTGGGTTTC-3'	30
	Anti sentido: 5'-CTGTAAGCAGTTTCGTGGAG-3'	31
Wnt2	Sentido: 5'-GTGGATGCAAAGGAAAGGAA-3'	32
	Anti sentido: 5'-AGCCAGCATGTCCTGAGAGT-3'	33

Wnt	Secuencia	SEC ID N°
Wnt2b	Sentido: 5'-ACCCAAGATGGTGCCAACTTC-3'	34
	Anti sentido: 5'-CACAAACCGTCTGTTCCCTTTTGATG-3'	35
Wnt3	Sentido: 5'-GGAGTGTATTCGCATCTACGACG-3'	36
	Anti sentido: 5'-CGAGTTGGGTCTGGGTCATTTAC-3'	37
Wnt3a	Sentido: 5'-CCCCACTCGGATACTTCTTACTCC-3'	38
	Anti sentido: 5'-CTCCTGGATGCCAATCTTGATG-3'	39
Wnt4	Sentido: 5'-TTTGTGGATGTGCGGGAGAG-3'	40
	Anti sentido: 5'-ATCTGTGTGCGGCTTGAAGT-3'	41
Wnt5a	Sentido: 5'-ACACCTCTTCCAAACAGGCC-3'	42
	Anti sentido: 5'-GGATTGTTAAACTCAACTCTC-3'	43
Wnt5b	Sentido: 5'-GGAGCGAGAGAAGAAGACTTTGCC-3'	44
	Anti sentido: 5'-GAAGCAGCACCAGTGGAAGT-3'	45
Wnt6	Sentido: 5'-CTTGTTATGGACCCTACCCAGGCATC-3'	46
	Anti sentido: 5'-CACTGCAGCAGCTCGCCATAGAA-3'	47
Wnt7a	Sentido: 5'-GCTGCCTGGGCCACCTCTTCTCA-3'	48
	Anti sentido: 5'-CCCGGTGGTACAGGCCTTGCTTCT-3'	49
Wnt7b	Sentido: 5'-TCAACGAGTGCCAGTACCAG-3'	50
	Anti sentido: 5'-CCCTCGGCTTGGTTGTAGTA-3'	51
Wnt8a	Sentido: 5'-TCCAGTTTGCTTGGGAACGC-3'	52
	Anti sentido: 5'-CCATCACAGCCACAGTTTTTCG-3'	53
Wnt8b	Sentido: 5'-CATCTGTCTTTTACCTGTGCCTC-3'	54
	Anti sentido: 5'-AATGCTGTCTCCCGATTGGC-3'	55
Wnt10a	Sentido: 5'-TCTGGGTGCTCCTGTTCTTCTAC-3'	56
	Anti sentido: 5'-ATTGGTGTGGCATTCTGG-3'	57
Wnt10b	Sentido: 5'-ACTGTCCCGAGGCAAGAGTTTC-3'	58
	Anti sentido: 5'-GCATTTCCGCTTCAGGTTTTC-3'	59
Wnt11	Sentido: 3'-TGCTGACCTCAAGACCCGATAC-3'	60
	Anti sentido: 3'-TGTCGCTTCCGTTGGATGTC-3'	61
Wnt14	Sentido: 5'-TGCCAGTTCAGTTCGCTTTG-3'	62
	Anti sentido: 5'-TTCACACCCACGAGGTTGTTG-3'	63
Wnt15	Sentido: 5'-TGAGTGCCAGTTTCAGTTCG-3'	64
	Anti sentido: 5'-CTTGTTTCTCTCTTGGACCCC-3'	65
Wnt16	Sentido: 5'-CTGCTCCGATGATGTCCAGTATG-3'	66
	Anti sentido: 5'-CATTCTCTGCCTTGTGTCCCTG-3'	67

[0192] Se han descrito varias realizaciones de la invención. No obstante, se entenderá que pueden realizarse diversas modificaciones. En consecuencia, otras realizaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un agente anti-cáncer de hígado, comprendiendo el método:

5 seleccionar un compuesto de ensayo que se une a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína Wnt3 o Wnt11 o un fragmento de unión a FZD de la misma; y determinar si el compuesto de ensayo es capaz de:

- 10 (a) reducir la señalización de Wnt/FZD 7 en una célula de hígado;
 (b) reducir la motilidad de células de cáncer de hígado;
 (c) reducir la acumulación de β -catenina en una célula de cáncer de hígado; o
 (d) tratar el cáncer de hígado *in vitro* o en un animal no humano *in vivo*;

en el que un compuesto de ensayo que es capaz de al menos uno de (a) a (d) es un agente anti-cáncer de hígado.

15

2. El método de la reivindicación 1, en el que

(a) la selección del compuesto de ensayo comprende:

20 poner en contacto el compuesto de ensayo con el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína Wnt3 o Wnt11 o un fragmento de unión a FZD del mismo; detectar la unión entre el polipéptido y el compuesto de ensayo, y seleccionar el compuesto de ensayo si se une con el polipéptido; y/o

25 (b) el polipéptido se proporciona como:

- (i) un polipéptido de origen natural;
 (ii) un polipéptido recombinante;
 (iii) un polipéptido expresado en la superficie de una célula; o
 30 (iv) un polipéptido aislado; y/o

(c) el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína Wnt3; o

(d) el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína Wnt3, en la que dicha secuencia de aminoácidos comprende cualquiera de las SEC ID N°: 8 a 12 y al menos una secuencia no Wnt, y/o

35 (e) el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína Wnt11; o

(f) el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína Wnt11, en la que dicha secuencia de aminoácidos comprende cualquiera de las SEC ID N°: 22 a 26 y al menos una secuencia no Wnt.

3. Un compuesto para su uso en el tratamiento de cáncer de hígado o para su uso en la reducción de la motilidad de
 40 cáncer de hígado en un paciente, en el que el compuesto comprende:

(a) un anticuerpo anti-Wnt3;

(b) un anticuerpo anti-Wnt3 que se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos LRAKYSFLFKPPTERDL (SEC ID N°: 80);

45 (c) un siARN que reduce la expresión de Wnt3 en el paciente; o

(d) un siARN que reduce la expresión de Wnt3 en el paciente y comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: WNT3-1: 5'-GGAAAAAUGCCACUGCAUC-3' (SEC ID N°: 81), WNT3-2: 5'-GGAGUGUAUUCGCAUCUAC-3' (SEC ID N°: 82) y WNT3-3: 5'-GGCUUAUCUUUGCACAUGU-3' (SEC ID N°: 83).

50

4. Un método para identificar un agente anti-cáncer de hígado candidato, comprendiendo el método:

(a) proporcionar un primer polipéptido que:

- 55 (i) comprende un polipéptido de FZD 7 o un fragmento del mismo; y
 (ii) presenta capacidad de unión con Wnt;

(b) proporcionar un segundo polipéptido que:

- 60 (i) comprende un polipéptido de Wnt 3 o Wnt 11 o un fragmento del mismo; y
 (ii) presenta capacidad de unión con FZD 7;

(c) poner en contacto el primer y segundo polipéptidos en presencia de un compuesto de ensayo; y

65 (d) comparar el nivel de unión entre el primer y segundo polipéptidos en presencia del compuesto de ensayo con el nivel de unión en ausencia del compuesto de ensayo, en el que un nivel reducido de la unión en presencia del

compuesto de ensayo que en su ausencia indica que el compuesto de ensayo es un agente anti-cáncer candidato, comprendiendo además opcionalmente el método:

(e) determinar si el agente anti-cáncer de hígado candidato es capaz de:

- 5 (i) reducir la señalización de Wnt/FZD 7 en una célula que exprese FZD 7;
 (ii) reducir la motilidad de células de cáncer de hígado;
 (iii) reducir la acumulación de β -catenina en una célula de cáncer de hígado; o
 (iv) tratar el cáncer de hígado *in vitro* o en un animal no humano *in vivo*;

10 en el que un candidato que es capaz de al menos uno de (i) a (iv) es un agente anti-cáncer de hígado.

5. El método de la reivindicación 4, en el que

- 15 (a) el compuesto de ensayo se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos, ácidos ribonucleicos, moléculas pequeñas y ácidos desoxirribonucleicos; o
 (b) en el que el primer polipéptido es una primera proteína de fusión que comprende un polipéptido de FZD fusionado con:

- 20 (i) un dominio de activación de la transcripción de un factor de la transcripción o
 (ii) un dominio de unión a ADN de un factor de la transcripción; el segundo polipéptido es una segunda proteína de fusión que comprende un polipéptido de Wnt fusionado con
 (iii) un dominio de activación de la transcripción de un factor de transcripción o
 (iv) un dominio de unión a ADN de un factor de transcripción, en el que el polipéptido de Wnt está fusionado
 25 con un dominio diferente del fusionado con el polipéptido de FZD; y se detecta unión del primer y segundo polipéptidos como reconstitución de un factor de transcripción; o

- (c) en el que el segundo polipéptido comprende un polipéptido de Wnt3 o fragmento del mismo; o
 (d) en el que el segundo polipéptido comprende cualquiera de SEC ID N°: 8 a 12 y al menos una secuencia no Wnt;
 30 (e) en el que el segundo polipéptido comprende un polipéptido de Wnt11 o fragmento del mismo; o
 (f) en el que el segundo polipéptido comprende cualquiera de SEC ID N°: 22 a 26 y al menos una secuencia no Wnt.

6. Un método para determinar si una célula de hígado es, o está en riesgo de convertirse en, una célula cancerosa,
 35 comprendiendo el método:

- (a) proporcionar una célula de hígado de ensayo obtenida de un paciente;
 (b) determinar si el nivel de expresión de Wnt3 de la célula es mayor que el de una célula de control; y
 40 (c) clasificar la célula de ensayo como una célula cancerosa o en riesgo de convertirse en una célula cancerosa, si el nivel de expresión de Wnt3 de la célula de ensayo es mayor que el de la célula de control.

7. Un método para determinar si una muestra de tejido de un paciente que padece o está en riesgo de cáncer de hígado, comprendiendo el método:

- 45 (a) proporcionar una muestra de tejido hepático de ensayo obtenida del paciente, incluyendo una muestra que es tejido tumoral o tejido peritumoral; y
 (b) determinar si el nivel de expresión de Wnt3 en la muestra de tejido de ensayo es mayor que el de una muestra de tejido comparable obtenida de un individuo sano, en el que un nivel de expresión mayor en la muestra de tejido de ensayo es un indicio de que el paciente padece o está en riesgo de cáncer; y opcionalmente
 50 que comprende además
 (c) determinar si el nivel de expresión de Wnt11 en la muestra tisular de ensayo es menor que el de una muestra de tejido obtenida de un individuo sano, en el que un nivel menor de expresión de Wnt11 es un indicio de que el paciente padece o está en riesgo de cáncer.

55 8. El método de la reivindicación 6 ó 7:

- (a) en el que determinar el nivel de expresión de Wnt3 incluye determinar la cantidad de ARNm de Wnt3 en la muestra celular de ensayo o de tejido de ensayo;
 (b) en el que determinar el nivel de expresión de Wnt3 incluye determinar la cantidad de ARNm de Wnt3 en la muestra celular o de tejido de ensayo usando un ensayo de transferencia de Northern o un ensayo de RT-PCR;
 60 (c) en el que determinar el nivel de expresión de Wnt3 incluye determinar la cantidad de proteína Wnt3 en la muestra celular de ensayo o de tejido de ensayo;
 (d) en el que determinar el nivel de expresión de Wnt3 incluye determinar la cantidad de proteína Wnt3 en la muestra celular o de tejido de ensayo usando un anticuerpo, incluyendo un anticuerpo que se une con la
 65 secuencia de aminoácidos LRAKYSLFKPPTERDL (SEC ID N°: 80); o

(e) que comprende además determinar si el nivel de expresión de Wnt11 en la célula de ensayo o el tejido de ensayo es menor que el de una célula de control o tejido de control, en el que un menor nivel de expresión de Wnt11 indica que

- 5 (i) la célula de ensayo es, o está en riesgo de convertirse en, una célula cancerosa o
(ii) el paciente padece o está en riesgo de cáncer.

9. Un anticuerpo que se une a la secuencia de aminoácidos LRAKYSLFKPPTERDL (SEC ID N°: 80).

10 10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 9 y un portador farmacéuticamente aceptable.

11. El anticuerpo de la reivindicación 9 para su uso en terapia.

15 12. El anticuerpo de la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento del cáncer de hígado.

13. Una composición que comprende un siARN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: WNT3-1: 5'-GGAAAAUGCCACUGCAUC-3' (SEC ID N°: 81), WNT3-2: 5'-GGAGUGUAUUCGCAUCUAC-3' (SEC ID N°: 82) y WNT3-3: 5'-GGCUUAUCUUUGCACAUGU-3' (SEC ID N°: 83) para su uso en el tratamiento de
20 cáncer de hígado.

14. Una composición que comprende un polipéptido de Wnt11 o una construcción genética que codifica un polipéptido de Wnt11 para su uso en el tratamiento del cáncer de hígado.

25 15. La composición de la reivindicación 14, en la que la composición se administra directamente al hígado del paciente *in situ*.

16. El anticuerpo de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fab o un
30 fragmento F(ab')₂.

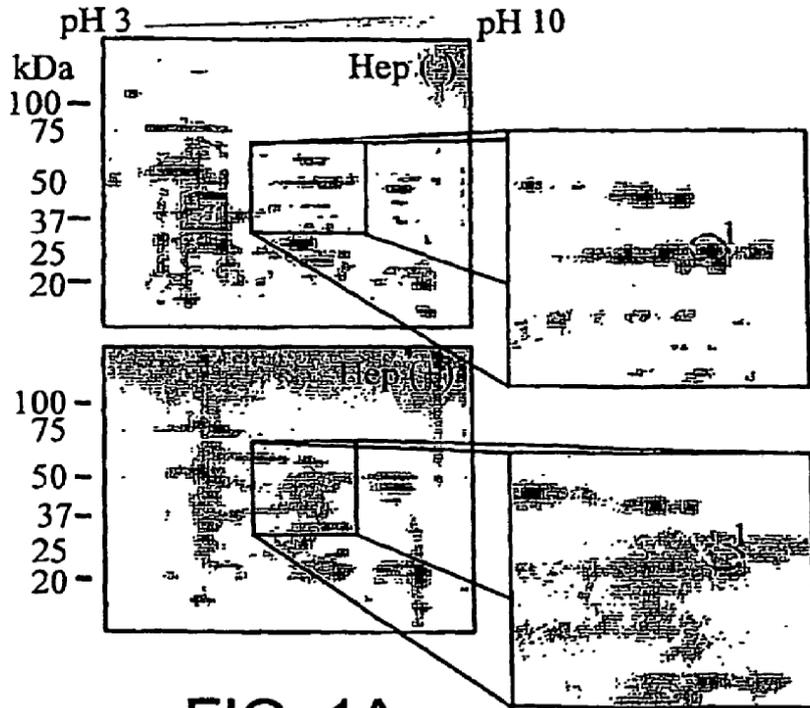


FIG. 1A

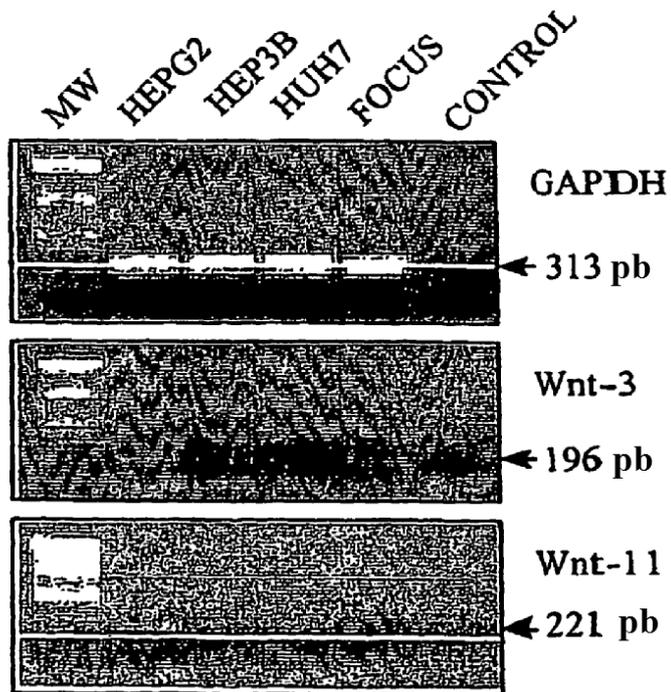


FIG. 1C

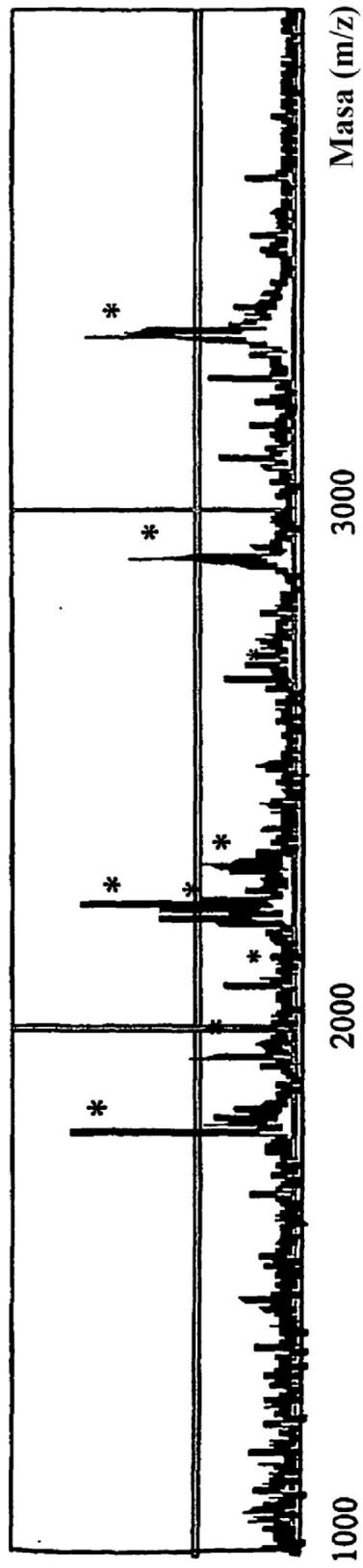


FIG. 1B

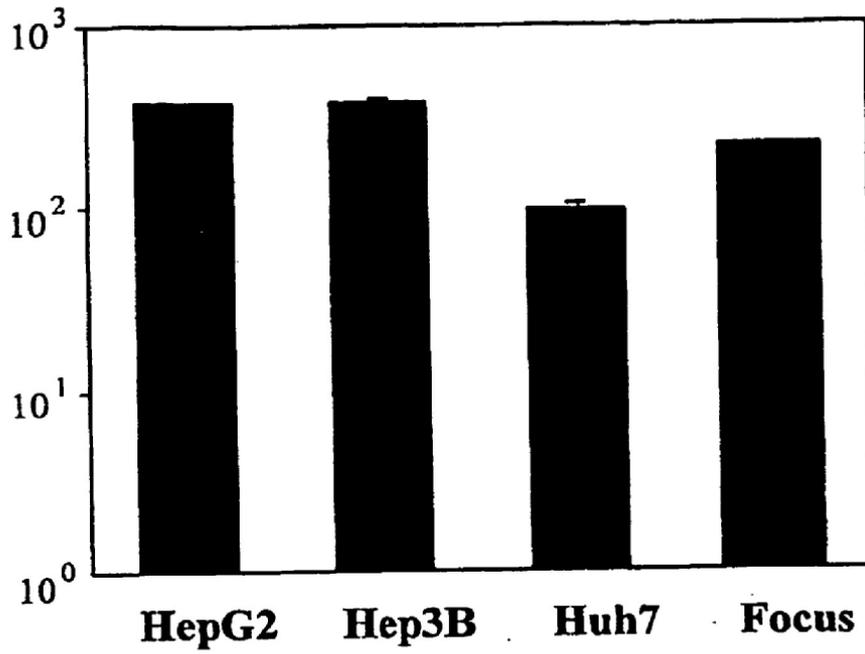


FIG. 2A

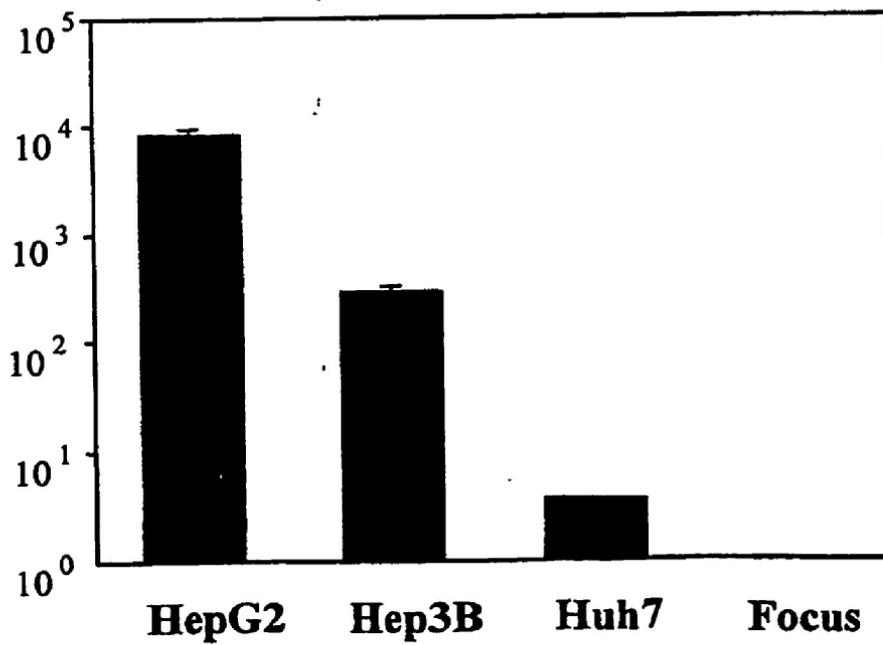


FIG. 2B

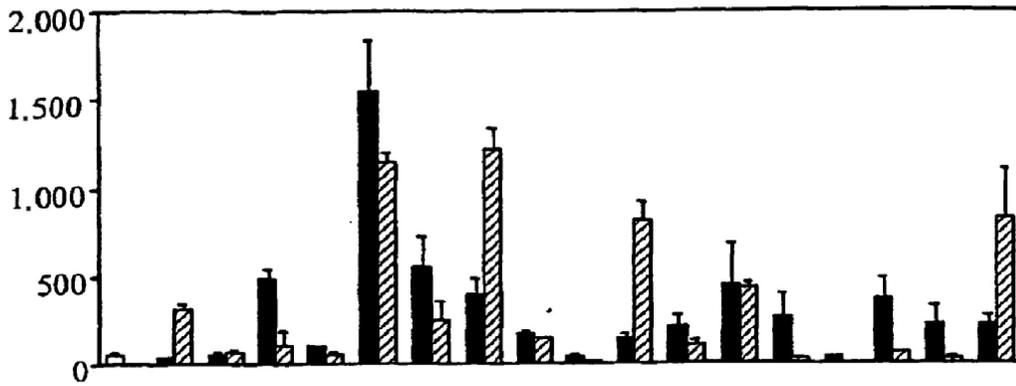


FIG. 3A

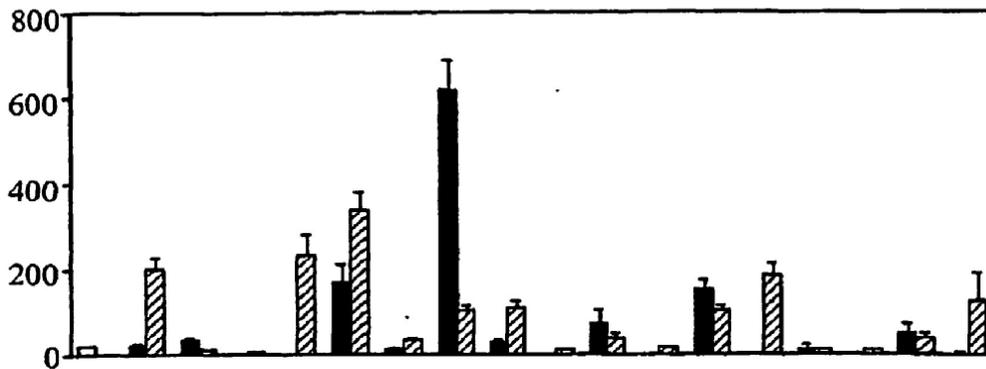


FIG. 3B

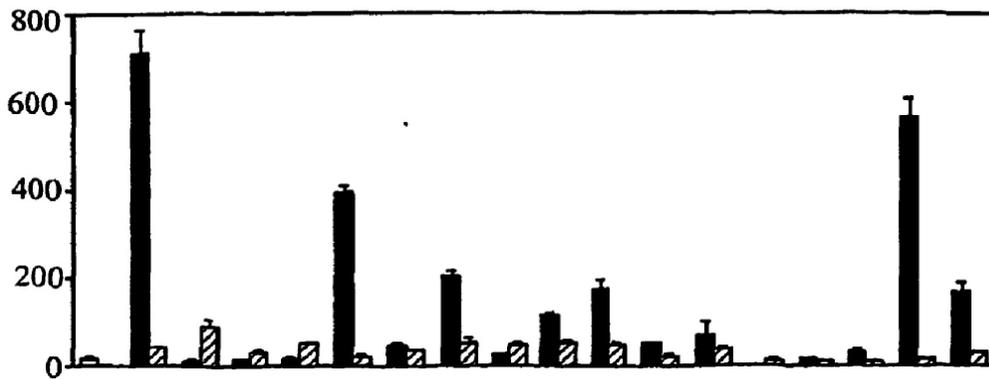


FIG. 3C

FIG. 4A

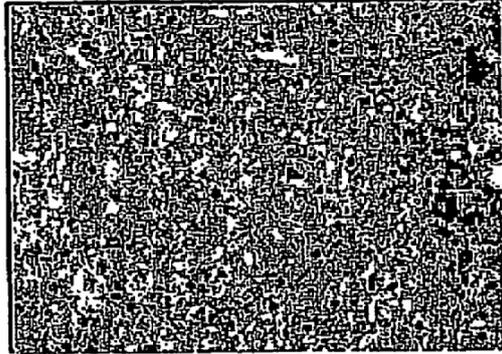


FIG. 4B

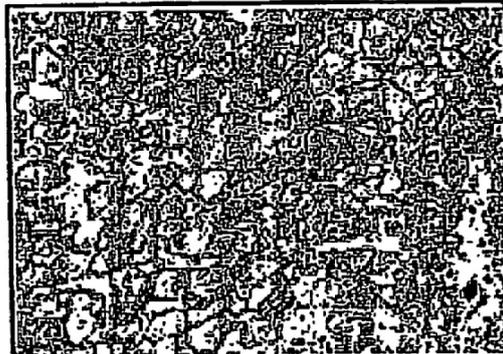


FIG. 4C

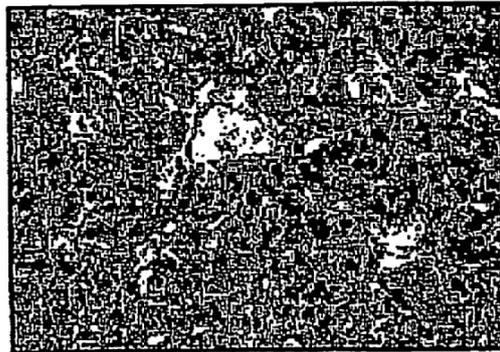
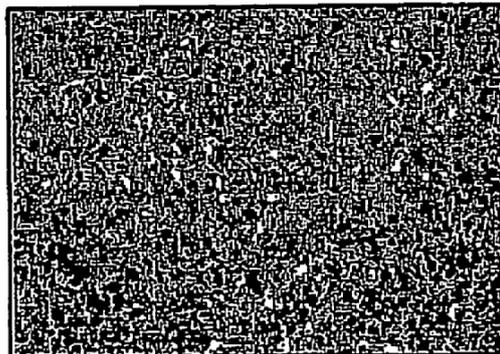


FIG. 4D



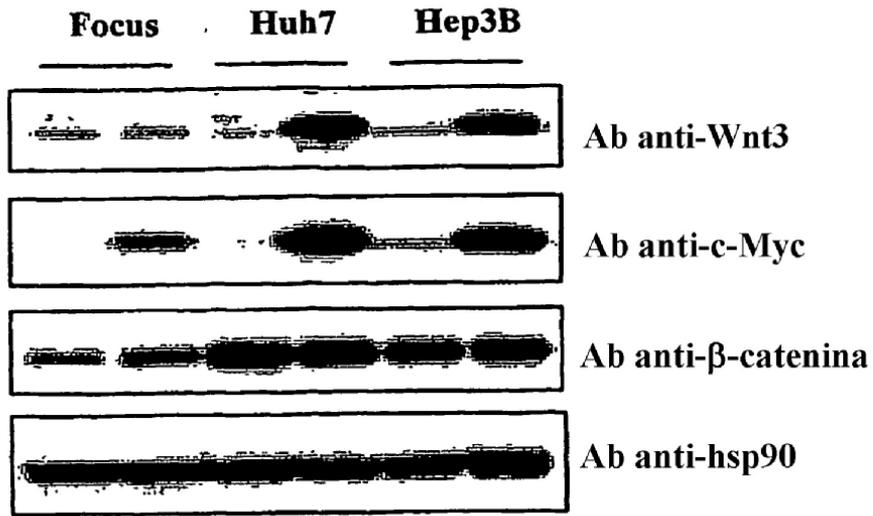


FIG. 5A

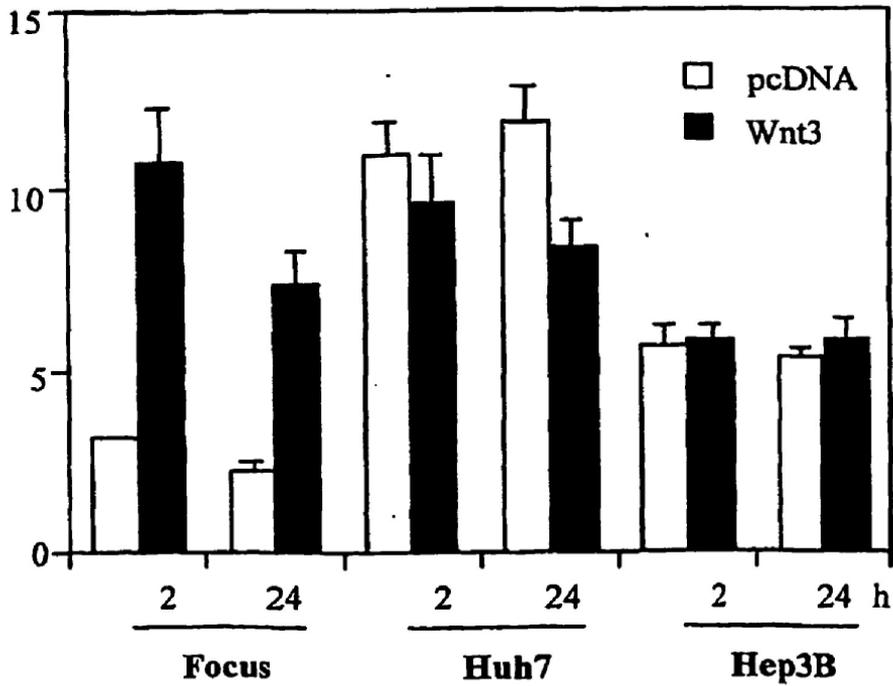


FIG. 5B

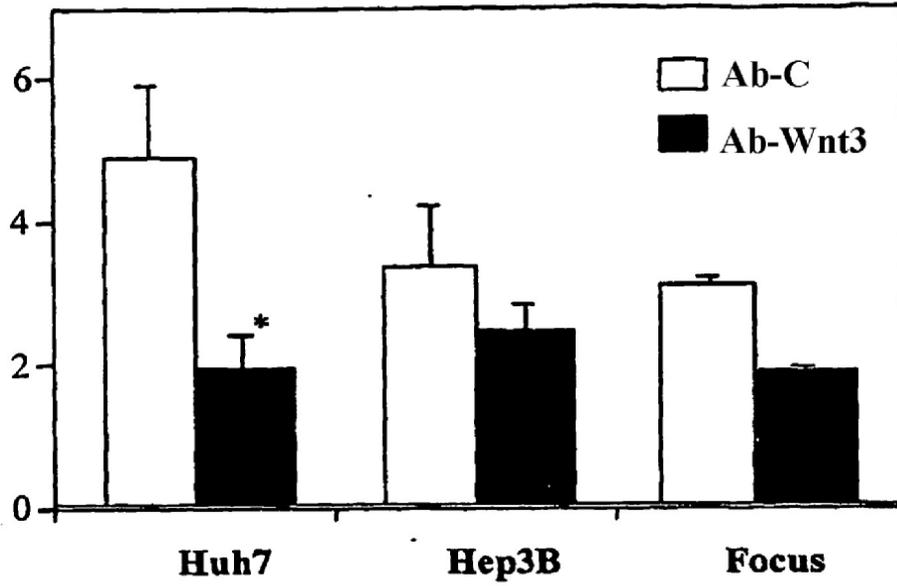


FIG. 6A

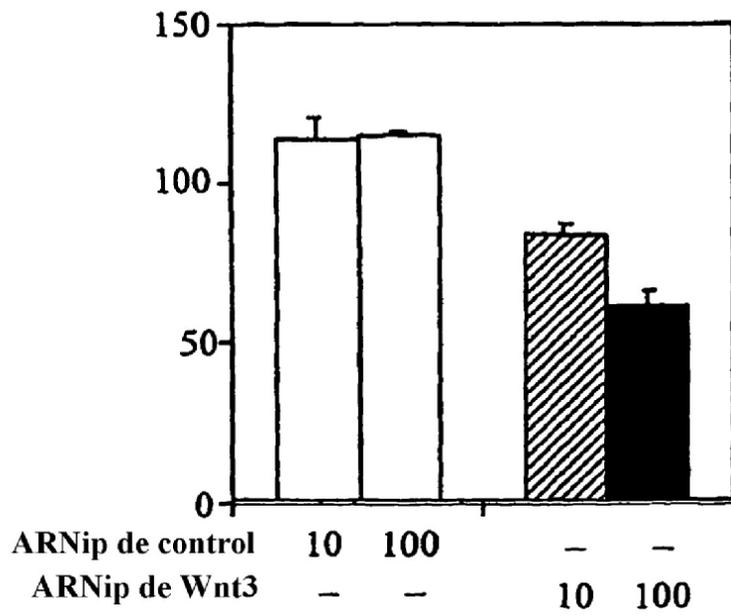


FIG. 6B

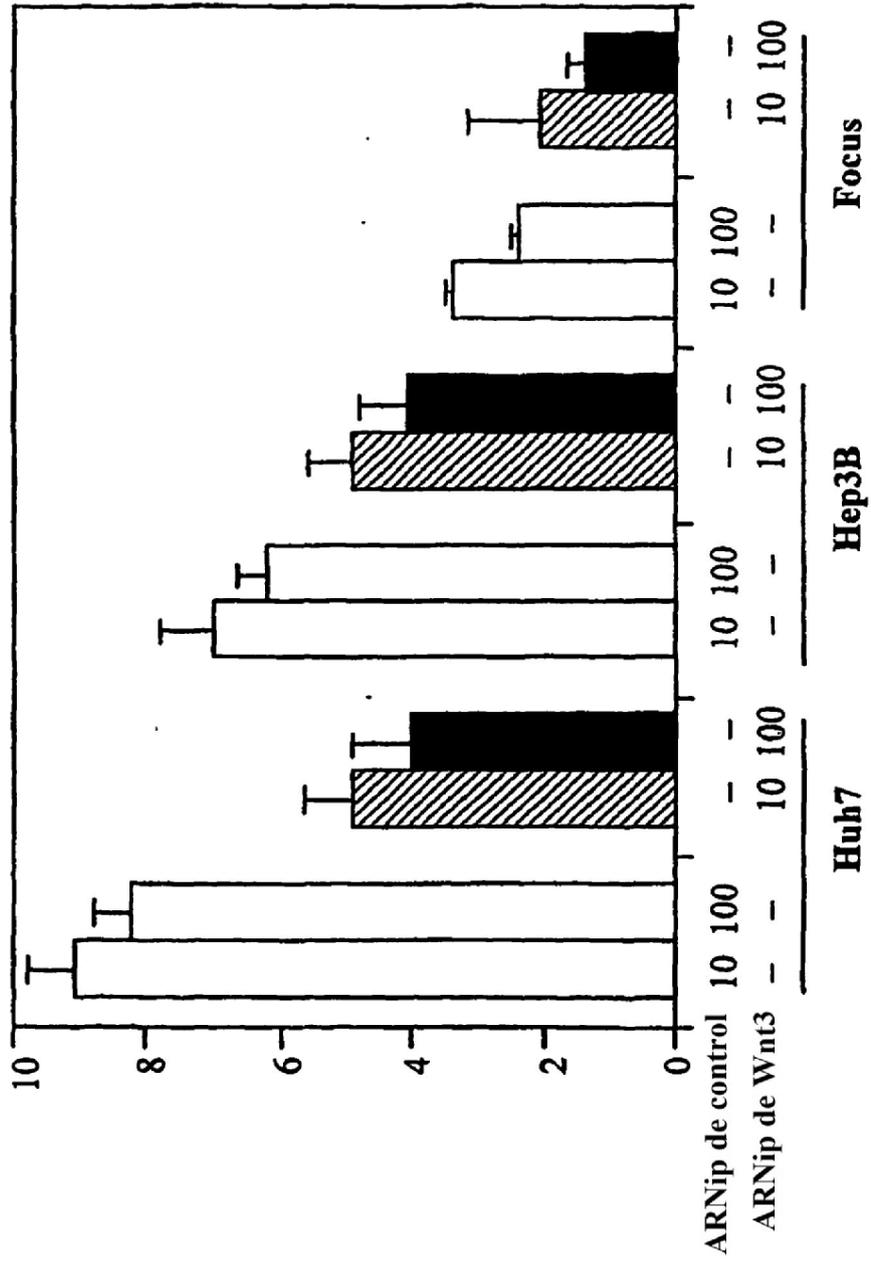


FIG. 6C

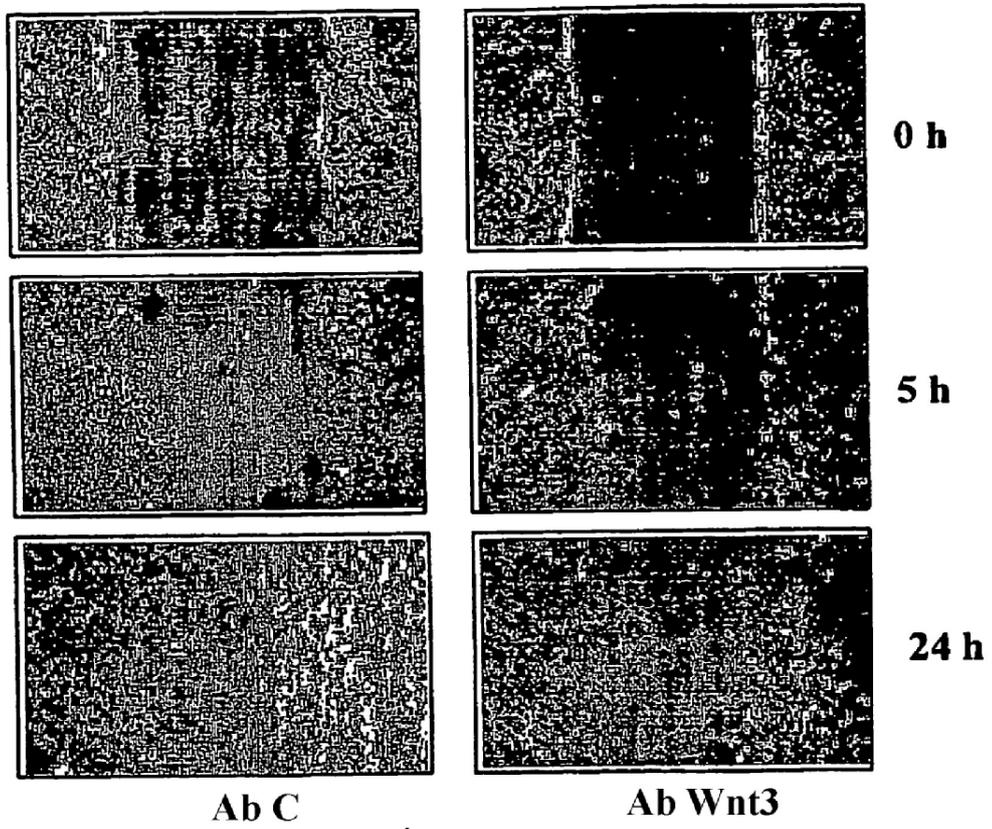


FIG. 7

Frizzled 7 humana

Referencia: 075084

Nombre de la proteína: Frizzled 7 [Precursor]

DEFINICIÓN: frizzled 7; Frizzled/ drosophila, homólogo de, 7; Frizzled (Drosophila) homólogo 7 [Homo sapiens].

REFERENCIA NP_003498

ORIGEN (574 aa)

MRDPGAAVPL SSLGFCALVL ALLGALSAGA GAQPYHGEKG ISVPDHGFCQ PISIPCLTDI
 AYNQTILPNL LGHTNQEDAG LEVHQFYPLV KVQCSPELRF FLCSMYAPVC TVLDQAIPPC
 RSLCERARQG CEALMNKFGF QWPERLRCEN FVHGAGEIC VGQNTSDGSG GPGGGPTAYP
 TAPYLPDLPF TALPPGASDG KGRPAFPFSC PRQLKVPYPL GYRFLGERDC GAPCEPGRAN
 GLMYFKEEER RFARLVVGVW SVLCCASTLE TVLTYLVDMR RFSYPERPII FLSGCYFMVA
 VAHVAGFFLE DRAVCVERFS DDGYRTVAQG TKKEGCTILE MVLYFFGMAS SIWWVILSLT
 WFLAAGMKWG HEAIEANSQY FHAAWAVPA VKTITILAMG QVDGDLNGV CYVGFSSVDA
 LRGFVLAPLF VYFFIGTSFL LAGFVSFFRI RTIMKHDGTK TEKLEKLMVR IGVFVLYTV
 PATIVLACYF YEQAFREHWE RTWLLQTKS YAVPCPPGHF PPMSPDFTVF MIKCLMTMIV
 GITTFWIWS GKTLQSWRRF YHRLSHSSKG ETAV (SEC ID N°: 1)

Sitio de unión al ligando potencial de Frizzled 7 humana

* Dominio rico en cisteína (CRD)

**COPISIPCLTDIAYNQTILPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAPVCRSLCERARQGC
 EALMNKFGFQWPERLRCENFP (49-152) (SEC ID N°: 2)**

Frizzled 7 de ratón

Referencia: Q61090

Nombre de la proteína: Frizzled 7 [Precursor] DEFINICIÓN:

frizzled 7 [Mus musculus]

REFERENCIA NP_032083

ORIGEN (572 aa)

MRGPGTAASH SPLGLCALVL ALLGALPTDT RAQPYHGEKG ISVPDHGFCQ PISIPCLTDI
 AYNQTILPNL LGHTNQEDAG LEVHQFYPLV KVQCSPELRF FLCSMYAPVC TVLDQAIPPC
 RSLCERARQG CEALMNKFGF QWPERLRCEN FVHGAGEIC VGQNTSDGSG GAGGSPTAYP
 TAPYLPDPPF TAMSPSDGRG RLSFFPFCPR QLKVPPYLYG RFLGERDCGA PCEPGRANGL
 MYFKEEERF ARLWVGVWSV LSCASTLFTV LTYLVDMRRF SYPERPIIFL SGCYFMVAVA
 HVAGFLEDR AVCVERFSDD GYRTVAQGTK KEGCTILFMV LYFFGMASSI WWVILSLTWF
 LAAGMKWGHE AIEANSQYFH LAAWAVPAVK TITILAMGQV DGDLGVCY VGLSSVDALR
 GFVLAPLFVY LFIGTSFLLA GFVSLFRIRT IMKHDGKTE KLEKLMVRIG VFSVLYTVPA
 TIVLACYFYE QAFREHWERT WLLQTKSYA VPCPPRHFSF MSPDFTVFEMI KYLMTMIVGI
 TTGFWIWSGK TLQSWRRFYH RLSHSSKGET AV (SEC ID N°: 3)

FIG. 8A

Frizzled 8 humana

Referencia: Q9H461

Nombre de la proteína: Frizzled 8 [Precursor]

Origen (694 aa)

MEWGYLLEVT SLLAALALLQ RSSGAAAASA KELACQEITV PLCKGIGYNY TYMPNQFNHD
 TQDEAGLEVH QFWPLVEIQC SPDLKFFLCS MYTPICLEDY KKPLPPCRSV CERAKAGCAP
 LMRQYGFAPW DRMRCDRLE QGNPDTLCMD YNRTDLTTAA PSPRRRLPPP PPGEQPPSGS
 GHGRPPGARP PHRGGGRGGG GGDAAAPPAR GGGGGGKARP PGGGAAPCEP GCQCRAPMVS
 VSSERHPLYN RVKTGQIANC ALPCHNPFPS QDERAFTVFW IGLWSVLCFV STFATVSTFL
 IDMERFKYPE RPIIFLSACY LFVSVGYLVR LVAGHEKVAC SGGAPGAGGA GGAGGAAAGA
 GAAGAGAGGP GGRGEYEELG AVEQHVRVET TGPALCTVVF LLVYFFGMAS SIWWVILSLT
 WFLAAGMKWG NEAIAGYSQY FHAAWLVPV VKSI AVLALS SVDGDPVAGI CYVGNQSLDN
 LRGFVLAPLV IYLFITGMFL LAGFVSLFRI RSVIKQQDGP TKTHKLEKLM IRLGLFTVLY
 TVPAVVVAC LFYEQHNRPR WEATHNCPCL RDLQPDQARR PDYAVFMLKY FMCLVVGITS
 GVWWSGKTL ESWRSLCTRC CWASKGAAVG GGAGATAAGG GGGPGGGGGG GPGGGGGPQG
 GGSLSYSDVS TGLTWRSGTA SSVSYPKQMP LSQV (SEC ID N°: 4)

Sitio de unión a ligando potencial de FZD8 humano

* Dominio rico en cisteína (CRD)

CQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSFDLKFFLCSMYTPICLED
YKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAPWDRMRCDRLE (35-139) (SEC ID N°: 5)

Frizzled 8 de ratón

Referencia: Q61091

Nombre de la proteína: Frizzled 8 [Precursor]

Origen (685 aa)

MEWGYLLEVT SLLAALAVLQ RSSGAAAASA KELACQEITV PLCKGIGYNY TYMPNQFNHD
 TQDEAGLEVH QFWPLVEIQC SPDLKFFLCS MYTPICLEDY KKPLPPCRSV CERAKAGCAP
 LMRQYGFAPW DRMRCDRLE QGNPDTLCMD YNRTDLTTAA PSPRRRLPPP PPPGEQPPSG
 SGHSRPPGAR PPHRGGSSRG SGDAAPAPP RGGKARPPGG GAAPCEPGCQ CRAPMVSVSS
 ERHPLYNRVK TGQIANCALP CHNPFPSQDE RAFTVFWIGL WSVLCFVSTF ATVSTFLIDM
 ERFKYPERPI IFLSACYLFV SVGYLVRLVA GHEKVACS GG APGAGGRGGA GGAAAAGAGA
 AGRGASSPGA RGEYEELGAV EQHVRVETTG PALCTVVFLL VYFFGMASSI WWVILSLTWF
 LAAGMKWGNE AIAGYSQYFH LAAWLVPSVK SIAVLALS SV DGDVPVAGICY VGNQSLDNLR
 GFVLAPLVIIY LFIGTMFLLA GFVSLFRIRS VIKQQGGP TK THKLEKLMIR LGLFTVLYTV
 PAAVVVACL F YEQHNRPRWE ATHNCPCLRD LQPDQARR PD YAVFMLKYFM CLVVGITSGV
 WVWSGKTLES WRALCTRCCW ASKGAAVGAG AGGSGP GG SG PGPGGGGGGH GGGGSLYSDV
 STGLTWRSGT ASSVSYPKQM ELSQV (SEC ID N°: 6)

FIG. 8B

Wnt3 humana

Referencia P56703

Nombre de la proteína: proteína del proto-oncogén Wnt-3 [Precursor]

REFERENCIA NP_110380

Definition: familia del sitio de integración de MMTV tipo Wingless, miembro 3; precursor de la proteína del proto-oncogén WNT-3 [Homo sapiens]

ORIGEN (355 aa)

MEPHLLGLLL GLLGGTRVL AGYPIWWSLA LGQYTSLSG QPLLCGSIPG LVPKQLRFCR
 NYIEIMPSVA EGVKLGIQEC QHQFRGRRW CTTIDDSLAI FGPVLDKATR ESAFVHAIAS
 AGVAFVTRV CAEGTSTICG CDSHHKGGPG EGWKWGGCSE DADFGVLVSR EFADARENRP
 DARSAMNKHN NEAGRTTILD HMHLKCKCHG LSGSCEVKTC WWAQPDFRAI GDFLKDKYDS
 ASEMVEKHR ESRGWVETLR AKYSLFKPPT ERDLVYYENS PNFCEPNPET GSFGRDRTC
 NVTSHGIDGC DLLCCGRGHN TRTEKRKEKC HCFHWCCYV SCQECIRIYD VHTCK (SEC ID
 N°: 7)

Motivos de Unión Potenciales Wnt3**humana**

* Proteína de factor de crecimiento secretado (motivo o dominio)

- 1) RESAFVHAIASAGVA (110-124) (SEC ID N°: 8)
- 2) RSCAEGTSTICGCD (129-142) (SEQ ID N0:9)
- 3) WKWGGCSEDADFG (153-165) (SEC ID N°: 10)
- 4) **CKCHGLSGSCEVKTCW (206-221)** (SEC ID N°: 11)
- 5) DLVYYENSPNFC (273-284) (SEC ID N°:12)

Wnt3 de ratón

Referencia: P17553

Nombre de la proteína: proteína del proto-oncogén Wnt-3 Precursor]

DEFINICIÓN: sitio de integración de MMTV relacionado con wingless 3 [Mus musculus].

REFERENCIA NP_033547

ORIGEN (355 aa)

MEPHLLGLLL GLLLSGTRVL AGYPIWWSLA LGQYTSLSA QPLLCGSIPG LVPKQLRFCR
 NYIEIMPSVA EGVKLGIQEC QHQFRGRRW CTTIDDSLAI FGPVLDKATR ESAFVHAIAS
 AGVAFVTRV CAEGTSTICG CDSHHKGGPG EGWKWGGCSE DADFGVLVSR EFADARENRP
 DARSAMNKHN NEAGRTTILD HMHLKCKCHG LSGSCEVKTC WWAQPDFRAI GDFLKDKYDS
 ASEMVEKHR ESRGWVETLR AKYALFKPPT ERDLVYYENS PNFCEPNPET GSFGRDRTC
 NVTSHGIDGC DLLCCGRGHN TRTEKRKEKC HCVFHWCCYV SCQECIRIYD VHTCK (SEC ID
 N°: 13)

FIG. 8C

Wnt8B humana

Referencia: Q93098

Nombre de la proteína: proteína Wnt-8b [Precursor]

DEFINICIÓN: familia del sitio de integración de MMTV de tipo wingless,
Precursor del miembro 8B [Homo sapiens].

REFERENCIA: NP_003384

ORIGEN (351 aa)

MFLSKPSVYI CLFTCVLQLS HSWSVNNFLM TGPKAYLIYS SSVAAQAQSG IEECKYQFAW
 DRWNCPERAL QLSSHGGLRS ANRETAFVHA ISSAGVMYTL TRNCS LGDFD NCGCDDSRNG
 QLGGQGWLWG GCSNVGFGE AISKQFVDAL ETGDARAAM NLHNN EAGRK AVKGTMKRTC
 KCHGVSGSCT TQTCWLQLPE FREVGAHLKE KYHAALKVDL LQGAGNSAAA RGAIADTFRS
 ISTRELVHLE DSPDYCLENK TLGLLGTEGR ECLRRGRALG RWELR SCRRL CGDCGLAVEE
 RRAETVSSCN KFWWCCAVR CEQRRRVTK YFCSRAERPR GGAHKPGRK P (SEC ID N°: 14)

Motivos de unión potenciales

Wnt8b humana

* Proteína de factor de crecimiento secretado (motivo o dominio)

- 1) RETAFVHAISSAGVM (83-97) (SEC ID N°: 15)
- 2) RNCSLGDFDNCDCD (102-115) (SEC ID N°:16)
- 3) WLWGGCSDNVGFG (127-139) (SEC ID N°: 17)
- 4) **CKCHGVSGSCTTQTCW (180-195)** (SEC ID N°: 18)
- 5) ELVHLEDSPDYC (245-256) (SEC ID N°:19)

Wnt8B de ratón

Referencia: Q9WUD6

Nombre de la proteína: proteína Wnt-8b [Precursor]

DEFINICIÓN: sitio de integración de MMTV relacionado con wingless 8b [Mus musculus].

REFERENCIA NP_035850

ORIGEN (350 aa)

MFLMKPVCVL LVTCVLHRSH AWSVNNFLMT GPKAYLVYSS SVAAGAQSIGI EEECKYQFAWD
 RWNCPERALQ LSSHGGLRSA NRETAFVHAI SSAGVMYTLT RNCS LGDFDN CGCDDSRNGQ
 LGGQGWLWGG CSDNVGFGEA ISKQFVDALE TGQDARAAMN LHNNEAGRKA VKGTMKRTCK
 CHGVSGSCTT QTCWLQLPEF REVGAHLKEK YHAALKVDLL QGAGNSAAGR GAIADTFRSI
 STRELVHLED SPDYCLENKT LGLLGTEGRE CLRRGRALGR WERR SCRRLC GDCGLAVEER
 RAETVSSCNC KFWWCCAVRC EQRRRVTKY FCSRAERPPR GAAHKPGKNS (SEC ID N°: 20)

FIG. 8D

Wnt 11 humana

Referencia: 096014

Nombre de la proteína: proteína Wnt-11 [Precursor]

DEFINICIÓN: familia del sitio de integración de MMTV de tipo wingless,

Precursor del miembro 11 [Homo sapiens]

REFERENCIA NP_004617

ORIGEN (354 aa)

MRARPQVCEA LLFALALQTG VCYGIKWLAL SKTPSALALN QTQHCKQLEG LVSAQVQLCR
 SNLELMHTVV HAAREVMKAC RRAFADMRWN CSSIELAPNY LLDLERTRE SAFVYALSAA
 AISHAIARAC TSGDLPGCSC GPVPGPPGP GNRWGGCADN LSYGLLMGAK FSDAPMKVKK
 TGSQANKLMR LHNSEVGRQA LRASLEMKCK CHGVSGSICI RTCWKGLQEL QDVAADLKTR
 YLSATKVVHR PMGTRKHLVP KLDIRPVKD SELVYLQSSP DFCMKNEKVG SHGTQDRQCN
 KTSNGSDSCD LMCCGRGYNP YTDVVVERCH CKYHWCCYVT CRRCERTVER YVCK (SEC ID

Nº: 21)

Motivos de unión potenciales

Wnt11 humana

* Proteína de factor de crecimiento secretado (motivo o dominio)

- 1) RESAFVYALSAAIS (109-123) (SEC ID Nº:22)
- 2) RACTSGDLPGCSCG (128-141) (SEC ID Nº:23)
- 3) NRWGGCADNLSYG (152-164) (SEC ID Nº:24)
- 4) CKGHGVSGSICSIRTCW (209-224) (SEC ID Nº: 25)
- 5) ELVYLQSSPDFC (272-283) (SEC ID Nº: 26)

Wnt 11 de ratón

Referencia: P48615

Nombre de la proteína: proteína Wnt-11 [Precursor]

DEFINICIÓN: sitio de integración de MMTV relacionado con wingless 11 [Mus musculus].

REFERENCIA NP_033545

ORIGEN (354 aa)

MRARPQVCEA LLFALALHTG VCYGIKWLAL SKTPAALALN QTQHCKQLEG LVSAQVQLCR
 SNLELMRTIV HAARGAMKAC RRAFADMRWN CSSIELAPNY LLDLERTRE SAFVYALSAA
 TISHTIARAC TSGDLPGCSC GPVPGPPGP GNRWGGCADN LSYGLLMGAK FSDAPMKVKK
 TGSQANKLMR LHNSEVGRQA LRASLETCKK CHGVSGSICI RTCWKGLQEL QDVAADLKTR
 YLSATKVVHR PMGTRKHLVP KLDIRPVKD SELVYLQSSP DFCMKNEKVG SHGTQDRQCN
 KTSNGSDSCD LMCCGRGYNP YTDVVVERCH CKYHWCCYVT CRRCERTVER YVCK (SEC ID

Nº: 27)

FIG. 8E

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 05000267 W [0002]
- US 61209804 P [0002]
- WO 03092705 A1 [0008]
- WO 9202526 A [0059]
- US 5124246 A [0059]
- US 4683195 A [0060]
- US 4683202 A [0060]
- US 5359115 A [0072]
- US 5362899 A [0072]
- US 5288514 A [0072]
- WO 9210092 A [0072]
- WO 9309668 A [0072]
- WO 9107087 A [0072]
- WO 9320242 A [0072]
- WO 9408051 A [0072]
- US 5283173 A, Fields [0080]
- US 4376110 A [0114]
- US 5223409 A, Ladner [0116]
- WO 9218619 A, Kang [0116]
- WO 9117271 A, Dower [0116]
- WO 9220791 A, Winter [0116]
- WO 9215679 A, Markland [0116]
- WO 9301288 A, Breitling [0116]
- WO 9201047 A, McCafferty [0116]
- WO 9209690 A, Garrard [0116]
- WO 9002809 A, Ladner [0116]
- US 4946778 A [0120]
- US 4704692 A [0120]
- US 4522811 A [0130]
- US 5328470 A [0137]
- US 4873191 A [0157]
- US 5175385 A, Wagner [0158]
- US 5175384 A, Krimpenfort [0158]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- PHILIPPE MERLE et al. *Gastroenterology*, 2004, vol. 127, 1110-1122 [0006]
- JENNIFER WILLERT et al. *BMC Developmental Biology*, 2002, vol. 2, 8 [0007]
- SHIMIZU et al. *Cell Growth Differ*, 1997, vol. 8, 1349-1358 [0029]
- KARLIN ; ALTSCHUL. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 2264-2268 [0037]
- KARLIN ; ALTSCHUL. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 5873-5877 [0037]
- ALTSCHUL et al. *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0037]
- ALTSCHUL et al. *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0037]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0039]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 1995 [0039]
- MULLIS et al. *Meth. Enzymol.*, 1987, vol. 155, 335 [0060]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0060]
- SAIKI et al. *Science*, 1985, vol. 239, 487 [0061]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, 14.2-14.33 [0061]
- E.M. GORDON et al. *J. Med. Chem.*, 1994, vol. 37, 1385-1401 [0072]
- DEWITT, S. H. ; CZARNIK, A. W. *Acc. Chem. Res.*, 1996, vol. 29, 114 [0072]
- ARMSTRONG, R. W. ; COMBS, A. P. ; TEMPEST, P. A. ; BROWN, S. D. ; KEATING, T. A. *Acc. Chem. Res.*, 1996, vol. 29, 123 [0072]
- ELLMAN, J. A. *Acc. Chem. Res.*, 1996, vol. 29, 132 [0072]
- GORDON, E. M. ; GALLOP, M. A. ; PA.TEL, D. V. *Acc. Chem. Res.*, 1996, vol. 29, 144 [0072]
- LOWE, G. *Chem. Soc. Rev.*, 1995, 309 [0072]
- BLONDELLE et al. *Trends Anal. Chem.*, 1995, vol. 14, 83 [0072]
- CHEN et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, vol. 116, 2661 [0072]
- M. BODANSKY. *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag, 1993 [0073]
- HOBBS DEWITT et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, vol. 90, 6909 [0074]
- HOUGHTEN et al. *Nature*, 1991, vol. 354, 84-86 [0074]
- GORDON et al. *J Med. Chem.* [0075]
- WEST ; MCMAHON. *J. Cell Biol.*, 1977, vol. 74, 264 [0079]
- CHIEN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 9578 [0080]
- FIELDS ; SONG. *Nature*, 1989, vol. 340, 245 [0080]
- LE DOUARIN et al. *Nucleic Acids Research*, 1995, vol. 23, 876 [0080]

- VIDAL et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 10315-10320 [0080]
- WHITE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 10001-10003 [0080]
- LEPOURCELET et al. *Cancer Cell*, 2004, vol. 5, 91-102 [0081]
- ROSSI et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 8405-8410 [0086]
- BACSKAI et al. *Science*, 1993, vol. 260, 222-226 [0087]
- FEARON et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, vol. 89, 7958-7962 [0087]
- TAKACS et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, vol. 90, 10375-10379 [0087]
- VIDAL et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, vol. 93, 10321-10326 [0087]
- NAGARAJAN et al. *J. Antibiot.*, 1988, vol. 41, 1430-8 [0105]
- KABAT, B.A. et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH Publication, 1991 [0108]
- CHOTHIA, C. et al. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0108]
- WARD et al. *Nature*, 1989, vol. 341, 544-546 [0110]
- BIRD et al. *Science*, 1988, vol. 242, 423-426 [0110]
- HUSTON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 5879-5883 [0110]
- KOHLER et al. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0113]
- KOHLER et al. *Eur. J. Immunol.*, 1976, vol. 6, 511 [0113]
- KOHLER et al. *Eur. J. Immunol.*, 1976, vol. 6, 292 [0113]
- HAMMERLING et al. *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*. Elsevier, 1981 [0113]
- KOSBOR et al. *Immunology Today*, 1983, vol. 4, 72 [0114]
- COLE et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 2026 [0114]
- COLE et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss, Inc, 1983, 77-96 [0114]
- FUCHS et al. *BiolTechnology*, 1991, vol. 9, 1370-1372 [0116]
- HAY et al. *Hum Antibod Hybridomas*, 1992, vol. 3, 81-85 [0116]
- HUSE et al. *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281 [0116]
- GRIFFTHS et al. *EMBO J*, 1993, vol. 12, 725-734 [0116]
- HAWKINS et al. *J Mol Biol*, 1992, vol. 226, 889-896 [0116]
- CLACKSON et al. *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0116]
- GRAM et al. *PNAS*, 1992, vol. 89, 3576-3580 [0116]
- GARRAD et al. *BiolTechnology*, 1991, vol. 9, 1373-1377 [0116]
- HOOGENBOOM et al. *Nuc Acid Res*, 1991, vol. 19, 4133-4137 [0116]
- BARBAS et al. *PNAS*, 1991, vol. 88, 7978-7982 [0116]
- MORRISON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1984, vol. 81, 6851 [0119]
- NEUBERGER et al. *Nature*, 1984, vol. 312, 604 [0119]
- TAKEDA et al. *Nature*, 1984, vol. 314, 452 [0119]
- HUSE et al. *Science*, 1989, vol. 246, 1275 [0121]
- CRUIKSHANK et al. *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, 1997, vol. 14, 193 [0135]
- CHEN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 3054-3057 [0137]
- Inhibition of Gene Expression by Oligonucleotides. GOODCHILD. Topics in Molecular and Structural Biology, Vol. 12: Oligodeoxynucleotides. MacMillan Press, 1989, vol. 12, 53-77 [0148]
- WRAIGHT et al. *Pharmacol Ther.*, 2001, vol. 90 (1), 89-104 [0150]
- ANDERSON et al. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, vol. 40, 2004-2011 [0150]
- CROOKE et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, vol. 277, 923-937 [0150]
- VAN DER PUTTEN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1985, vol. 82, 6148 [0157]
- THOMPSON et al. *Cell*, 1989, vol. 56, 313 [0157]
- LO. *Mol. Cell. Biol.*, 1983, vol. 3, 1803 [0157]
- YANG et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 3004-3009 [0157]
- GORDON. *Intl. Rev. Cytol.*, 1989, vol. 115, 171-229 [0158]
- HOGAN et al. *Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor Press, 1986 [0158]
- KRIMPENFORT et al. *BiolTechnology*, 1991, vol. 9, 86 [0158]
- PALMITER et al. *Cell*, 1985, vol. 41, 343 [0158]
- KRAEMER et al. *Genetic Manipulation of the Early Mammalian Embryo*. Cold Spring Harbor Press, 1985 [0158]
- HAMMER et al. *Nature*, 1985, vol. 315, 680 [0158]
- PURCEL et al. *Science*, 1986, vol. 244, 1281 [0158]
- DAVILA, J.A. ; MORGAN, R.O. ; SHAIB, Y. ; MCGLYNN, K.A. ; EL-SERAG, H.B. Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based study. *Gastroenterology*, 2004, vol. 127, 1372-1380 [0191]
- DU, S.J. ; PURCELL, S.M. ; CHRISTIAN, J.L. ; MCGREW, L.L. ; MOON, R.T. Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in Xenopus embryos. *Mol Cell Biol*, 1995, vol. 15, 2625-2634 [0191]
- LIANG, H. ; CHEN, Q. ; COLES, A.H. ; ANDERSON, S.J. ; PIHAN, G. ; BRADLEY, A. ; GERSTEIN, R. ; JURECIC, R. ; JONES, S.N. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell*, 2003, vol. 4, 349-360 [0191]

- **MAYE, P. ; ZHENG, J. ; LI, L. ; WU, D.** Multiple mechanisms for Wnt11-mediated repression of the canonical Wnt signaling pathway. *J Biol Chem*, 2004, vol. 279, 24659-24665 [0191]
- **IOZZO, R.V. ; EICHSTETTER, I. ; DANIELSON, K.G.** Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy. *Cancer Res*, 1995, vol. 55, 3495-3499 [0191]
- **LEJEUNE, S. ; HUGUET, E.L. ; HAMBY, A ; POULSOM, R. ; HARRIS, A.L.** Wnt5a cloning, expression, and up-regulation in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res*, 1995, vol. 1, 215-222 [0191]
- **WEERARATNA, A.T. ; JIANG, Y. ; HOSTETTER, G. ; ROSENBLATT, K. ; DURAY, P. ; BITTNER, M. ; TRENT, J.M.** Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell*, 2002, vol. 1, 279-288 [0191]
- **KINZLER, K.W. ; VOGELSTEIN, B.** Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 1996, vol. 87, 159-170 [0191]
- **DEVEREUX, T.R. ; STEM, M.C. ; FLAKE, G.P. ; YU, M.C. ; ZHANG, Z.Q. ; LONDON, S.J. ; TAYLOR, J.A.** CTNNB1 mutations and beta-catenin protein accumulation in human hepatocellular carcinomas associated with high exposure to aflatoxin B1. *Mol Carcinog*, 2001, vol. 31, 68-73 [0191]
- **HSU, H.C. ; JENG, Y.M. ; MAO, T.L. ; CHU, J.S. ; LAI, P.L. ; PENG, S.Y.** Beta-catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. *Am J Pathol*, 2000, vol. 157, 763-770 [0191]
- **WONG, C.M. ; FAN, S.T. ; NG, I.O.** beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer*, 2001, vol. 92, 136-145 [0191]
- **HUANG, H. ; FUJII, H. ; SANKILA, A. ; MAHLER-ARAUJO, B.M. ; MATSUDA, M. ; CATHOMAS, G. ; OHGAKI, H.** Beta-catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Pathol*, 1999, vol. 155, 1795-1801 [0191]
- **LAURENT-PUIG, P. ; LEGOIX, P. ; BLUTEAU, O. ; BELGHITI, J. ; FRANCO, D. ; BINOT, F. ; MONGES, G. ; THOMAS, G. ; BIOULAC-SAGE, P. ; ZUCMAN-ROSSI, J.** Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, 2001, vol. 120, 1763-1773 [0191]
- **SATOH, S. ; DAIGO, Y. ; FURUKAWA, Y. ; KATO, T. ; MIWA, N. ; NISHIWAKI, T. ; KAWASOE, T. ; ISHIGURO, H. ; FUJITA, M. ; TOKINO, T. et al.** AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet*, 2000, vol. 24, 245-250 [0191]
- **MERLE, P. ; DE LA MONTE, S. ; KIM, M. ; HERRMANN, M. ; TANAKA, S. ; VON DEM BUSSCHE, A. ; KEW, M.C. ; TREPO, C. ; WANDS, J.R.** Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2004, vol. 127, 1110-1122 [0191]
- **MERLE, P. ; KIM, M. ; HERRMANN, M. ; GUPTE, A. ; LEFRANCOIS, L. ; CALIFANO, S. ; TREPO, C. ; TANAKA, S. ; VITVITSKI, L. ; MONTE, S.D. et al.** Oncogenic role of the frizzled-7/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.*, 2005 [0191]
- **LIN, X. ; PERRIMON, N.** Dally cooperates with Drosophila Frizzled 2 to transduce Wingless signalling. *Nature*, 1999, vol. 400, 281-284 [0191]
- **WILLERT, K ; BROWN, J.D. ; DANENBERG, E. ; DUNCAN, A.W. ; WEISSMAN, I.L. ; REYA, T. ; YATES, J.R, 3RD ; NUSSE, R.** Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 2003, vol. 423, 448-452 [0191]
- **BRADLEY, R.S. ; BROWN, A.M.** The proto-oncogene int-1 encodes a secreted protein associated with the extracellular matrix. *Embo J*, 1990, vol. 9, 1569-1575 [0191]
- **REICHSMAN, F. ; SMITH, L. ; CUMBERLEDGE, S.** Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. *J Cell Biol*, 1996, vol. 135, 819-827 [0191]
- **DHOOT, G.K ; GUSTAFSSON, M.K. ; AI, X. ; SUN, W. ; STANDIFORD, D.M. ; EMERSON, C.P., JR.** Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. *Science*, 2001, vol. 293, 1663-1666 [0191]
- **ROELINK, H. ; WANG, J. ; BLACK, D.M. ; SOLOMON, E. ; NUSSE, R.** Molecular cloning and chromosomal localization to 17q21 of the human WNT3 gene. *Genomics*, 1993, vol. 17, 790-792 [0191]
- **SHIMIZU, H. ; JULIUS, M.A. ; GIARRE, M. ; ZHENG, Z. ; BROWN, A.M. ; KITAJEWSKI, J.** Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ*, 1997, vol. 8, 1349-1358 [0191]
- **KATOH, M.** Molecular cloning and characterization of human WNT3. *Int J Oncol*, 2001, vol. 19, 977-982 [0191]
- **GREGORIEFF, A. ; PINTO, D. ; BEGTHEL, H. ; DESTREE, O. ; KIELMAN, M. ; CLEVERS, H.** Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology*, 2005, vol. 129, 626-638 [0191]
- **KIRIKOSHI, H. ; SEKIHARA, H. ; KATOH, M.** Molecular cloning and characterization of human WNT11. *Int J Mol Med*, 2001, vol. 8, 651-656 [0191]

- **ZHU, H. ; MAZOR, M. ; KAWANO, Y. ; WALKER, M.M. ; LEUNG, H.Y. ; ARMSTRONG, K. ; WAXMAN, J. ; KYPTA, R.M.** Analysis of Wnt gene expression in prostate cancer: mutual inhibition by WNT11 and the androgen receptor. *Cancer Res*, 2004, vol. 64, 7918-7926 [0191]
- **SMOLICH, B.D. ; MCMAHON, J.A. ; MCMAHON, A.P. ; PAPKOFF, J.** Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. *Mol Biol Cell*, 1993, vol. 4, 1267-1275 [0191]
- **CHA, M.Y. ; KIM, C.M. ; PARK, Y.M. ; RYU, W.S.** Hepatitis B virus X protein is essential for the activation of Wnt/beta-catenin signaling in hepatoma cells. *Hepatology*, 2004, vol. 39, 1683-1693 [0191]
- **VEEMAN, M.T. ; SLUSARSKI, D.C. ; KAYKAS, A. ; LOUIE, S.H. ; MOON, R.T.** Zebrafish prickles, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr Biol*, 2003, vol. 13, 680-685 [0191]
- **CARRUBA, G. ; CERVELLO, M. ; MICELI, M.D. ; FARRUGGIO, R. ; NOTARBARTOLO, M. ; VIRRUSO, L. ; GIANNITRAPANI, L. ; GAMBINO, R. ; MONTALTO, G. ; CASTAGNETTA, L.** Truncated form of beta-catenin and reduced expression of wild-type catenins feature HepG2 human liver cancer cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, vol. 886, 212-216 [0191]
- **KORINEK, V. ; BARKER, N. ; MORIN, P.J. ; VAN WICHEN, D. ; DE WEGER, R. ; KINZLER, K.W. ; VOGELSTEIN, B. ; CLEVERS, H.** Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science*, 1997, vol. 275, 1784-1787 [0191]