

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 421**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2006 E 12156146 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2500360**

54 Título: **Composiciones y métodos para diagnosticar y tratar el cáncer**

30 Prioridad:

31.10.2005 US 731468 P
13.06.2006 US 812966 P

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

06.10.2015

73 Titular/es:

ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
800 Chesapeake Drive
Redwood City, CA 94063-4748, US

72 Inventor/es:

GURNEY, AUSTIN;
LEWICKI, JOHN;
SATYAL, SANJEEV y
HOEY, TIMOTHY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 547 421 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

Composiciones y métodos para diagnosticar y tratar el cáncer

5 Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere al campo de la oncología y proporciona nuevas composiciones y métodos para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. En particular, la presente invención proporciona antagonistas contra el cáncer y en particular contra los marcadores de células madre del cáncer que incluyen proteínas de fusión del receptor útiles para el estudio, diagnóstico, y tratamiento de tumores sólidos.

Técnica antecedente

15 El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo desarrollado, que da como resultado más de 500.000 muertes por año, solo en los Estados Unidos. Más de un millón de personas se diagnostican de cáncer en los EE. UU. por año, y en total se estima que más de 1 de cada 3 personas desarrollará alguna forma de cáncer durante su vida. Aunque hay más de 200 tipos deferentes de cáncer, cuatro de ellos - mama, pulmón, colorrectal, y
20 próstata - son la causa de más de la mitad de todos los nuevos casos (Jemal et al., Cancer J. Clin. 53:5-26 (2003)).

25 El cáncer de mama es el cáncer más común en las mujeres, con una estimación del 12 % de mujeres en riesgo de desarrollar la enfermedad durante su vida. Aunque las tasas de mortalidad han disminuido debido a la detección precoz y mejores tratamientos, el cáncer de mama sigue siendo una causa principal de muerte en mujeres de mediana edad. Además, el cáncer de mama metastático sigue siendo una enfermedad incurable. En el momento de la presentación, la mayoría de las pacientes con cáncer de mama metastáticos solo tienen afectados uno o dos sistemas orgánicos, pero según progresa la enfermedad, habitualmente llegan a implicarse múltiples sitios. Los sitios más comunes de implicación metastática son recurrencias locorregionales en la piel y tejidos blandos de la pared
30 torácica, así como en la axila y áreas supraclaviculares. El sitio más común de metástasis distante es el hueso (30 - 40 % de metástasis a distancia), seguido por los pulmones y el hígado. Y aunque solo aproximadamente el 1-5 % de las mujeres que se diagnostican por primera vez de cáncer de mama tienen metástasis distantes en el momento del diagnóstico, aproximadamente el 50 % de las pacientes con enfermedad local eventualmente recaen con metástasis a los cinco años. Hoy día la supervivencia media a partir de la manifestación de metástasis distante es aproximadamente de tres años.

35 Los métodos actuales de diagnóstico y estadificación del cáncer de mama incluyen el sistema de metástasis del tumor a los ganglios (TNM) que se basa en el tamaño del tumor, presencia tumoral en ganglios linfáticos, y presencia de metástasis distantes como se describe en el American Joint Committee on Cancer, AJCC Cancer Staging Manual, Philadelphia, PA, Lippincott-Raven Publishers, 5th ed. (1997), pp 171-180, y en Harris, J R: "Staging of breast carcinoma" in Harris, J. R., et al., eds., Breast Diseases, Philadelphia, Lippincott (1991). Estos
40 parámetros se utilizan para proporcionar un pronóstico y seleccionar la terapia adecuada. La apariencia morfológica del tumor también puede evaluarse pero debido a que los tumores con apariencia histopatológica similar pueden mostrar una variabilidad clínica significativa, esta estrategia tiene serias limitaciones. Finalmente, se pueden utilizar ensayos de marcadores de superficie celular para dividir ciertos tipos de tumores en subclases. Por ejemplo, un factor que se considera en el pronóstico y tratamiento del cáncer de mama es la presencia del receptor estrogénico (ER) ya que los cánceres de mama positivo a ER normalmente responde más fácilmente a terapias hormonales tales como el tamoxifeno o inhibidores de aromatasa que los tumores negativos a ER. Con todo, estos análisis, aunque son útiles, solo predicen parcialmente del comportamiento clínico de los tumores de mama, y hay mucha de la diversidad fenotípica presente en los cánceres de mama en la que las herramientas de diagnóstico actuales fallan
50 en detectar y las terapias actuales fallan en tratar.

55 El cáncer de próstata es el cáncer más común en los hombres en el mundo desarrollado, representando una estimación del 33 % de todos los nuevos casos en los EE. UU., y es la segunda causa más frecuente de muerte Jemal et al., CA Cancer J. Clin. 53:5-26 (2003)). Desde la introducción del ensayo sanguíneo de antígeno específico de próstata (PSA), la detección precoz de los cánceres de próstata ha mejorado drásticamente las tasas de supervivencia, y la tasa de supervivencia a los cinco años en pacientes con de cánceres de próstata en estadio regional o local en el momento del diagnóstico es de casi el 100 %. Incluso en más del 50 % de pacientes que desarrollan eventualmente enfermedad local avanzada o enfermedad metastática (Muthuramalingam et al., Clin. Oncol. 16:505-516 (2004)).

60 Actualmente la prostatectomía radical y la radioterapia proporcionan un tratamiento curativo para la mayoría de los tumores de próstata localizados. Sin embargo, las opciones terapéuticas están muy limitadas en casos avanzados. Para la enfermedad metastática, el tratamiento de referencia es la ablación androgénica con un agonista de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) solo o en combinación con anti-andrógenos. Aún a pesar del
65 bloqueo máximo de andrógenos, la enfermedad casi siempre progresa desarrollando la mayoría una enfermedad independiente de andrógenos. Hoy día no hay un tratamiento aceptado uniformemente para el cáncer de próstata

refractario a hormonas, y se utilizan comúnmente regímenes quimioterápicos ((Muthuramalingam et al., Clin. Oncol. 16:505-516 (2004); Trojan et al., Anticancer Res. 25:551-561 (2005)).

5 El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común y la cuarta causa más frecuente de muertes por cáncer en todo el mundo (Weitz et al., 2005, Lancet 365:153-65). Aproximadamente el 5-10 % de todos los cánceres colorrectales son hereditarios siendo una de las formas principales la poliposis adenomatosa familiar (FAP), una enfermedad autosómica dominante en la que aproximadamente el 80 % de los individuos afectados contienen una mutación de la línea germinal en el gen de poliposis adenomatosa cólica (FAP). El carcinoma colorrectal tiene una tendencia a invadir localmente por crecimiento circunferencial y cualquier sitio por diseminación linfática, hematológica, transperitoneal, y perineural. El sitio más común de implicación extralinfática es el hígado, siendo el pulmón el órgano extra-abdominal más afectado. Otros sitios de diseminación hematológica incluyen huesos, riñones, glándulas adrenales, y cerebro.

15 El sistema de estadificación actual para el cáncer colorrectal se basa en el grado de penetración tumoral a través de la pared intestinal y la presencia o ausencia de implicación ganglionar. El sistema de estadificación se define por tres principales clasificaciones de Duke: enfermedad A de Duke se restringe a las capas de la submucosa del colon y el recto; la enfermedad B de Duke tiene tumores que invaden a través del músculo propio y puede penetrar la pared del colon o recto; y la enfermedad C de Duke incluye cualquier grado de invasión de la pared intestinal con metástasis a ganglios linfáticos regionales. Aunque la resección quirúrgica es altamente eficaz en cánceres colorrectales de estadios tempranos, proporcionando tasas de curación del 95 % en pacientes A de Duke, la tasa se reduce al 75 % en pacientes B de Duke y la presencia de ganglios linfáticos positivos en la enfermedad C de Duke prevé un 60 % de probabilidad de recurrencia en cinco años. El tratamiento de pacientes C de Duke con un curso post-quirúrgico de quimioterapia reduce la tasa de recurrencia al 40 %-50 %, y ahora es la referencia de cuidados para estos pacientes.

25 El cáncer de pulmón es el cáncer más común en todo el mundo, el tercer cáncer más comúnmente diagnosticado en los Estados Unidos, y con mucho la causa más frecuente de muertes por cáncer (Spiro et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166:1166-1196 (2002); Jemal et al., CA Cancer J. Clin. 53:5-26 (2003)). Se cree que fumar cigarrillos es responsable del 87 % estimado de todos los cánceres de pulmón, haciéndole la enfermedad más absolutamente prevenible. El cáncer de pulmón se divide en dos tipos principales que suponen más del 90 % de todos los cánceres de pulmón; cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). El SCLC supone el 15-20 % de los casos y se caracteriza por su origen en las vías respiratorias centrales grandes y su composición histológica de capas de células pequeñas con poco citoplasma. El SCLC es más agresivo que el NSCLC, creciendo rápidamente y metastatizando muy pronto y a menudo. El NSCLC supone el 80-85 % de todos los casos y se divide además en tres subtipos principales que se basan en la histología: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), y un carcinoma indiferenciado de grandes células.

40 El cáncer de pulmón se presenta normalmente tarde en su curso, y por lo tanto tiene una supervivencia de solo 6-12 meses tras el diagnóstico y una tasa de supervivencia total de 5 años de solo el 5-10 %. Aunque la cirugía ofrece la mejor oportunidad de cura, solo una pequeña fracción de los pacientes con cáncer de pulmón son elegibles y la mayoría dependen de la quimioterapia y radioterapia. A pesar de los intentos de manejar el intervalo y la intensidad de dosis en estas terapias, las tasas de supervivencia han aumentado poco en los últimos 15 años (Spiro et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166:1166-1196 (2002)).

45 El cáncer aparece por la mala regulación de los mecanismos que controlan el mantenimiento y desarrollo normal de los tejidos, y se cree cada vez más que las células madre tienen un papel central (Beachy et al., Nature 432:324 (2004)). Durante el desarrollo animal normal, las células de la mayoría o todos los tejidos se derivan de precursores normales, llamados células madre (Morrison et al., Cell 88:287-298 (1997); Morrison et al., Curr. Opin. Immunol. 9:216-221 (1997); Morrison et al., Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 11:35-71 (1995)). Las células madre son células que: 50 (1) tienen una extensa capacidad proliferativa; (2) son capaces de división celular asimétrica para generar uno o más tipos de progenie con potencial de desarrollo y proliferativo reducidos; y (3) son capaces de divisiones celulares simétricas para auto-renovarse o auto-mantenerse. El ejemplo mejor conocido de renovación celular de adulto por diferenciación de células madre es el sistema hematopoyético en el que precursores de desarrollo inmaduros (células progenitoras y madre hematopoyéticas) responden a señales moleculares para formar los variados tipos celulares sanguíneos y linfoides. Otras células, incluyendo las células del intestino, sistema ductal de la mama, y piel se reponen constantemente a partir de una pequeña población de células madre de cada tejido, y estudios recientes sugieren que la mayoría de otros tejidos adultos también albergan células madre, incluyendo el cerebro.

60 Los tumores sólidos están compuestos por poblaciones celulares heterogéneas. Por ejemplo, los cánceres de mama tienen una mezcla de células cancerosas y células normales, que incluyen células del mesénquima (estroma), células inflamatorias, y células endoteliales. Los modelos clásicos de cáncer sostienen que las poblaciones celulares del cáncer distintas fenotípicamente todas tienen la capacidad de proliferar y dar lugar a un nuevo tumor. En el modelo clásico, la heterogeneidad celular del tumor tiene lugar por los factores ambientales así como las mutaciones en curso en las células cancerosas que dan como resultado una población diversa de células tumorigénicas. Este modelo se basa en la idea de que todas las poblaciones de células tumorales tendrían algún grado de potencial tumorigénico (Pandis et al., Genes, Chromosomes & Cancer 12:122-129 (1998); Kuukasjrvi et al., Cancer Res.

57:1597-1604 (1997); Bonsing et al., Cancer 71:382-391 (1993); Bonsing et al., Genes Chromosomes & Cancer 82:173-183 (2000); Beerman H. et al., Cytometry. 12:147-154 (1991); Aubele M & Werner M, Analyt. Cell. Path. 19:53 (1999); Shen Let al., Cancer Res. 60:3884 (2000)).

5 Un modelo alternativo para la heterogeneidad celular observada en los tumores sólidos es que los tumores sólidos son el resultado de una "célula madre de tumor sólido" (o "célula madre del cáncer" de un tumor sólido) que posteriormente sufre un desarrollo caótico por medio de rondas de divisiones celulares tanto simétricas como asimétricas. En este modelo de células madre, los tumores sólidos contienen un grupo de células distinto y limitado (posiblemente incluso escaso) que comparten las propiedades de "células madre" normales, en que proliferan
10 extensamente y eficazmente dando lugar a células madre de tumor sólido adicionales (auto-renovación) y a la mayoría de las células tumorales de un tumor sólido que carecen de potencial tumorigénico. Además, las mutaciones en la población de células madre de vida larga pueden iniciar la formación de células madre de cáncer que sustentan el crecimiento y el mantenimiento de los tumores y cuya presencia contribuye al fracaso de las estrategias terapéuticas actuales.

15 La naturaleza de las células madre del cáncer se reveló por primera vez en el cáncer sanguíneo, leucemia mieloide aguda (AML) (Lapidot et al., Nature 17:645-648 (1994)). Más recientemente se ha demostrado que los tumores de mama humanos malignos albergan de manera similar una población de células madre distinta y pequeña que se enriquece por la capacidad para formar tumores en ratones inmunodeficientes. Se encontró que una población celular Lin ESA+, CD44+, CD24-/Bajo, estaba enriquecida 50 veces en células tumorigénicas en comparación con células tumorales no fraccionadas (Al-Hajj et al., PNAS 100:3983-3988 (2003)). La capacidad para aislar de manera selectiva las células de cáncer tumorigénicas ha permitido la investigación de rutas biológicas críticas, que sustentan la tumorigenicidad en estas células, y por lo tanto promete el desarrollo de ensayos diagnósticos mejores y terapias para pacientes de cáncer. La presente invención se dirige hacia este fin.

25 El documento US2002/0137129 desvela el uso del FZD4 fusionado con Fc para terapia.

Breve resumen de la invención

30 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un receptor soluble y un vehículo, un excipiente y/o un estabilizante farmacéuticamente aceptables, en que la secuencia del receptor soluble consiste en lo restos 28 a 158 de la SEC ID N° 7, unidos a una secuencia de no receptor FZD, en que la secuencia no receptor FZD comprende un Fc humano.

35 La presente invención también proporciona la composición reivindicada para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia, como se expone en la reivindicación 4, y para su uso en un método de tratamiento del cáncer como se expone en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.

40 Ejemplos de tumores sólidos que se pueden tratar utilizando la composición terapéutica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, sarcomas y carcinomas tales como, pero sin limitarse a: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomas, rhabdomiomas, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofarigioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico,
50 oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma. La invención se puede aplicar a sarcomas y cánceres epiteliales, tales como cánceres ováricos y cánceres de mama.

Breve descripción de los dibujos/figuras

55 FIG. 1: Semivida de los receptores FZD.Fc solubles. Las proteínas de fusión Fc purificadas se administraron i.p. a 2 ratones cada una y se obtuvieron muestras de sangre en varios tiempos tras la administración. Las proteínas FZD4 Fri.Fc, FZD5 Fri.Fc, y FZD8 Fri.Fc aún estaban presentes en el suero sanguíneo a las 72 horas tras la inyección, y las proteínas FZD5 Fri.Fc y FZD8 Fri.Fc estaban presentes en el suero sanguíneo hasta 96 horas tras la administración. Por el contrario, FZD5 BCD.Fc era indetectable en el suero sanguíneo tras solo 24 horas (parte superior).

60 FIG. 2: Los receptores FZD Fc solubles inhiben la señalización Wnt3a. Se incubaron concentraciones crecientes (2 nM, 5 nM, y 60 nM) de proteínas de fusión FZD Fc incluyendo FZD4 Fri.Fc, FZD5 ECD.Fc, FZD5 Fri.Fc, y FZD8 Fri.Fc con células L en presencia o ausencia de ligando Wnt3a y se determinó la estabilización de β -catenina por inmunotransferencia. En ausencia del ligando Wnt3a, la β -catenina no se podía detectar (LCM). En presencia del Wnt3a se estabilizaba la β -catenina y esta estabilización se bloqueaba con cantidades crecientes de proteína de receptor soluble FZD5, FZD8, y FZD4 Fc pero no con una proteína Fc de control (Con Fc).
65

FIG. 3: Los receptores FZD Fc solubles inhiben la señalización Wnt. Se incubaron células Hek 293 transfectadas establemente con 8x de indicador TCF-luciferasa con concentraciones crecientes de receptores FZD Fc solubles en presencia de diferentes ligandos Wnt que incluían Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a y Wnt7b. Las proteínas de fusión FZD4 Fc, FZD5 Fc y FZD8 Fc inhibían la señalización mediada por los cinco ligandos Wnt como se muestra por la pérdida de actividad de luciferasa.

FIG. 4: Reducción del crecimiento tumoral por receptores proteicos FZD Fc solubles. Se inyectaron por vía subcutánea ratones NOD/SCID con células tumorales de colon disociadas (10.000 células por animal; n = 10) y se trataron dos días después con receptor FZD7 ECD.Fc soluble, receptor FZD10 ECD.Fc soluble, o inyecciones de control. Se muestra el volumen tumoral total a los 21, 24, 28 y 30 días. La reducción del volumen tumoral por el FZD7 ECD.Fc era significativo estadísticamente el día 28 y el día 30 (*).

FIG. 5: Prevención del crecimiento tumoral dependiente de Wnt por el receptor proteico FZD8 Fri.Fc soluble. Se inyectaron ratones NOD/SCID con 50.000 células MMTV WNT1 derivadas del tumor (n = 10) y se trataron al día siguiente con el receptor FZD8 Fri.Fc soluble o PBS como control. El crecimiento tumoral se controló semanalmente hasta que se detectó el crecimiento, y luego se midió el crecimiento tumoral dos veces a la semana. El crecimiento tumoral en los animales tratados con FZD Fri.Fc (barra de la izquierda) se eliminaba virtualmente en comparación con el observado en los animales de control (barra de la derecha).

FIG. 6: Reducción del crecimiento del tumor PE13 injertado por el receptor proteico FZD8 Fri.Fc soluble. Se inyectaron ratones NOD/SCID con 50.000 células de tumor de mama PE13 (n = 10) y se trataron al día siguiente con receptor FZD8 Fri.Fc soluble o PBS como control. Se controló el crecimiento tumoral semanalmente hasta que se detectó el crecimiento, entonces se midió el crecimiento tumoral dos veces a la semana. El crecimiento tumoral en los animales tratados con FZDFri.Fc (barra de la izquierda) estaba significativamente reducida en comparación con el observado en los animales de control (barra de la derecha).

FIG. 7: Tratamiento del crecimiento tumoral dependiente de Wnt por el receptor proteico FZD Fri.Fc soluble. Se les implantó 50.000 células MMTV Wnt1 derivadas de tumor de mama a ratones doble knockout *rag-cadena 21γ*. El tratamiento con 5 mg/kg de FZD8 Fri.Fc redujo el crecimiento de tumores, según se midió por el volumen tumoral total a lo largo del tiempo, con respecto a los ratones tratados con PBS (barras blancas). El tratamiento con 10 mg/kg y 30 mg/kg de FZD8 Fri.Fc era incluso más eficaz en la reducción del tamaño de tumores pre-establecidos. Por el contrario, el FZD5 Fri.Fc no presenta efectos anti-tumorales en tumores de mama establecidos que necesitan Wnt1 para su crecimiento.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término “antagonista” se utiliza en el presente documento para incluir cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o totalmente la expresión de o la actividad biológica de un marcador de células madre del cáncer que se desvela en el presente documento y tal actividad biológica incluye, pero no se limita a, inhibición del crecimiento tumoral. El término “antagonista” incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe, o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de la ruta FZD. Las moléculas antagonistas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, fragmentos o variantes de las secuencias de aminoácidos de los receptores proteicos FZD nativos incluyendo los receptores FZD solubles.

Los términos “aislado” y “purificado” se refieren al material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que le acompaña normalmente en su estado nativo. La pureza y homogeneidad se determina normalmente utilizando técnicas de química analítica tal como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de altas prestaciones. Una proteína (por ejemplo un receptor soluble) o un ácido nucleico que sea la especie predominante en una preparación es lo que sustancialmente se aísla. En particular, un ácido nucleico aislado se separa de fases de lectura que flanquean naturalmente el gen y que codifican proteínas distintas de la proteína codificada por el gen. Un anticuerpo aislado se separa de otras proteínas no inmunoglobulinas y de otras proteínas inmunoglobulinas con una especificidad de unión al antígeno diferente. Esto también significa que el ácido nucleico o proteína tendrá al menos un 85 % de pureza, al menos un 95 % de pureza, y en algunas realizaciones al menos un 99 % de pureza.

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones “receptor soluble” y “receptor FZD soluble” se refiere a un fragmento extracelular del extremo N de un receptor proteico FZD humano que precede al primer dominio transmembrana del receptor que se puede segregar por una célula en forma soluble. Se conciben tanto los receptores FZD solubles que comprenden el dominio extracelular del extremo N (ECD) (al que se denomina en el presente documento “FZD ECD”) así como fragmentos más pequeños. También se desvelan receptores FZD solubles que comprenden el dominio Fri (que se denominan en el presente documento “FZD Fri”). Los receptores FZD Fri solubles pueden mostrar una actividad biológica alterada, (por ejemplo, un aumento de la semivida de la proteína) en comparación con los receptores solubles que comprenden el FZD ECD completo. La semivida de la proteína se puede aumentar además por modificación covalente con poli (etilenglicol) u óxido de polietileno (ambos denominados PEG). Los receptores FZD solubles incluyen dominios FZD ECD o Fri que se fusionan en fase con otras proteínas funcionales o estructurales que incluyen pero no se limitan a, un Fc humano (por ejemplo un Fc humano derivado de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM); marcadores proteicos (por ejemplo, myc, FLAG, GST); otras proteínas endógenas o fragmentos de proteína; u otra secuencia de proteína útil que incluye

cualquier región enlazadora entre un dominio FZD ECD o Fri y una proteína a la que se une. En ciertas realizaciones el dominio Fri de un receptor FZD se une al Fc de IgG1 humana (al que se denomina en el presente documento "FZD Fri.Fc"). Los receptores FZD solubles también incluyen proteínas con inserciones, eliminaciones, sustituciones y variaciones conservadoras, etc. de aminoácidos.

5 Como se utiliza en el presente documento, los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen el estado fisiológico en mamíferos en el que una población de células se caracteriza por un crecimiento celular sin regulación. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a estos, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células
10 pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza
15 y cuello.

Las expresiones "trastorno proliferativo" y "enfermedad proliferativa" se refiere a trastornos asociados con la proliferación celular anormal tal como el cáncer.

20 "Tumor" y "neoplasia" como se utilizan en el presente documento se refieren a cualquier masa de tejido que resulta del crecimiento o proliferación celular excesiva, sea benigna (no cancerosa) o maligna (cancerosa) incluyendo las lesiones pre-cancerosas.

25 "Metástasis" como se utiliza en el presente documento se refiere al proceso por el cual se disemina o transfiere un cáncer desde el sitio de origen a otras regiones del cuerpo con el desarrollo de una lesión cancerosa similar en la nueva ubicación. Una célula "metastática" o "que metastatiza" es la que pierde los contactos adhesivos con las células vecinas y migra por medio de la corriente sanguínea o linfática desde el sitio primario de la enfermedad para invadir estructuras corporales vecinas.

30 Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal (por ejemplo, un mamífero), que incluye pero no se limita a, seres humanos, primates no humanos, roedores, y similares, que van a ser receptores de un tratamiento particular. Normalmente, los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento en referencia a un sujeto humano.

35 Las expresiones "célula madre del cáncer", "célula madre tumoral", o "célula madre de tumor sólido" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento y se refiere a una población de células de un tumor sólido que: (1) tienen una extensa capacidad proliferativa; (2) son capaces de división celular asimétrica para generar uno o más tipos de progenie diferenciada con un potencial proliferativo o de desarrollo reducido; y (3) son capaces de divisiones
40 celulares simétricas para auto-renovación o auto-mantenimiento. Estas propiedades de las "células madre del cáncer", "células madre tumorales" o "células madre de tumores sólidos" confieren a las células madre del cáncer la capacidad para formar tumores palpables en el trasplante en serie en ratones inmunocomprometidos en comparación con la mayoría de las células tumorales que fracasan en la formación de tumores. Las células tumorales, es decir, las células no tumorigénicas pueden formar un tumor al trasplantarlas un número limitado de veces (por ejemplo una o dos veces) después de obtenerse las células tumorales de un tumor sólido pero no
45 mantendrán la capacidad de formar tumores palpables en el trasplante en serie de ratones inmunocomprometidos. Las células madre del cáncer sufren una auto-renovación frente a diferenciación de una manera caótica para formar tumores con tipos celulares anormales que pueden cambiar en el tiempo según se producen mutaciones. Las células madre de tumores sólidos de la presente invención se diferencian de la "línea madre del cáncer" descrita en la Pat. de EE. UU. N° 6.004.528. En esta patente, la "línea madre del cáncer" se define como un tipo de células
50 progenitoras de crecimiento lento que tiene pocas mutaciones en sí mismas pero que tienen divisiones celulares simétricas más que asimétricas como resultado de cambios tumorigénicos que se producen en el ambiente de las células. Esta hipótesis de "línea madre del cáncer" propone por lo tanto que las células tumorales altamente mutadas, que proliferan rápidamente aparecen sobre todo como resultado de un ambiente anormal, que produce que se acumulen células madre relativamente normales y que entonces sufren mutaciones que causan que se
55 vuelvan células tumorales. La Pat. de EE. UU. N° 6.004.528 propone que tal modelo se puede utilizar para aumentar el diagnóstico de cáncer. El modelo de célula madre de tumor sólido es fundamentalmente diferente del modelo de "línea madre del cáncer" y como resultado presenta utilidades que no ofrece el modelo de "línea madre del cáncer". En primer lugar, las células madre de tumores sólidos no están "mutacionalmente restringida". La "línea madre del cáncer mutacionalmente restringida" descrita en la Pat. de EE. UU. N° 6.004.528 se puede considerar una lesión
60 pre-cancerosa, mientras que las células madre tumorales descritas en la presente invención son células cancerosas que por sí mismas contienen mutaciones que son responsables de la tumorigénesis. Es decir, las células madre de tumores sólidos ("células madre del cáncer") de la invención se incluirían entre las células altamente mutadas y se distinguen de la "línea madre del cáncer" de la Pat. de EE. UU. N° 6.004.528. En segundo lugar, las mutaciones genéticas que dan lugar al cáncer pueden ser sobre todo intrínsecas de las células madre de tumores sólidos así
65 como ambientales. El modelo de célula madre de tumor sólido predice que las células madre de tumor sólido aisladas pueden dar lugar a tumores adicionales al trasplantarlas (explicando por lo tanto las metástasis) mientras

- que el modelo de la “línea madre del cáncer” prevería que las células de la “línea madre del cáncer” trasplantadas no serían capaces de dar lugar a un nuevo tumor, ya que es su ambiente anormal el que es tumorigénico. Además, la capacidad para trasplantar células madre de tumores sólidos humanos disociadas y aisladas fenotípicamente a un ratón (en un ambiente que es muy diferente del ambiente tumoral normal), donde aún siguen formando tumores,
- 5 distingue la presente invención del modelo de “línea madre del cáncer”. En tercer lugar, las células madre de tumores sólidos se dividen tanto simétrica como asimétricamente, tal que la división celular simétrica no es una propiedad obligatoria. En cuarto lugar, las células madre de tumores sólidos se pueden dividir rápida o lentamente, dependiendo de muchas variables, tal que una tasa de proliferación lenta no es una característica definitiva.
- 10 Las expresiones “célula cancerosa”, “célula tumoral” y equivalentes gramaticales se refieren a la población total de células que se derivan de un tumor incluyendo tanto las células no tumorigénicas, que comprenden el grueso de la población celular tumoral, y las células madre tumorigénicas a las que también se denomina en el presente documento células madre del cáncer.
- 15 Como se utiliza en el presente documento “tumorigénico” se refiere a las características funcionales de una célula madre de tumores sólidos que incluyen las propiedades de auto-renovación (dando lugar a células madre del cáncer tumorigénicas adicionales) y proliferación para generar todas las otras células tumorales (dando lugar a células tumorales diferenciadas y por lo tanto no tumorigénicas) que permiten a las células madre de tumores sólidos formar un tumor. Estas propiedades de auto-renovación y proliferación para generar todas las otras células tumorales
- 20 confieren a las células madre del cáncer de la presente invención la capacidad para formar tumores palpables en el trasplante en serie en ratones inmunocomprometidos en comparación con la mayoría de las células tumorales que son incapaces de formar tumores con el trasplante en serie. Las células tumorales, es decir, las células tumorales no tumorigénicas, pueden formar un tumor en el trasplante en un ratón inmunocomprometido un número limitado de veces (por ejemplo, una o dos veces) tras obtener las células tumorales a partir de un tumor sólido.
- 25 Como se utilizan en el presente documento, las expresiones “marcador(es) del cáncer de células madre”, “marcador(es) de células madre del cáncer”, “marcador(es) de células madre tumorales”, o “marcador(es) de células madre de tumores sólidos” se refieren a un gen o genes o una proteína, polipéptido, o péptido que se expresa por el gen o genes cuyo nivel de expresión, solo o en combinación con otros genes, se correlaciona con la presencia de
- 30 células cancerosas tumorigénicas en comparación con células no tumorigénicas. La correlación se puede referir a cualquier aumento o disminución de la expresión del gen (por ejemplo, aumento o disminución de los niveles de ARNm o del péptido codificado por el gen).
- 35 Como se utilizan en el presente documento, los términos “biopsia” y “tejido de biopsia” se refieren a una muestra de tejido o fluido que se retira de un sujeto con el fin de determinar si la muestra contiene tejido canceroso. En algunas realizaciones, el tejido o fluido de biopsia se obtiene porque el sujeto es sospechoso de tener un cáncer. El tejido o fluido de biopsia se examina entonces en cuanto a la presencia o ausencia de cáncer.
- 40 Como se utiliza en el presente documento, un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquier material que, cuando se combina con un principio activo de una composición farmacéutica tal como un anticuerpo, permite al anticuerpo, por ejemplo, mantener su actividad biológica. Además, un “vehículo farmacéuticamente aceptable” no desencadena una respuesta inmunitaria en un sujeto receptor. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los vehículos farmacéuticos de referencia tales como solución salina fosfato tamponada, agua, y varias emulsiones de aceite en agua. Ejemplos de diluyentes para la administración en aerosol o parenteral es la
- 45 solución salina fosfato tamponada o solución salina normal (0,9 %).
- La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un receptor soluble, u otro fármaco eficaz para “tratar” una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir o detener la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir o parar la metástasis; inhibir o parar el crecimiento tumoral, y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Según la extensión a la que el fármaco evita el crecimiento y/o destruye las células cancerosas existentes, se puede denominar citostático y/o citotóxico.
- 50 Como se utiliza en el presente documento la expresión “inhibe el crecimiento tumoral” se refiere a cualquier mecanismo por el que el crecimiento celular tumoral se puede inhibir. En ciertas realizaciones el crecimiento celular tumoral se inhibe porque se entorpece la proliferación de células tumorales. En ciertas realizaciones el crecimiento celular tumoral se inhibe deteniendo la proliferación de células tumorales. En ciertas realizaciones el crecimiento celular tumoral se inhibe destruyendo las células tumorales. En ciertas realizaciones el crecimiento celular tumoral se inhibe privando a las células tumorales de nutrientes. En ciertas realizaciones el crecimiento celular tumoral se inhibe evitando la migración de las células tumorales. En ciertas realizaciones el crecimiento celular tumoral se inhibe evitando la invasión de las células tumorales.
- 60 Como se utiliza en el presente documento, “proporcionar un diagnóstico” o “información diagnóstica” se refiere a cualquier información que es útil en la determinación de si un paciente tiene una enfermedad o afección y/o en
- 65

clasificar la enfermedad o afección en una categoría fenotípica o cualquier categoría que tenga una significación con respecto al pronóstico de o la probable respuesta al tratamiento (o del tratamiento en general o cualquier tratamiento particular) de la enfermedad o condición. De manera similar, el diagnóstico se refiere a proporcionar cualquier información diagnóstica, que incluye, pero no se limita a, si un sujeto es probable que tenga una afección (tal como un tumor), información relacionada con la naturaleza o clasificación de un tumor como por ejemplo un tumor de alto riesgo o un tumor de bajo riesgo, que incluye la elección de un agente quimioterápico particular u otra modalidad de tratamiento tal como la cirugía o la radiación o una elección sobre si interrumpir o suministrar una terapia.

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones “proporcionar un pronóstico”, “información pronóstica” o “información predictiva” se refiere a proporcionar una información con respecto al impacto de la presencia de un cáncer (por ejemplo, como se determina por los métodos de diagnóstico de la presente invención) en la futura salud del sujeto (por ejemplo, morbilidad o mortalidad, la probabilidad de adquirir un cáncer, y el riesgo de metástasis).

Como se utiliza en el presente documento, “tratando”, “tratamiento”, “tratar” y “aliviar” se refiere a 1) medidas terapéuticas que curan, enlentecen, disminuyen síntomas de, y/o paran la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado y 2) medidas profilácticas o preventivas que evitan o enlentecen el desarrollo de una afección o trastorno patológico al que se dirigen. Por tanto los que tienen necesidad de tratamiento son los que ya tienen el trastorno; los que son propensos a tener el trastorno; y a los que se va a prevenir el trastorno. Un sujeto se “trata” satisfactoriamente de acuerdo con los métodos de la presente invención si el paciente muestra uno o más de los siguientes: una reducción en el número de o la ausencia completa de células cancerosas; una reducción del tamaño del tumor; la inhibición de o una ausencia de infiltración celular en los órganos periféricos que incluyen la diseminación del cáncer en tejidos blandos y huesos; inhibición de o ausencia de metástasis tumoral; inhibición o ausencia de crecimiento tumoral; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; reducción de la morbilidad y mortalidad; y mejoría de la calidad de vida.

Como se utiliza en el presente documento, los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se refiere a un polímero compuesto por una multiplicidad de unidades de nucleótidos (ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o variantes estructurales relacionadas) unidas por enlaces fosfodiéster, que incluyen pero no se limitan a ADN o ARN. El término engloba secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases de ADN y ARN que incluyen, pero no se limitan a 4 acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudocitosina, 5 (carboxihidroxi-metil) uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil 2 tiouracilo, 5 carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6 isopenteniladenina, 1 metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1 metilguanina, 1 metilinosina, 2,2-dimetil-guanina, 2 metiladenina, 2 metilguanina, 3-metil-citosina, 5 metilcitosina, N6 metiladenina, 7 metilguanina, 5 metilaminometiluracilo, 4-metoxi-amino-metil-2-tiouracilo, beta D mansoilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2 metiltio N6 isopentenil adenina, metiléster del ácido uracil 5 oxiacético, ácido uracil 5 oxiacético, oxibutoxina, pseudouracilo, queosina, 2 tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, metiléster del ácido N-uracil 5 oxiacético, ácido uracil 5 oxacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, y 2,6-diaminopurina.

El término “gen” se refiere a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido, precursor o ARN (por ejemplo, rARN, tARN). El polipéptido se puede codificar por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier parte de la secuencia codificante siempre que se mantengan la actividad deseada o las propiedades funcionales (por ejemplo, la actividad enzimática, unión al ligando, transducción de la señal, inmunogenicidad, etc.) de la longitud completa o fragmento. El término también engloba la región codificante de un gen estructural y las secuencias localizadas adyacentes a la región codificante tanto hacia el extremo 5' y 3' con una distancia de aproximadamente 1 kb o más en cualquier extremo tal que el gen corresponda con la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias localizadas 5' de la región codificante y presentes en el ARNm se denominan secuencias 5' no traducidas. Las secuencias localizadas 3' o corriente abajo de la región codificante y presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. El término “gen” engloba tanto las formas ADNc como genómica de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes denominadas “intrones” o “regiones intermedias” o “secuencias intermedias”. Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en ARN nuclear (hnARN); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como amplificadores. Los intrones se eliminan o “recortan” de la transcripción primaria o nuclear; los intrones por lo tanto están ausentes en la transcripción del ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia o el orden de aminoácidos en un polipéptido emergente. Además de que contienen intrones, las formas genómicas de un gen pueden incluir también secuencias localizadas tanto en los extremos 5' y 3' de las secuencias que están presentes en la transcripción de ARN. Estas secuencias se llaman secuencias o regiones “flanqueantes” (estas secuencias flanqueantes se localizan 5' o 3' a las secuencias no traducidas presentes en la transcripción ARNm). La región flanqueante 5' puede contener secuencias reguladoras tales como promotores y amplificadores que controlan o tienen influencia en la transcripción del gen. La región flanqueante 3' puede contener secuencias que dirigen la terminación de la transcripción, escisión post-transcripcional y poliadenilación.

El término “recombinante” cuando se utiliza con referencia a una célula, ácido nucleico, proteína o vector indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga, la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o de la célula se deriva de una célula modificada de esta manera. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma

nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se sobre-expresan o de otra manera se expresan anormalmente tal como, por ejemplo, que se expresan como fragmentos de origen no natural o variantes de corte y empalme. Con el término “ácido nucleico recombinante” en el presente documento se quiere significar un ácido nucleico, formado originalmente *in vitro*, en general por la modificación de un ácido nucleico, por ejemplo, utilizando polimerasas y endonucleasas, en una forma que no se encuentra normalmente en la naturaleza. De esta manera, se consigue la unión operativa de diferentes secuencias. Por lo tanto una molécula de ácido nucleico aislado, en forma lineal, o un vector de expresión formado *in vitro* por unión de moléculas de ADN que normalmente no están unidas, se consideran recombinantes para los fines de la presente invención. Se entiende que una vez que se hace una molécula de ADN recombinante y se introduce en una célula u organismo huésped, se replicará no recombinantemente, es decir, utilizando la maquinaria celular *in vivo* de la célula huésped más que por modificaciones *in vitro*; sin embargo, tales ácidos nucleicos una vez producidos recombinantemente, aunque posteriormente se repliquen no recombinantemente, se consideran aún recombinantes para los fines de la invención. De manera similar, una “proteína recombinante” es una proteína fabricada utilizando técnicas recombinantes, es decir, por medio de la expresión de una molécula de ácido nucleico recombinante como se describe anteriormente.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “gen heterólogo” se refiere a un gen que no está en su ambiente natural. Por ejemplo, un gen heterólogo incluye un gen de una especie introducido en otras especies. Un gen heterólogo también incluye un gen nativo de un organismo que se ha alterado de alguna manera (por ejemplo, mutado, añadido en múltiples copias, unido a secuencias reguladoras no nativas, etc.). Los genes heterólogos se distinguen de los genes endógenos en que las secuencias genéticas heterólogas se unen normalmente a secuencias de ADN que no se encuentran naturalmente asociadas con las secuencias genéticas en el cromosoma o que están asociadas con partes del cromosoma que no se encuentran en la naturaleza (por ejemplo, genes expresados en loci en los que el gen no se expresa normalmente).

Como se utiliza en el presente documento, el término “vector” se utiliza en referencia a moléculas de ácido nucleico que transfieren segmentos de ADN de una célula a otra. El término “vehículo” a veces se utiliza de manera intercambiable con “vector”. Los vectores a menudo se derivan de plásmidos, bacteriófagos, o virus de plantas o animales.

“Ligadura” se refiere al proceso de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico de doble cadena. A menos de que se proporcione otra cosa, una ligadura se puede conseguir utilizando tampones conocidos y condiciones con 10 unidades de T4 ADN ligasa (“ligasa”) por 0,5 ug de cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN que se van a ligar. La ligadura del ácido nucleico puede servir para unir dos proteínas juntas en fase para producir una única proteína, o proteína de fusión.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “expresión genética” se refiere al proceso de convertir la información genética codificada en un gen en ARN (por ejemplo, ARNm, tARN, o snARN) por medio de la “transcripción” del gen (por ejemplo por medio de la acción enzimática de una ARN polimerasa), y para los genes que codifican proteínas, en proteínas por medio de la “traducción” del ARNm. La expresión genética se puede regular en muchos estadios del proceso. “Regulación positiva” o “activación” se refiere a la regulación que aumenta la producción de productos de la expresión genética (por ejemplo, ARN o proteínas), mientras que “regulación negativa” o “represión” se refiere a la regulación que disminuye la producción. Las moléculas (por ejemplo, factores de transcripción) que están implicadas en la regulación positiva o regulación negativa a menudo se llaman “activadores” y “represores”, respectivamente.

Los términos “polipéptido”, “péptido”, “proteína”, y “fragmento de proteína” se utilizan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los que se codifican por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican después, por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, por ejemplo, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, la norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero mantienen la misma estructura química básica que los aminoácidos de origen natural. Miméticos de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido de origen natural.

“Variantes modificadas conservadoramente” se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. “Variantes de aminoácidos” se refiere a secuencias de aminoácidos. Con respecto a secuencias de ácido nucleico en particular, variantes modificadas conservadoramente se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias

de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, secuencias esencialmente idénticas o asociadas (por ejemplo, contiguos naturalmente). Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican la mayoría de las proteínas. Por ejemplo, todos los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina.

5 Por lo tanto, en cada posición en que se especifica la alanina por un codón, el codón se puede alterar con otro de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silentes", que es una especie de variaciones modificadas conservadoramente. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica un polipéptido también describe variaciones silentes del ácido nucleico. Un experto en la técnica reconocerá que en ciertos contextos cada codón de un ácido nucleico (excepto
10 AUG, que es habitualmente el único codón para la metionina, y TGG, que habitualmente es el único codón para el triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, las variaciones silentes de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en una secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias sonda actuales. Como para las secuencias de aminoácidos, un experto en la técnica reconocerá que sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales en una
15 secuencia de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, o proteínas que alteren. Añadan o eliminen un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada conservadoramente" que incluye cuando la alteración da como resultado una sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservadoras proporcionan aminoácidos funcionalmente similares que se conocen bien en la técnica. Tales variantes modificadas conservadoramente son en
20 adición a y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies, y alelos de la invención. Las sustituciones conservadoras incluyen normalmente: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido Aspártico (D), Ácido Glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

25 La expresión "epítipo marcado" como se utiliza en el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un marcador proteico de células madre del cáncer, o una secuencia de dominio o parte de la misma, fusionado a un "epítipo marcador". El epítipo polipeptídico marcador comprende suficientes restos de aminoácidos para proporcionar un epítipo para el reconocimiento por un anticuerpo, aunque es lo suficientemente corto tal que
30 no interfiere con la actividad del marcador proteico de células madre del cáncer. Los epítipos marcadores adecuados tienen en general al menos seis restos de aminoácidos, habitualmente entre aproximadamente 8 a aproximadamente 50 restos de aminoácidos, o aproximadamente 10 a aproximadamente 20 restos. Los epítipos marcadores utilizados comúnmente incluyen Fc, HA, His, y marcadores FLAG.

35 Como se utiliza en el presente documento, "aproximadamente" se refiere a más o menos el 10 % del número indicado. Por ejemplo, "aproximadamente un 10 %" indica un intervalo del 9 % al 11 %.

Descripción detallada

40 Se describen en el presente documento composiciones y métodos para estudiar, diagnosticar, caracterizar, y tratar el cáncer. En particular, se describen antagonistas contra los marcadores de células madre de tumores sólidos y métodos que utilizan estos antagonistas para inhibir el crecimiento tumoral y tratar el cáncer en pacientes humanos. Los antagonistas incluyen receptores proteicos solubles que comprenden marcadores de células madre del cáncer.

45 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un receptor soluble, como se define en la reivindicación 1 adjunta.

La composición puede proporcionarse para su uso en un método de tratamiento del cáncer como se describe en el presente documento.

50 Un método de tratamiento del cáncer puede comprender la administración del receptor soluble en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento celular tumoral.

55 Un método para tratar el cáncer puede comprender la administración del receptor soluble en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento celular tumoral en combinación con radioterapia. Un método para tratar el cáncer puede comprender la administración del receptor soluble en combinación con quimioterapia. Un método para tratar el cáncer puede comprender la administración del receptor soluble en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento celular tumoral de células tumorales de de un tumor de mama, tumor colorrectal, tumor pulmonar, tumor pancreático, tumor de próstata, o un tumor de cabeza y cuello.

60 Células madre y células madre de tumores sólidos

65 Los cánceres comunes aparecen en tejidos que contienen una subpoblación de células proliferativas que son responsables de reponer las células maduras de vida corta. En tales órganos, la maduración celular se ordena en una jerarquía en la que una escasa población de células madre da lugar tanto a células más diferenciadas y se perpetúan ellas mismas por medio de un proceso llamado auto-renovación (Akashi & Weissman, Developmental

Biology of Hematopoiesis, Oxford Univ. Press, NY (2001); Spangrude et al., Science 241:58-61 (1988); Baum et al., PNAS 89:2804-2808 (1992); Morrison et al., PNAS 92:10302-20306 (1995); Morrison et al., Immunity 5:207-216 (1996); Morrison et al., Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 11:35-71 (1995); Morrison et al., Dev. 124:1929-1939 (1997); Morrison & Weissman, Immunity 1:661. (1994); Morrison et al., Cell 88:287-298 (1997); Uchida et al., PNAS 97:14720-14725 (2000); Morrison et al., Cell 101:499-510 (2000)). Aunque es probable que la mayoría de los tejidos contengan células madre, debido a su escasez estas células se han identificado y purificado rigurosamente para estudiar sus propiedades biológicas, moleculares, y bioquímicas en solo unos pocos tejidos. Las células madre mejor caracterizadas son las que dan lugar al sistema hematopoyético, que se llaman células madres hematopoyéticas (HSC). La utilidad de las HSC se ha demostrado en la terapia del cáncer con su uso extensivo en el trasplante de médula ósea para regenerar el sistema hematolinfoide seguido de protocolos mieloablativos (Baum et al., Bone Marrow Transplantation, Blackwell Scientific Publications, Boston (1994)). La comprensión de la biología celular de los tejidos en los que aparece el cáncer, y específicamente las células madre que residen en esos tejidos, promete proporcionar nuevas perspectivas de la biología del cáncer.

Como los tejidos en que se originan, los tumores sólidos consisten en una población heterogénea de células. El que la mayoría de estas células carezcan de tumorigenicidad sugería que el desarrollo y mantenimiento de los tumores sólidos se basa también en una pequeña población de células madre (es decir, células tumorigénicas) con la capacidad de proliferar y dar lugar eficazmente tanto a células madre adicionales (auto-renovación) y a la mayoría de células tumorales más diferenciadas que carecen de potencial tumorigénico (es decir, células de cáncer no tumorigénicas). El concepto de células madre del cáncer se introdujo por primera vez muy pronto después del descubrimiento de las HSC y se estableció experimentalmente en la leucemia mielógena aguda (AML) (Park et al., J. Natl. Cancer Inst. 46:411-422 (1971); Lapidot et al., Nature 367:645-648 (1994); Bonnet & Dick, Nat. Med. 3:730-737 (1997); Hope et al., Nat. Immunol. 5:738-743 (2004)). Las células madre de tumores sólidos se han aislado más recientemente basándose en la expresión de un patrón único de receptores de superficie celular y en la evaluación de sus propiedades de auto-renovación y proliferación en cultivo y en modelos animales de xenoinjertos. Se descubrió una población de un linaje ESA+ CD44+ CD24-/bajo enriquecido más de 50 veces en cuanto a la capacidad para formar tumores con respecto a células tumorales no fraccionadas (Al-Hajj et al., PNAS 100:3983-3988 (2003)). La capacidad para aislar células madre del cáncer tumorigénicas de la masa de células tumorales no tumorigénicas ha dado lugar a la identificación de marcadores de células madre del cáncer, genes con expresión diferencial en células madre del cáncer en comparación con las células tumorales no tumorigénicas o el epitelio normal de la mama, utilizando análisis de micromatrices. La presente invención emplea el conocimiento de estos marcadores de células madre del cáncer identificados para estudiar, caracterizar, diagnosticar y tratar el cáncer.

Marcador proteico de células madre del cáncer

Las células madre normales y las células madre del cáncer comparten la capacidad de proliferar y auto-renovarse, por lo tanto no es sorprendente que varios genes que regulan el desarrollo normal de las células madre contribuyan a la tumorigénesis (revisado en Reya et al., Nature 414:105-111 (2001) y Taipale & Beachy, Nature 411:349-354 (2001)). La presente invención identifica el receptor Fzd, que incluye por ejemplo, Fzd4, Fzd5, y Fzd8 como marcadores de células madre del cáncer, que implica la ruta de señalización Wnt en el mantenimiento de células madre del cáncer como una diana para tratar el cáncer por medio de la eliminación de estas células tumorigénicas.

La ruta de señalización Wnt es uno de varios reguladores críticos de la formación del patrón embrionario, mantenimiento tisular post-embrionario, y biología de células madre. Más específicamente, la señalización Wnt tiene un papel importante en la generación de la polaridad células y especificación del destino celular incluyendo la auto-renovación por las poblaciones de células madre. La activación no regulada de la ruta Wnt se asocia con muchos cánceres humanos en los que se puede alterar el destino de desarrollo de células tumorales para mantenerlas en un estado no diferenciado y proliferativo. Por lo tanto, la carcinogénesis puede progresar usurpando los mecanismos homeostáticos que controlan el desarrollo normal y la reparación tisular por las células madre (revisado en Reya & Clevers, Nature 434:843 (2005); Beachy et al., Nature 432:324 (2004)).

La ruta de señalización Wnt se dilucidó por primera vez en el mutante de desarrollo de *Drosophila sin alas (wg)* y en el proto-oncogén murino *int-1*, ahora *Wnt1* (Nusse & Varmus, Cell 31:99-109 (1982); Van Ooyen & Nusse, Cell 39:233-240 (1984); Cabrera et al., Cell 50:659-663 (1987); Rijsewijk et al., Cell 50:649-657 (1987)). Los genes *Wnt* codifican glucoproteínas modificadas con lípidos segregadas de las que se han identificado 19 en mamíferos. Estos ligandos segregados activan un complejo de receptor que consiste en un miembro de la familia de receptores Frizzled (Fzd) y proteína 5 o 6 relacionada con el receptor lipoproteico de baja densidad (LRP5/6). Los receptores Fzd tienen tres proteínas de dominio transmembrana de la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G (GPCR) y contienen un gran dominio del extremo N extracelular de unión al ligando con 10 cisteínas conservadas, conocido como dominio rico en cisteína (CRD) o dominio Fri. Hay diez receptores FZD humanos; FZD 1:10. Los diferentes CRD Fzd tienen diferentes afinidades de unión para Wnt específicos (Wu & Nusse, J. Biol. Chem. 277:41762-41769 (2002)), y los receptores Fzd se han agrupado en los que activan la ruta de β -catenina canónica y los que activan las rutas no-canónicas descritas posteriormente (Miller et al., Oncogene 18:7860-7872 (1999)). El LRP5/6 son proteínas de paso transmembrana únicas con cuatro dominios tipo EGF extracelulares separadas por seis repeticiones de aminoácidos YWTD que contribuyen y la unión al ligando (Johnson et al., J. Bone Mineral Res 19:1749 (2004)).

La ruta de señalización Wnt canónica activada con la unión al receptor está mediada por la proteína citoplasmática Dishevelled (Dsh) que interactúa directamente con el receptor Fzd y da como resultado la estabilización y acumulación de β -catenina. En ausencia de una señal Wnt, la β -catenina se localiza en un complejo de destrucción citoplasmático que incluye proteínas supresoras de tumor poliposis adenomatosa cólica (APC) y auxina. Estas proteínas funcionan como armazones críticos para permitir a la glucógeno sintasa quinasa (GSK)-3 β unirse a la β -catenina fosforilada, marcándola para la degradación por medio de la ruta de ubiquitina/proteosoma. La activación de Dsh da como resultado la fosforilación de la GSK3 β y la disociación del complejo de destructor. La β -catenina acumulada en el citoplasma se transporta entonces al núcleo donde interactúa con las proteínas de unión al ADN de la familia Tcf/Lef para activar la transcripción.

Además de la ruta de señalización canónica, los ligandos Wnt también se activan por rutas independientes de la β -catenina (Veeman et al., *Dev. Cell* 5:367-377 (2003)). La señalización Wnt no canónica se ha implicado en numerosos procesos pero el más convincente es en los movimientos de gastrulación por medio de un mecanismo similar a la ruta de polaridad celular plana de *Drosophila* (PCP). Otros mecanismos potenciales de señalización no canónica incluyen el flujo de calcio, JNK, y tanto las proteínas G pequeñas y heterotriméricas. A menudo se observa antagonismo entre las rutas canónicas y no canónicas, y algunas pruebas indican que la señalización no canónica puede suprimir la formación de cáncer (Olson & Gibo, *Exp. Cell Res.* 241:134 (1998); Topol et al., *J. Cell Biol.* 162:899-908 (2003)).

Las células madre hematopoyéticas (HSC) son las células madre mejor comprendidas del cuerpo, y la señalización Wnt están implicadas tanto en su mantenimiento normal como en la transformación leucémica (Reya & Clevers, 2005, *Nature* 434:843). Las HSC son una población escasa de células que residen en un nicho de estroma en la médula ósea de adultos. Estas células se caracterizan tanto por un perfil de expresión único como por una capacidad de dar lugar continuamente a más células progenitoras diferenciadas para reconstituir el sistema hematopoyético completo. Tanto las HSC como las células de su microambiente del estroma expresan ligando de Wnt, y la activación del indicador Wnt está presente en las HSC *in vivo*. Además, tanto la β -catenina como el Wnt3A purificado promueven la auto-renovación de HSC murinas *in vitro* y aumentan la capacidad para reconstituir el sistema hematopoyético *in vivo* mientras que el Wnt5A promueve la expansión de los progenitores hematopoyéticos humanos *in vitro* y la repoblación en un modelo de xenoinjerto NOD-SCID (Reya et al., *Nature* 423:409-414 (2003); Willert et al., *Nature* 423:448-452 (2003); Van Den Berg et al., *Blood* 92:3189-3202 (1998); Murdoch et al., *PNAS* 100:3422-3427 (2003)).

Más recientemente se ha descubierto que la señalización Wnt tiene un papel en el crecimiento oncogénico de los linajes mieloides y linfoides. Por ejemplo, los progenitores de granulocitos-macrófagos (GMP) de las leucemias mielógenas crónicas presentan señalización Wnt activada de la que son dependientes para el crecimiento y la renovación (Jamieson et al., *N. Engl. J. Med.* 351:657-667 (2004)). Y aunque las leucemias no parecen albergar mutaciones en la ruta Wnt, la señalización Wnt autocrina y/o paracrina puede sustentar la auto-renovación cancerosa (Reya & Clevers, *Nature* 434:843 (2005)).

La ruta de señalización Wnt canónica también tiene un papel central en el mantenimiento de poblaciones de células madre en el intestino delgado y colon, y la activación inapropiada de esta ruta tiene un papel preeminente en los cánceres colorrectales (Reya & Clevers, *Nature* 434:843 (2005)). El epitelio de absorción de los intestinos está dispuesto en vellosidades y criptas. Las células madre residen en las criptas y se dividen lentamente para reproducir rápidamente células proliferantes que dan lugar a todas las poblaciones de células diferenciadas que salen de las criptas para ocupar las vellosidades intestinales. La cascada de señalización Wnt tiene un papel dominante en el control del destino celular a lo largo del eje criptas-vellosidades y es esencial para el mantenimiento de la población de células madre. La alteración de la señalización Wnt o por pérdida genética de Tcf7/2 por recombinación homóloga (Korinek et al., *Nat. Genet.* 19:379 (1998)) o sobre-expresión de Dkkopf-1 (Dkk1), un potente antagonista segregado de Wnt (Pinto et al., *Genes Dev.* 17:1709-1713 (2003); Kuhnert et al., *PNAS* 101:266-271 (2004)), da como resultado el agotamiento de las poblaciones de células madre intestinales.

El cáncer colorrectal se inicia más comúnmente por mutaciones de activación en la cascada de señalización Wnt. Aproximadamente el 5-10 % de todos los cánceres colorrectales son hereditarios siendo una de las formas principales la poliposis adenomatosa familiar (FAP), una enfermedad autosómica dominante en la que aproximadamente el 80 % de los individuos afectados contienen una mutación de la línea germinal en gen de poliposis adenomatosa cólica (APC). Las mutaciones se pueden identificar también en otros componentes de la ruta Wnt incluyendo la auxina y la β -catenina. Los adenomas individuales son crecimientos clónicos de la célula epitelial que contiene un segundo alelo inactivado, y un gran número de adenomas de la FAP inevitablemente da como resultado el desarrollo de adenocarcinomas por medio de la adición de mutaciones en los oncogenes y/o genes supresores de tumores. Además, la activación de la ruta de señalización Wnt, incluyendo las mutaciones de ganancia de función en el APC y β -catenina, pueden inducir el desarrollo hiperplásico y el crecimiento tumoral en modelos de ratón (Oshima et al., *Cancer Res.* 57:1644-1649 (1997); Harada et al., *EMBO J.* 18:5931-5942 (1999)).

Se descubrió un papel para la señalización Wnt en primer lugar con la identificación del *Wnt1* (originalmente el *int1*) como un oncogén en tumores mamarios transformados por la inserción de un virus murino cercano (Nusse &

Varmus, *Cell* 31:99-109 (1982)). Se han acumulado pruebas adicionales para el papel de la señalización Wnt en el cáncer de mama. Por ejemplo, la sobre-expresión transgénica de β -catenina en las glándulas mamarias da como resultado hiperplasias y adenocarcinomas (Imbert et al., *J. Cell Biol.* 153:555-568 (2001); Michaelson & Leder, *Oncogene* 20:5093-5099 (2001)) mientras que la pérdida de señalización de Wnt altera el desarrollo normal de la glándula mamaria (Tepera et al., *J. Cell Sc.* 116:1137-1149 (2003); Hatsell et al., *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 8:145-158 (2003)). Más recientemente se ha demostrado que las células madre mamarias se activan con la señalización Wnt (Liu et al., *PNAS* 101:4158 (2004)). En el cáncer humano de mama, la acumulación de β -catenina implica la señalización Wnt activada en más del 50 % de los carcinomas, y aunque no se han identificado mutaciones específicas, se ha observado la regulación positiva de la expresión del receptor Frizzled (Brennan & Brown, *J. Mammary Gland Neoplasia* 9:119-131 (2004); Malovanovic et al., *Int. J. Oncol.* 25:1337-1342 (2004)).

FZD10, FZD8, FZD7, FZD4, y FZD5 son cinco de los diez receptores Wnt humanos identificados. En el embrión de ratón el Fzd10 se expresa con Wnt7 en el tubo neural, brotes de las extremidades y ducto Mulleriano (Nunnally & Parr, *Dev. Genes Evol.* 214:144-148 (2004)) y puede actuar como un receptor para Wnt-7a durante el desarrollo de los brotes de las extremidades (Kawakami et al., *Dev. Growth Differ.* 42:561-569 (2000)). El Fzd10 se co-expresa con Wnt-7b en los pulmones, y los estudios de transfección celular han demostrado que el co-receptor Fzd10/LRP5 activa la ruta de señalización Wnt canónica en respuesta al Wnt7b (Wang et al., *Mol. Cell Biol.* 25:5022-5030 (2005)). El ARNm FZD10 está regulado positivamente en numerosas líneas celulares del cáncer, incluyendo líneas celulares del cáncer de cuello de útero, gástrico, y glioblastoma, y en cánceres primarios incluyen aproximadamente el 40 % de los cánceres gástricos primarios, cánceres de colon, y sarcomas sinoviales (Saitoh et al., *Int. J. Oncol.* 20:117-120 (2002); Terasaki et al., *Int. J. Mol. Med.* 9:107-112 (2002); Nagayama et al., *Oncogene* 1-12 (2005)). El FZD8 está regulado positivamente en varias líneas celulares del cáncer humano, cánceres gástricos primarios, y carcinomas renales (Saitoh et al., *Int. J. Oncol.* 18:991-996 (2001); Kirikoshi et al., *Int. J. Oncol.* 19:111-115 (2001); Janssens et al., *Tumor Biol.* 25:161-171 (2004)). El FZD7 se expresa a lo largo del tracto intestinal y está regulado positivamente en uno de cada seis casos de cáncer gástrico primario (Kirikoshi et al., *Int. J. Oncol.* 19:111-115 (2001)). La expresión del ectodominio FZD7 en una línea celular de cáncer de colon inducía cambios morfológicos y disminuye el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto (Vincan et al., *Differentiation* 73:142-153 (2005)). El FZD5 tiene un papel esencial en la angiogénesis del saco de la yema y placentaria (Ishikawa et al., *Dev.* 128:25-33 (2001)) y está regulada positivamente en carcinomas renales en asociación con la señalización de Wnt/ β -catenina (Janssens et al., *Tumor Biology* 25:161-171 (2004)). El FZD4 se expresa altamente en las células epiteliales de las criptas y es uno de varios factores que presentan una expresión diferencial en tejido normal frente a neoplásico (Gregorieff et al., *Gastroenterology* 129:626-638 (2005)). La identificación de FZD4, 5, 7, 8, y 10 como marcadores de células madre del cáncer hace por lo tanto que estas proteínas sean dianas ideales para los agentes terapéuticos del cáncer.

35 Antagonistas del marcador de células madre del cáncer

En el contexto de la presente divulgación, un antagonista adecuado es un agente que puede tener uno o más de los siguientes efectos, por ejemplo: interfiere la expresión de un marcador de célula madre del cáncer, interfiere con la activación de una ruta de transducción de la señal de las células madre del cáncer, por ejemplo, inhibiendo estéricamente las interacciones entre un marcador de célula madre del cáncer y su ligando, receptor o co-receptores; o se une a un marcador de células madre del cáncer y desencadenan la muerte celular o inhiben la proliferación celular tumoral.

45 Los antagonistas contra un marcador de células madre del cáncer actúan extracelularmente para afectar o inhibir la función de un marcador de célula madre del cáncer.

El antagonista es un receptor proteico de células madre del cáncer soluble o un receptor proteico soluble. La unión extracelular de un antagonista contra un marcador de célula madre del cáncer puede inhibir la señalización de un marcador proteico de célula madre del cáncer inhibiendo la activación intrínseca (por ejemplo, la actividad quinasa) de un marcador de célula madre del cáncer y/o por inhibición estéricamente de la interacción, por ejemplo, de un marcador de célula madre del cáncer con su ligando, de un marcador de célula madre del cáncer con su receptor, de un marcador de célula madre con un co-receptor, o de un marcador de célula madre del cáncer con la matriz extracelular. Además, la unión extracelular de un antagonista contra un marcador de célula madre del cáncer puede regular negativamente la expresión en la superficie celular de un marcador de célula madre del cáncer tal como, por ejemplo, por internalización de un marcador proteico de célula madre del cáncer y/o disminuyendo el tráfico en la superficie celular de un marcador de célula madre del cáncer.

Los antagonistas de un marcador de célula madre del cáncer pueden desencadenar la muerte celular indirectamente inhibiendo la angiogénesis. La angiogénesis es el proceso por el que se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes y es un proceso fundamental necesario para el crecimiento normal, por ejemplo, durante el desarrollo embrionario, la curación de heridas y en respuesta a la ovulación. El crecimiento de un tumor sólido mayor de 1-2 mm² también requiere angiogénesis para aportar nutrientes y oxígeno sin los que las células tumorales mueren. Por lo tanto un antagonista de un marcador de célula madre del cáncer puede dirigirse a células vasculares que expresan el marcador de célula madre del cáncer incluyendo, por ejemplo, células endoteliales, células de músculo liso o componentes de la matriz extracelular necesarios para el ensamblaje vascular. Un antagonista de un

marcador de célula madre del cáncer puede inhibir la señalización del factor de crecimiento necesaria para el reclutamiento de células vasculares, ensamblaje, mantenimiento o supervivencia.

Polinucleótidos

5 También se describen en el presente documento polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos que comprenden las SEC ID N^{os} 1-9. Los polinucleótidos pueden ser en forma de ARN o en forma de ADN incluyendo el ADN al ADNc, ADN genómico, y ADN sintético. El ADN puede ser de cadena doble o de cadena sencilla, y si es el de cadena sencilla puede ser de cadena codificante o de cadena no codificante (antisentido). Por lo tanto, la expresión "polinucleótido que codifica un polipéptido" engloba un polinucleótido que incluye solo secuencias codificantes para el polipéptido así como un polinucleótido que incluye secuencias adicionales codificantes y/o no codificantes.

15 También se describen variantes de los polinucleótidos descritos anteriormente en el presente documento que codifican, por ejemplo, fragmentos, análogos o derivados. La variante de un polinucleótido puede ser una variante alélica de origen natural del polinucleótido o una variante del polinucleótido de origen no natural. Como se ha indicado anteriormente en el presente documento, el polinucleótido puede tener una secuencia codificante que es una variante alélica de origen natural de la secuencia codificante de un polipéptido desvelado. Como se conoce en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de una secuencia de polinucleótido que tiene una sustitución, eliminación o adición de uno o más nucleótidos, y que no altera sustancialmente la función del polipéptido codificado.

25 Se describen polinucleótidos en los que la secuencia codificante del polipéptido maduro se puede fusionar en la misma fase de lectura con un polinucleótido que ayuda, por ejemplo, en la expresión, secreción, estabilidad proteica de un polipéptido a partir de una célula huésped que incluye, por ejemplo, una secuencia directora que funciona como una secuencia secretora que controla el transporte de un polipéptido desde la célula. El polipéptido que tienen una secuencia directora es una preproteína y puede tener la secuencia directora escindida por la célula huésped para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar una proproteína que es la proteína madura más restos de aminoácidos 5' adicionales. Una proteína madura que tiene una prosequencia es una proproteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que se escinde la prosequencia permanece la proteína madura activa. Por lo tanto, por ejemplo, el polinucleótido puede codificar una proteína madura, o una proteína que tienen una prosequencia o una proteína que tienen ambas, una prosequencia y una presequencia (secuencia directora).

35 Los polinucleótidos pueden tener también una secuencia codificante fusionada en fase con una secuencia marcadora que permite la purificación del polipéptido de la presente invención. La secuencia marcadora puede ser un marcador hexa-histidina suministrada por el vector pQE-9 que se proporciona para la purificación del polipéptido fusionado al marcador en el caso de un huésped bacteriano, o, por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser un marcador hemaglutinina (HA) cuando se utiliza un huésped mamífero, por ejemplo, células COS-7. El marcador HA corresponde a un epitopo derivado de la proteína hemaglutinina de gripe (Wilson, I., et al., Cell 37:767 (1984)).

45 Las moléculas de ácido nucleico aislado puede comprender un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótido idéntica en al menos un 90 %, idéntica en un 95 %, y en algunas realizaciones, idéntica en al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a un nucleótido que codifica las secuencias desveladas.

Las variantes de polinucleótido pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, no codificantes, o ambas. Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones que producen sustituciones, adiciones, o eliminaciones silentes, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. Las variantes de nucleótidos pueden producirse por sustituciones silentes debido a la degeneración del código genético. Las variantes de polinucleótidos se pueden producir por varias razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de un codón para un huésped en particular (cambio en codones del ARNm humano por los preferidos por un huésped bacteriano tal como *E. coli*).

Polipéptidos del receptor soluble

55 Se describe en el presente documento polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales, o polipéptidos sintéticos que tienen la secuencia de las SEC ID N^{os} 1-9. Se reconocerá en la técnica que algunas secuencias de aminoácidos pueden variarse sin un efecto significativo en la estructura o función de una proteína. Si se contemplan tales diferencias de secuencia, se debería recordar que habrá áreas críticas en la proteína que determinan la actividad. Se describen en el presente documento variaciones de los polipéptidos que muestran una actividad sustancial o que incluyen regiones de proteína FZD tal como las partes de proteína que se exponen en el presente documento. Tales mutantes incluyen eliminaciones, inserciones, inversiones, repeticiones, y sustituciones de tipo. Como se indica posteriormente, las directrices concernientes a qué cambios de aminoácidos son probablemente silentes fenotípicamente, se pueden encontrar en Bowie, et al., Science 247:1306-1310 (1990).

65

Por lo tanto, los fragmentos, derivados, o análogos de los polipéptidos pueden ser: (i) en el que uno o más restos de aminoácidos se sustituyen con un resto de aminoácido conservado o no conservado y tal resto de aminoácido sustituido puede ser codificado o no por el código genético; o (ii) en el que uno o más de los restos de aminoácido incluyen un grupo sustituido; o (iii) en el que el polipéptido maduro se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol); o (iv) en el que los aminoácidos adicionales se fusionan al polipéptido maduro, tal como una secuencia directora o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación del polipéptido maduro o una secuencia de proproteína. Tales fragmentos, derivados, y análogos se consideran que están en el ámbito de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas del presente documento.

Son de interés particular las sustituciones de aminoácidos cargados con otro aminoácido cargado y con aminoácidos neutros o cargados negativamente. Los últimos dan como resultado proteínas con carga positiva reducida lo que mejora las características del receptor proteico soluble. La prevención de la agregación también es altamente deseable, ya que la agregación de las proteínas no solo da como resultado una falta de actividad sino que también es problemático cuando se preparan formulaciones farmacéuticas, debido a que pueden ser inmunogénicas. (Pinckard et al., Clin. Exp. Immunol. 2:331-340 (1967); Robbins et al., Diabetes 36:838-845 (1987); Cleland et al. Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377 (1993)).

Como se indica, los cambios son normalmente de una naturaleza menor, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos que no afectan significativamente el plegamiento o actividad de la proteína (véanse 1 y 2).

TABLA 1. Sustituciones conservadoras de aminoácidos

Aromáticos	fenilalanina Triptófano Tirosina
Hidrófobos	Leucina Isoleucina Valina
Polares	Glutamina Asparagina
Básicos	Arginina Lisina Histidina
Ácidos	Ácido Aspártico Ácido Glutámico
Pequeños	Alanina Serina Treonina Metionina Glicina

Tabla 2. Sustituciones de aminoácidos

Resto Original	Sustituciones	Sustituciones Ejemplares
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg

Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina
Leu (L)	Ile	norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Leu	Leu; Val; Ile; Ala
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr(T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina

Por supuesto, el número de sustituciones de aminoácidos que haría un experto en la técnica depende de muchos factores, que incluyen los que se han descrito anteriormente. En términos generales, el número de sustituciones para un polipéptido receptor soluble determinado no será más de 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5 o 3.

5

Se desvelan en el presente documento polipéptidos de las SEC ID N^{os} 1-9 así como polipéptidos que a veces tienen una similitud de al menos un 90 % con los polipéptidos de las SEC ID N^{os} 1-9, y a veces una similitud de al menos un 95 % con los polipéptidos de las SEC ID N^{os} 1-9, y a veces una similitud de al menos un 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % con los polipéptidos de las SEC ID N^{os} 1-9. Como se conoce en la técnica la "similitud" entre dos polipéptidos está determinada por la comparación de la secuencia de aminoácidos y sus sustituciones conservadoras de aminoácidos de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido.

10

Los fragmentos o partes de los polipéptidos se pueden emplear para producir el polipéptido de longitud completa correspondiente por síntesis peptídica; por lo tanto, los fragmentos se pueden emplear como que son intermedios en la producción del polipéptido de longitud completa. Los fragmentos o partes de los polinucleótidos se pueden utilizar para sintetizar polinucleótidos de longitud completa de la presente invención.

15

Un fragmento de las proteínas es una parte o toda la proteína que es capaz de unirse a un marcador proteico de célula madre del cáncer o pareja de unión de una proteína e célula madre del cáncer (por ejemplo, un receptor, co-receptor, ligando, o co-ligando). Este fragmento tiene una alta afinidad por un marcador proteico de célula madre del cáncer o la pareja de unión de una proteína de célula madre del cáncer (por ejemplo, un receptor, un co-receptor, un ligando, o co-ligando). Algunos fragmentos de proteínas de fusión son fragmentos de proteína que comprenden al menos parte de la parte extracelular de un marcador proteico de célula madre del cáncer o una pareja de unión de la proteína de células madre del cáncer unida a la menos parte de una región constante e inmunoglobulina. La afinidad puede estar en el intervalo de aproximadamente 10^{-11} a 10^{-12} M, aunque la afinidad puede variar considerablemente con fragmentos de diferentes tamaños, que varían entre 10^{-7} a 10^{-13} M. Un fragmento puede tener aproximadamente 10-255 aminoácidos de longitud y comprende un sitio de unión al ligando del marcador proteico de célula madre del cáncer unido a al menos parte de una región constante de una inmunoglobulina.

20

25

Los polipéptidos y análogos pueden modificarse más para contener restos químicos adicionales que nos parte normalmente de la proteína. Los restos derivados pueden mejorar la solubilidad, la semivida biológica o la absorción de la proteína. Los restos pueden reducir o eliminar también cualquier efecto secundario de las proteínas y similares. Una revisión de estos restos se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

30

Los restos químicos más adecuados para la derivación incluyen los polímeros solubles en agua. Un polímero soluble en agua es deseable debido a que la proteína a la que se une no precipita en un ambiente acuoso, tal como un ambiente fisiológico. En algunas realizaciones, el polímero será farmacéuticamente aceptable para la preparación de un producto o composición terapéutica. Un experto en la técnica será capaz de seleccionar el polímero deseado basándose en consideraciones tales como si el conjugado polímero/proteína se utilizará terapéuticamente, y si es así, la dosificación deseada, el tiempo de circulación, la resistencia a la proteólisis, y otras consideraciones. La eficacia de la derivación se puede verificarse administrando el derivado, en la forma deseada (es decir, por bomba osmótica, o por inyección o infusión, o, formulado además para vía oral, pulmonar u otras vías de suministro), y determinar su eficacia. Los polímeros solubles en agua adecuados incluyen, pero no se limitan a estos, el polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli 1,3 dioxolano, poli 1,3,6 trioxano, copolímero etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (o bien homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, co-polímeros de óxido de propileno/óxido de etileno, polioles polioxetilados (por ejemplo, el glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilización en agua.

35

40

45

50

El número de moléculas de polímero unidos de esta manera puede variar, y un experto en la técnica será capaz de verificar el efecto sobre la función. Se puede derivar, o se puede proporcionar un di, tri, tetra, o alguna combinación de derivación, con los mismos o diferentes restos químicos (por ejemplo, polímeros, tal como pesos diferentes de polietilenglicoles). La proporción de moléculas de polímero con respecto a moléculas de proteína (o péptido) variará, según sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la relación óptima (en términos de eficacia de reacción en que no haya un exceso de proteína o polímero que no reaccione) se determinará por factores tales como el grado deseado de derivación (por ejemplo, mono, di, tri, etc.), el peso molecular del polímero seleccionado, si el polímero está ramificado o no ramificado, y las condiciones de la reacción.

Las moléculas de polietilenglicol (u otros restos químicos) se deberían unir a la proteína considerando los efectos sobre los dominios funcionales o antigénicos de la proteína. Hay varios métodos de unión disponibles para los expertos en la técnica. Véase por ejemplo, el documento EP 0 401 384, (que acopla el PEG a G-CSF), véase también Malik et al., Exp. Hematol 20:1028-1035 (1992) (que comunica la pegilación de GM-CSF utilizando cloruro de tresilo). Por ejemplo, el polietilenglicol se puede unir covalentemente a los restos de aminoácidos por medio de un grupo reactivo, tales como, un grupo amino libre o un carboxilo. Los grupos reactivos son a los que se puede unir a una molécula de polietilenglicol. Los restos de aminoácidos que tienen un grupo amino libre pueden incluir los restos de lisina y el extremo N del resto de aminoácido. Los que tienen un grupo carboxilo pueden incluir los restos de ácido aspártico, restos de ácido glutámico, y el extremo C de un resto de aminoácido. Se pueden utilizar también los grupos sulfhidrilo como un grupo reactivo para que se una a una molécula(s) de polietilenglicol. Con fines terapéuticos, se puede llevar a cabo la unión a un grupo amino, tal como una unión al extremo N o un grupo lisina. Se debería evitar la unión a restos importantes para la unión del receptor si se desea la unión del receptor.

Se puede desear específicamente una proteína modificada químicamente en el extremo amino. Utilizando el polietilenglicol como ilustración de las presentes composiciones, se puede seleccionar de entre varias moléculas de polietilenglicol (por peso molecular, ramificación, etc.), la proporción de moléculas de polietilenglicol con respecto a moléculas de proteína (o péptido) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de pegilación que se lleva a cabo, y el método de obtención de la proteína pegilada en el extremo N. El método para la obtención de la preparación pegilada en el extremo N (es decir, la separación de este resto de otros restos monopegilados se es necesario) puede ser por purificación del material pegilado en el extremo N de una población de moléculas de proteína pegiladas. La modificación química del extremo N selectiva se puede conseguir por alquilación reductora que explota la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina frente a extremo N) que están disponibles para la derivación en una proteína en particular. Bajo las condiciones de reacción apropiadas, se consigue una derivación sustancialmente selectiva de la proteína en el extremo N con un grupo carbonilo contenido en el polímero. Por ejemplo, se puede pegar selectivamente un extremo N de la proteína llevando a cabo la reacción a un pH que permita que aventaje las diferencias de la pKa entre el grupo épsilon amino de los restos de lisina y los del grupo alfa amino del extremo N del resto de la proteína. Por tal derivación selectiva, se controla la unión de un polímero soluble en agua a una proteína: la conjugación con el polímero tienen lugar predominantemente en el extremo N de la proteína y no se produce una modificación significativa de otros grupos reactivos, tales como los grupos amino de la cadena lateral de la lisina. Utilizando la alquilación reductora, el polímero soluble en agua puede ser del tipo descrito anteriormente, y debería tener un único aldehído reactivo para el acoplamiento a la proteína. Se puede utilizar el propionaldehído de polietilenglicol, que contiene un único aldehído reactivo.

Se puede llevar a cabo la pegilación por cualquiera de las reacciones de pegilación que se conocen en la técnica. Véase por ejemplo: Focus on Growth Factors, 3(2): 4-10 (1992); EP 0 154 316,

Documento EP 0 401 384, y otras publicaciones citadas en el presente documento que se refieren a la pegilación. La pegilación se puede llevar a cabo por medio de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva (o un análogo de polímero soluble en agua reactivo).

Por lo tanto, se contempla que los receptores polipeptídicos solubles que se van a utilizar de acuerdo con la presente invención pueden incluir receptores proteicos solubles pegilados o variantes, en los que se unen grupo PEG por medio de grupos acilo o alquilo. Tales productos pueden ser monopegilados o polipegilados (por ejemplo que contienen 2 6, y normalmente 2 5 grupos PEG). Los grupos PEG generalmente se unen a la proteína en los grupos amino α o ϵ de los aminoácidos, pero también se contempla que los grupos PEG se podrían unir a cualquier grupo amino unido a la proteína, que sea lo suficientemente reactivo para unirse a un grupo PEG bajo condiciones e reacción adecuadas.

Las moléculas de polímero que se utilizan tanto en las estrategias de acilación y alquilación se pueden seleccionar de entre los polímeros solubles en agua como se ha descrito anteriormente. El polímero seleccionado debería modificarse para tener un grupo reactivo único, tal como un éster activo para la acilación o un aldehído para la alquilación, de manera que el grado de polimerización se controle como se proporciona en los presentes métodos. Una aldehído PEG reactivo ejemplar es el propionaldehído de polietilenglicol, que es estable en agua, o los derivados mono C1-C10 alcoxi o ariloxi del mismo (véase, la Pat de EE. UU. N° 5.252.714). El polímero puede estar ramificado o no ramificado. Para las reacciones de acilación, el polímero(s) seleccionado debería tener un único grupo éster reactivo. Para la alquilación reductora presente, el polímero(s) seleccionado debería tener un único

grupo aldehído reactivo. En general, el polímero soluble en agua no se seleccionará de estos glucosilo de origen natural aunque estos se producen habitualmente más convenientemente por los sistemas de expresión recombinante en mamíferos. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. Un polímero soluble en agua para su uso en el presente documento es el polietilenglicol. Como se utiliza en el presente documento, polietilenglicol significa que se engloba cualquiera de las formas de PEG que se haya utilizado para derivar otras proteínas, tal como mono (C1-C10) alcoxi o ariloxi-polietilenglicol.

Otros parámetros de la reacción, tales como el disolvente, los tiempos de reacción, temperaturas, etc., y los medios de purificación de los productos, se pueden determinar caso por caso basándose en la información publicada en relación a la derivación de proteínas con polímeros solubles en agua (véase las publicaciones citadas en el presente documento).

Los polipéptidos aislados descritos en el presente documento se pueden producir por cualquier método adecuado que se conocen en la técnica. Tales métodos varían desde los métodos sintéticos de proteínas a la construcción de una secuencia de ADN que codifica las secuencias de polipéptidos aisladas y que expresan estas secuencias en un huésped transformado que sea adecuado. Por ejemplo, se puede obtener el ADNc por exploración en una biblioteca de ADNc con un fragmento de ADN marcado que codifica el polipéptido de la SEC ID N^o 1 e identificando los clones positivos por autorradiografía. Se realizan más rondas de purificación e hibridación en placas utilizando los métodos convencionales.

En algunas realizaciones de un método recombinante, se construye una secuencia de ADN aislando o sintetizando una secuencia de ADN que codifica una proteína de tipo silvestre de interés. Opcionalmente, la secuencia se puede mutar por mutagénesis específica del sitio para proporcionar análogos funcionales del mismo. Véase, por ejemplo, Zoeller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5662-5066 (1984) y la Pat de EE. UU. N^o 4.588.585. Otro método para construir una secuencia de ADN que codifique un polipéptido de interés sería por síntesis química utilizando un sintetizador de oligonucleótidos. Tales oligonucleótidos se pueden diseñar basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionando los codones que se favorecen en la célula huésped en el que se producirá el polipéptido recombinante de interés.

Se pueden aplicar métodos de referencia para sintetizar una secuencia de polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, se puede utilizar una secuencia de aminoácidos completa para construir un gen retro-traducido. Además, se puede sintetizar un oligómero de ADN que codifique un polipéptido aislado particular. Por ejemplo, se pueden sintetizar varios oligonucleótidos pequeños que codifiquen partes del polipéptido deseado y luego unirlos. Los oligonucleótidos individuales contienen protuberancias 5' o 3' para el ensamblaje complementario.

Una vez ensamblados (por síntesis, mutagénesis dirigida al sitio u otro método), las secuencias de ADN mutantes que codifican un particular polipéptido aislado de interés se insertarán en un vector de expresión y se unirá operativamente a una secuencia de control de la expresión adecuada para la expresión de la proteína en un huésped deseado. El ensamblaje apropiado se puede confirmar por secuenciación del nucleótido, mapeo de restricción, y expresión de un polipéptido biológicamente activo en un huésped adecuado. Como se conoce bien en la técnica, con el fin de obtener altos niveles de expresión de un gen transfectedos en un huésped, el gen debe estar unido operativamente a secuencias de control de la expresión transcripcionales y traduccionales que sean funcionales en el huésped de expresión que se ha elegido.

Los vectores de expresión recombinante se pueden utilizar para amplificar y expresar el ADN que codifica fusiones de marcadores polipeptídicos de célula madre del cáncer. Los vectores de expresión recombinante son construcciones de ADN replicables que tienen fragmentos sintéticos o derivados de ADNc que codifican una fusión de marcador polipeptídico de células madre del cáncer o un análogo bioequivalente unido operativamente a elementos reguladores transcripcionales y traduccionales adecuados derivados de genes de mamíferos, microbios, virus o insectos. Una unidad transcripcional comprende en general un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión genética, por ejemplo promotores o amplificadores transcripcionales, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína, y (3) una secuencia de inicio y terminación de la transcripción y traducción adecuada, como se describe en detalle posteriormente. Tales elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. La capacidad para replicarse en un huésped, habitualmente conferida por un origen de replicación y un gen de elección para facilitar el reconocimiento de transformantes se puede incorporar adicionalmente. Las regiones de ADN están unidas operativamente cuando están relacionadas funcionalmente entre ellas. Por ejemplo, el ADN de un péptido de señal (director secretor) está unido operativamente al ADN de un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si se posiciona de forma que permite le traducción. En general, unido operativamente significa que es contiguo y, en el caso de directores secretores, significa contiguo y en fase de lectura. Los elementos estructurales que se pretende utilizar en sistemas de expresión en levaduras pueden incluir una secuencia directora que permite la secreción extracelular de una proteína traducida por una células huésped. De manera alternativa, cuando la proteína recombinante se expresa sin una secuencia directora o de transporte, puede

incluir un resto metionina en el extremo N. Este resto opcionalmente puede escindir-se posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

5 La elección de la secuencia de control de la expresión y el vector de expresión dependerá de la elección del huésped. Se puede emplear varias combinaciones huésped/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para huéspedes eucariotas, incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de la expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *Escherichia coli*, incluyendo pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de un intervalos más amplio, tales como M13 y fagos filamentosos de ADN de cadena sencilla.

15 Las células huésped adecuadas para la expresión de un marcador proteico de células madre del cáncer incluyen células procariotas, levaduras, de insecto, o células eucariotas mayores bajo el control de promotores adecuados. Las procariotas incluyen organismos gram positivos y gram negativos, por ejemplo, *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas mayores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero como se describe posteriormente. Los sistemas de traducción libres de células también se pueden emplear. Los vectores de clonación y expresión apropiados para su uso en huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levaduras, y mamíferos se describen por Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y. (1985).

20 También se emplean ventajosamente varios sistemas de cultivo de células de mamífero o de insecto para expresar una proteína recombinante. La expresión de proteínas recombinantes en las células de mamífero se puede llevar a cabo debido a que tales proteínas generalmente están correctamente plegadas, apropiadamente modificadas y completamente funcionales. Ejemplos de líneas celulares huéspedes de mamífero incluyen las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman, Cell 23:175 (1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector adecuado que incluye por ejemplo líneas celulares de células L, C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), HeLa y BHK. Los vectores de expresión en mamíferos pueden comprender elementos no transcritos tal como un origen de replicación, un promotor y amplificador adecuado unidos al gen que se va a expresar, y otras secuencias flanqueantes 5' o 3' no transcritas, y secuencias no traducidas 5' o 3', tal como las necesarias para los sitios de unión al ribosoma, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y receptores de cortes y empalmes, y secuencias de terminación de la transcripción. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto se ha revisado por Luckow y Summers, Bio/Technology 6:47 (1988).

35 Las proteínas producidas por un huésped transformado se pueden purificar de acuerdo con cualquier método adecuado. Tales métodos de referencia incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía en columna de intercambio iónico, afinidad y por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica de referencia de purificación proteica. Los marcadores de afinidad tal como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de envoltura de influenza y glutatión-S-transferasa se puede unir a la proteína para permitir una fácil purificación por el paso a lo largo de una columna de afinidad apropiada. Las proteínas aisladas se pueden caracterizar también utilizando tales técnicas como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos x.

45 Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas que segregan proteínas recombinantes en medios de cultivo se pueden concentrar en primer lugar utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. De manera alternativa, se puede utilizar una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tienen grupos dietilaminoetil (DEAE) pendulares. Las matrices pueden ser de acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos que se emplean comúnmente en la purificación de proteínas. De manera alternativa, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos incluyen varias matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropil o carboximetil.

50 Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de cromatografía líquida de altas prestaciones de fase inversa (RP-HPLC) que emplean medios RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tienen grupos metilo u otros grupos alifáticos pendulares, para purificar más una composición de proteína de célula madre del cáncer-Fc. Algunos o todas las etapas de purificación anteriores, en varias combinaciones, también se pueden emplear para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

55 La proteína recombinante producida en un cultivo bacteriano habitualmente se aísla por extracción inicial a partir de los aglomerados celulares seguido por una o más etapas de concentración, extracción en sal, cromatografía acuosa de intercambio iónico o exclusión por tamaño. Se puede emplear cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC) para las etapas finales de purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante se pueden destruir por cualquier método conveniente, incluyendo los ciclos de congelación-descongelación, sonicación, destrucción mecánica, o el uso de agentes lisantes celulares.

Inhibición el crecimiento celular tumoral

65 También se describen en el presente documento, métodos para inhibir el crecimiento de las células tumorigénicas que expresan un marcador de células madre del cáncer utilizando los antagonistas de un marcador de células madre

del cáncer descrito en el presente documento. El método para inhibir el crecimiento de células tumorigénicas que expresan un marcador de células madre del cáncer puede comprender poner en contacto la célula con un antagonista contra un marcador de células madre del cáncer *in vitro*. Por ejemplo, una línea celular inmortalizada o una línea celular del cáncer que expresa un marcador de células madre del cáncer se cultiva en un medio al que se

5 añade un antagonista del marcador de células madre del cáncer que se expresa para inhibir el crecimiento celular. De manera alternativa, las células tumorales y/o células madre tumorales se aíslan a partir de una muestra de un paciente tal como, por ejemplo, un tejido de biopsia, un derrame pleural, o muestra de sangre y se cultiva en un medio al que se añade un antagonista de marcador de células madre del cáncer para inhibir el crecimiento celular. El antagonista puede ser una fusión de un marcador proteico de células madre del cáncer que se une

10 específicamente a un marcador proteico de células madre del cáncer o una proteína de unión al marcador de células madre del cáncer (por ejemplo, un receptor, co-receptor, ligando, o co-ligando). Por ejemplo, una fusión de marcador proteico de células madre del cáncer purificada se añade al medio de cultivo de células madre del cáncer aisladas para inhibir el crecimiento celular.

15 Un método para inhibir el crecimiento de células tumorigénicas que expresan el marcador de células madre del cáncer puede comprender poner en contacto la célula con un antagonista contra un marcador de células madre del cáncer *in vivo*. Poner en contacto una célula tumorigénica con un antagonista contra un marcador de células madre del cáncer puede llevarse a cabo en un modelo animal. Por ejemplo, se cultiva un xenoinjerto que expresa un marcador de células madre del cáncer en ratones inmunocomprometidos (por ejemplo, ratones NOD/SCID) a los

20 que se administra un antagonista contra el marcador de células madre del cáncer para inhibir el crecimiento tumoral. De manera alternativa se aíslan células madre del cáncer que expresan un marcador de células madre del cáncer a partir de una muestra de un paciente tal como, por ejemplo, un tejido de biopsia, un derrame pleural, o muestra de sangre y se inyectan en ratones inmunocomprometidos a los que luego se les administra una antagonista contra el marcador de células madre del cáncer para inhibir el crecimiento celular. El antagonista de un marcador de células

25 madre del cáncer se puede administrar al mismo tiempo o poco después de la introducción de las células tumorigénicas en el animal para evitar el crecimiento tumoral. El antagonista de un marcador de células madre del cáncer se puede administrar como un agente terapéutico después de que las células tumorigénicas hayan crecido hasta un tamaño especificado. El antagonista puede ser una fusión de marcador proteico de células madre del cáncer que se une específicamente a un marcador proteico de células madre del cáncer o proteína de unión al

30 marcador de células madre del cáncer (por ejemplo, receptor, co-receptor, ligando, co-ligando). Poner en contacto una célula tumorigénica con un antagonista contra una célula madre se puede llevar a cabo en un paciente humano diagnosticado de cáncer.

35 Composiciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas que comprenden antagonistas que se dirigen a un marcador de células madre del cáncer son útiles para la inhibición del crecimiento celular tumoral y el tratamiento del cáncer en pacientes humanos.

40 Las formulaciones se preparan para su almacenamiento y uso combinando un antagonista purificado (por ejemplo, un anticuerpo) de la presente invención con un vehículo excipiente y/o estabilizante farmacéuticamente aceptable como un polvo liofilizado, solución acuosa, etc. (Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, Mack Publishing (2000)). Los vehículos, excipientes, o estabilizantes adecuados comprenden tampones no tóxicos tales como de fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como el cloruro sódico; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (por ejemplo, cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol, resorcinol, ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (tales como de menos de aproximadamente 10 restos de aminoácido); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; carbohidratos tales como monosacáridos,

45 disacáridos, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como el EDTA; azúcares tales como la sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra iones formadores de sales tales como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína-Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN o polietilenglicol (PEG).

50 La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por cualquiera de las vías para el tratamiento local o sistémico. La administración puede ser tópica (tal como en membranas mucosas que incluyen el suministro vaginal y rectal) tal como los parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos y polvos; pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador, intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica); oral; o administración parenteral que incluye la inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o

55 intracraneal (por ejemplo, intratecal o intraventricular).

60 La formulación terapéutica puede ser en forma de unidad de dosificación. Tales formulaciones incluyen comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones en agua o medios no acuosos, o supositorios para la administración oral, parenteral, o rectal o por administración por inhalación. En las composiciones sólidas tales como comprimidos el principio activo principal se mezcla con un vehículo farmacéutico. Los ingredientes convencionales de comprimidos incluyen almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido

esteárico, estearato magnésico, fosfato dicálcico o gomas, y otros diluyentes (por ejemplo, agua) para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La composición de preformulación sólida se subdivide entonces en formas de dosificación unitaria del tipo que se ha descrito anteriormente. Los comprimidos, píldoras, etc. de la nueva composición se pueden revestir o componer de otra manera para proporcionar una forma de dosificación que permita la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender una composición interna recubierta por una componente externo. Además, los dos componentes se pueden separar por una capa entérica que sirva para resistir la desintegración y permita que el componente interno pase intacto a través del estómago o para que la liberación se retrase. Se puede utilizar varios materiales para tales capas o revestimientos entéricos, incluyendo tales materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como shellac, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen antagonistas de la presente invención formando complejos con liposomas (Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); Pat. de EE. UU. N^{os} 4.485.045 y 4.544.545). Los liposomas con aumento del tiempo en la circulación se desvelan en la Pat. de EE. UU. N^o 5.013.556. Los liposomas se pueden generar por evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros con un tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

El antagonista también se puede atrapar en microcápsulas. Tales microcápsulas se preparan, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microsferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones como se describe en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed. Mack Publishing (2000).

Además se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos moldeados (por ejemplo, películas o microcápsulas). Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles tales como poli (2-hidroxietil-metacrilato) o poli (alcohol vinílico), poliláctidos (Pat. de EE. UU. N^o 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7-etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT TM (microsferas inyectables compuestas de copolímero ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), isobutirato de acetato de sacarosa, y ácido poli-D-(-)-3 hidroxibutírico.

Tratamiento con antagonistas

Está previsto que los antagonistas de la presente invención se puedan utilizar para tratar varias afecciones que se caracterizan por la expresión y/o el aumento de respuesta de las células a un marcador de células madre del cáncer. Particularmente se prevé que los antagonistas (por ejemplo, anticuerpos) contra un marcador de células madre del cáncer se utilizará para tratar trastornos proliferativos que incluyen pero no se limitan a tumores benignos y malignos del riñón, hígado, vejiga, mama, estómago, ovario, colon, recto, próstata, pulmón, vulva, tiroides, cabeza y cuello, cerebro (glioblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, etc.), sangre y sistema linfático (leucemias y linfomas).

Los antagonistas se administran como una composición farmacéutica apropiada a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos. Los métodos de administración adecuados incluyen la administración intravenosa en embolada o por infusión continua durante un periodo de tiempo que incluye, pero no se limita a las vías intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o inhalatoria.

En ciertas realizaciones, el tratamiento implica la administración combinada de un antagonista de la presente invención y un agente quimioterápico o cóctel de múltiples agentes quimioterápicos distintos. El tratamiento con antagonista puede producirse antes de, concurrentemente con, o posteriormente a la administración de quimioterapia. Los quimioterápicos contemplados por la invención incluyen sustancias químicas o fármacos que se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente, tales como Doxorubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxol, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina y carboplatino. La administración combinada puede incluir la coadministración, o bien en una formulación farmacéutica única o utilizando formulaciones separadas, o la administración consecutiva en cualquier orden pero preferentemente en un periodo de tiempo tal que todos los principios activos puedan ejercer sus actividades biológicas simultáneamente. La preparación y programaciones de dosificación para tales agentes quimioterápicos se pueden utilizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como está determinado empíricamente por el facultativo especialista. La preparación y las programaciones de dosificación para tal quimioterapia también se describe en Chemotherapy Service, M.C. Perry, ed., Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

En ciertas realizaciones, el tratamiento implica la administración combinada de un antagonista de la presente invención y la radioterapia. El tratamiento con un antagonista se puede producir antes de, concurrentemente con, o posteriormente a la administración de la radioterapia. Cualquiera de las programaciones de dosificación para tal radioterapia se puede utilizar como se determine por un facultativo especialista.

5 En ciertas realizaciones, el tratamiento puede implicar la administración combinada de antagonistas de la presente invención con anticuerpos contra antígenos asociados a tumores adicionales que incluyen pero no se limitan a, anticuerpos que se unen al EGFR, HER2, y VEGF. Además, el tratamiento puede incluir la administración de una o más citoquinas, se puede acompañar por la retirada quirúrgica de las células cancerosas o cualquier otra terapia que se considere necesaria por un médico encargado del tratamiento.

15 Para el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un antagonista de la presente invención depende del tipo de enfermedad que se va a tratar, la gravedad y curso de la enfermedad, la respuesta de la enfermedad, si el antagonista se administra con fines terapéuticos o preventivos, las terapias previas, la historia clínica del paciente, y sobre todo a la discreción del médico encargado del tratamiento. El antagonista se puede administrar una vez o en una serie de tratamientos que duran desde unos días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se consiga una disminución del estado de enfermedad (por ejemplo, la reducción del tamaño del tumor). Las programaciones de dosificación óptima se pueden calcular a partir de mediciones de la acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente y variará dependiendo de la potencia relativa de un antagonista individual. El médico que lo administra puede determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición. En general, la dosificación es desde 0,01 µg a 100 mg por kg de peso corporal, y se puede dar una o más veces diariamente, semanalmente, mensualmente, o anualmente. El médico encargado del tratamiento puede estimar las tasas de repetición para la dosificación basándose en los tiempos de residencia y las concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales que se midan.

25 Kits

Se pueden utilizar kits para llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento. Un kit puede comprender un receptor soluble de marcador de células madre del cáncer purificado en uno o más envases. Los kits pueden contener todos los componentes necesarios y/o suficientes para llevar a cabo un ensayo de detección, incluyendo todos los controles, instrucciones para llevar a cabo los ensayos, y cualquier software necesario para el análisis y presentación de los resultados.

35 Se describe un kit compartimentado en el que los reactivos están contenidos en envase separados. Tales envases permiten que se transfieran eficazmente los reactivos de un compartimento a otro compartimento tal que las muestras y los reactivos no tengan contaminación cruzada, y los agentes o soluciones de cada envase se puedan añadir de manera cuantitativa de un compartimento a otro. Tales envases incluirán un envase que aceptará la muestra de ensayo, un envase que contiene el receptor soluble que se utiliza en los métodos, envases que contienen reactivos de lavado (tales como solución salina fosfato tamponada, tampones Tris, etc.), y envases que contienen los reactivos que se utilizan para detectar el anticuerpo unido o la sonda. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos desvelados se pueden fácilmente incorporar en uno de los formatos de kit establecidos que se conocen bien en la técnica.

45 Ejemplos

Ejemplo 1

Producción de receptores proteicos FZD Fc solubles y determinación de la semivida *in vivo*

50 Las versiones solubles del dominio extracelular del extremo N (ECD) de los receptores FZD se unen a los ligando Wnt y actúan como antagonistas de la ruta de señalización Wnt (He et al., (1997) Science 275:1652-54; Tanaka et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95:10164-69; Holmen et al., (2002) JBC 277:34727-35; Vincan et al., (2005) Differentiation 73:142-53). Los receptores FZD solubles se generaron uniendo 1) el ECD o 2) el dominio Fri de FZD10, FZD7, FZD5, FZD4, o FZD8 en fase con el Fc de IgG1 humana aislado a partir de una biblioteca de células B humanas (SEC ID Nº 4) en un vector para la expresión en células de insecto y células HEK 293. Se utilizó tecnología de ADN recombinante de referencia para aislar los polinucleótidos que codifican los ECD del receptor FZD que incluyen: los aminoácidos a partir de aproximadamente el 21 al 227 de FZD10 (FZD10 ECD.Fc); los aminoácidos a partir de aproximadamente el 32 al 255 de FZD7 (FZD7 ECD.Fc); los aminoácidos a partir de aproximadamente el 27 al 233 de FZD5 (FZD5 ECD. Fc); los aminoácidos a partir de aproximadamente el 37 al 224 de FZD4 (FZD4 ECD.Fc) así como los dominios Fri del receptor FZD que incluyen: los aminoácidos desde aproximadamente el 21 al 154 de FZD10 (FZD10 Fri.Fc); los aminoácidos desde aproximadamente el 32 al 171 de FZD7 (FZD7 Fri.Fc); los aminoácidos desde aproximadamente el 27 al 157 de FZD5 (FZD7 Fri.Fc); los aminoácidos desde aproximadamente el 37 al 170 de FZD4 (FZD4 Fri.Fc); y los aminoácidos desde aproximadamente el 28 al 158 de FZD8 (FZD8 Fri.Fc). Los receptores proteicos solubles se purificaron sobre una columna de Proteína A.

65

Para determinar la semivida de los receptores FZD solubles, se llevaron a cabo experimentos *in vivo*. Específicamente, se administraron i.p 200 ug de FZD4 Fri.Fc, FZD8 Fri.Fc, FZD5 Fri.Fc, y FZD5 ECD.Fc purificados a ratones (n = 3) y se obtuvieron muestras de sangre en los puntos de tiempo indicados (Fig. 1). Las proteínas del suero retenidas en perlas de agarosa Proteína A se separaron en un gel SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, y se sondaron con HRP conjugado con anti-fragmento Fc de IgG humana de cabra para detectar las proteínas de fusión hFc. Las proteínas FZD4 Fri.Fc, FZD5 Fri.Fc, y FZD8 Fri.Fc están todas presentes en el suero sanguíneo 72 horas después de la inyección y FZD5 Fri.Fc y FZD8 Fri.Fc estaban presentes en el suero sanguíneo 96 horas después de la inyección (Fig. 1). Por el contrario, FZD5 ECD.Fc no se detecta tras 24 horas (Fig. 1).

Ejemplo 2

Ensayos *in vitro* para evaluar el receptor proteico FZD Fc soluble

Este ejemplo describe métodos para los ensayos *in vitro* para ensayar la actividad del receptor FZD Fc sobre la proliferación celular y activación de la ruta.

Ensayo de proliferación

Se cuantificó la expresión de un receptor FZD por diferentes líneas celulares de cáncer utilizando el análisis de Taqman. Las líneas celulares identificadas como que expresan un receptor FZD se colocaron en placas con una densidad de 10^4 células por pocillo en microplacas de cultivo tisular de 96 pocillos y se permitió que se difundieran durante 24 horas. Posteriormente las células se cultivaron otras 12 horas adicionales en DMEM recién preparado con un 2 % de FCS, momento en el que se añadió un receptor proteico FZD Fc frente a proteína de control al medio de cultivo en presencia de 10 $\mu\text{mol/l}$ de BrdU. Tras el marcado con BrdU, se retiró el cultivo, y se fijaron las células a temperatura ambiente durante 30 minutos en etanol y se dejaron reaccionar durante 90 min con anticuerpo monoclonal anti-BrdU conjugado con peroxidasa (Clon BMG 6H8, fragmentos Fab). Es sustrato se desarrolló en una solución que contenía tetrametilbenzidina y se detuvo tras 15 min con 25 μl de H_2SO_4 1 mol/l. El color de la reacción se midió con un lector de placas ELISA automático utilizando un filtro de 450 nm ((UV Microplate Reader; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Se determinó la capacidad de receptor proteico FZD Fc soluble para inhibir la proliferación celular comparada.

Ensayo de la activación de la ruta

La capacidad del receptor proteico FZD Fc soluble para bloquear la activación de la ruta de señalización Wnt se determinó *in vitro*. En una realización, se co-transfectaron células HEK 293 cultivadas en DMEM suplementado con antibióticos y un 10 % de FCS con 1) vectores de expresión Wnt7B y FZD10 para activar la ruta de señalización Wnt; 2) un TCF/Luc de tipo silvestre o un vector indicador mutante que contenía tres copias del dominio de unión a TCF corriente arriba de un gen indicador de luciferasa de luciérnaga para medir los niveles de señalización Wnt (Gazit et al., 1999, Oncogene 18:5959-66); y 3) un indicador de luciferasa de Renilla (Promega; Madison, WI) como control interno de la eficacia de la transfección. La proteína FZD Fc se añadió entonces al medio de cultivo celular. Cuarenta y ocho horas tras la transfección, se midieron los niveles de luciferasa utilizando un kit de ensayo de luciferasa dual (Promega; Madison, WI) con actividad de luciferasa de luciérnaga normalizada a la actividad de luciferasa de Renilla. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes por triplicado. La capacidad de la proteína FZD10 Fc para inhibir la activación de la ruta Wnt se determinó de esta manera.

En algunas realizaciones, se incubaron cantidades crecientes de proteínas de fusión FZD Fc con células L en presencia o ausencia del ligando Wnt3a y se determinó la estabilización de la β -catenina inducida por el Wnt3a por inmunotransferencia. Solamente se detectaba β -catenina en presencia de Wnt3a, y esta estabilización se bloqueaba por las cantidades crecientes de receptores proteicos FZD5 ECD.Fc, FZD8 Fri.Fc y FZD4 Fri.Fc solubles (Fig. 2) demostrando que los receptores proteicos FZD Fc solubles antagonizan la ruta de señalización Wnt activada por el ligando Wnt3a.

Se determinó entonces la capacidad de las proteínas de fusión FZD Fc para antagonizar la señalización por diferentes ligando Wnt. Se incubaron células HEK 293 transfectadas establemente con indicador 8xTCF-luciferasa con cantidades crecientes de receptores FZD Fri.Fc solubles en presencia de diferentes ligandos Wnt que incluían Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a y Wnt7b. Las proteínas de fusión FZD4 Fri.Fc, FZD5 Fri.Fc y FZD8 Fri.Fc inhibían la señalización Wnt mediada por los cinco ligandos Wnt (Fig. 3).

Ejemplo 3

Prevención *in vivo* del crecimiento tumoral utilizando el receptor proteico FZD Fc soluble

Este ejemplo describe el uso de un receptor FZD Fc soluble para prevenir el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto.

Las células tumorales de una muestra de un paciente (biopsia de tumor sólido o derrame pleural) que se habían pasado como un xenoinjerto a ratones se prepararon para re-pasarlo en animales experimentales como se ha descrito en detalle anteriormente. Las células tumorales disociadas (< 10.000 células por animal; n = 10) se inyectaron entonces por vía subcutánea en la almohadilla grasa mamaria de ratones NOD/SCID para obtener el crecimiento tumoral.

En ciertas realizaciones, las células tumorales disociadas se clasificaron primero en células tumorigénicas y no tumorigénicas en base a los marcadores de superficie celular antes de la inyección en los animales de experimentación. Específicamente, las células tumorales disociadas como se ha descrito anteriormente se lavaron dos veces con solución salina Hepes tamponada (HBSS) que contenía un 2 % de suero bovino inactivado por calor (HICS) y se resuspendieron a 10^6 células por 100 μ l. Se añadieron los anticuerpos y se incubaron las células durante 20 min en hielo seguido por dos lavados con HBSS/2 % HICS. Los anticuerpos incluyen anti-ESA (Biomed, Foster City, CA), anti-CD44, anti-CD24, y el linaje de marcadores anti-CD2, -CD3, -CD10, -CD16, -CD18, -CD31, -CD64, y -CD140b (que se denominan colectivamente Lin; PharMingen, San Jose, CA). Los anticuerpos se conjugan directamente a fluorocromos para seleccionar positiva y negativamente las células que expresaban estos marcadores. Las células de ratón se eliminaron seleccionando contra células H2Kd+, y se eliminaron las células muertas utilizando el colorante 7AAD de viabilidad. SE llevó a cabo una citometría de flujo en un FACSVantage (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Se utilizaron los perfiles de dispersión lateral y dispersión directa para eliminar los grumos celulares. Las células tumorigénicas Lin ESA+, CD44+, CD24-/bajo aisladas se inyectaron entonces en ratones NOD/SCID por vía subcutánea en las almohadillas grasas mamarias para tumores de mama o en el flanco para tumores no de mama para obtener el crecimiento tumoral.

En ciertas realizaciones, dos días después de la inyección de células tumorales, los animales se trataron con receptor soluble FZD7 ECD.Fc, receptor soluble FZD10 ECD.Fc, o receptor soluble FZD5 ECD.Fc. Cada animal inyectado con el ensayo recibió 10 mg/kg de proteína FZD4 ECD.Fc, FZD5 ECD.Fc o FZD10 ECD.Fc por vía intraperitoneal (i.p.) 2-3x por semana durante un total de 4 semanas. Los animales inyectados con el control se inyectaron 2x por semana durante un total de 4 semanas. Se evaluó el tamaño del tumor los días 21, 24, 28, y 30. El tratamiento con FZD10 ECD.Fc y FZD7 ECD.Fc solubles reducían el volumen tumoral total en comparación con los animales tratados con el control (Fig. 4). La reducción el volumen tumoral por el FZD7 ECD.Fc era estadísticamente significativa el día 28 y el día 30 (Fig. 4).

A continuación se evaluó el efecto del tratamiento con el receptor FZD Fc soluble sobre la presencia de células madre del cáncer en un tumor. Las muestras tumorales de ratones tratados con FZD Fc frente al control se cortaron en trozos pequeños, se picó completamente utilizando cuchillas estériles, y se obtuvieron suspensiones celulares únicas por digestión enzimática y destrucción mecánica. Las células tumorales disociadas se analizaron entonces por análisis FACS en cuanto a la presencia de células madre del cáncer basándose en la expresión de marcadores celulares de superficie Lin ESA+, CD44+, CD24-/bajo, como se ha descrito anteriormente.

Se evaluó entonces la tumorigenicidad de las células aisladas basándose en la expresión del Lin ESA+, CD44+, CD24-/bajo, tras el tratamiento con FZD Fc. Se re-inyectaron por vía subcutánea 5.000, 1.000, 500 y 100 células madre del cáncer del Lin ESA+, CD44+, CD24-/bajo aisladas de los ratones tratados con FZD Fc frente a los ratones tratados con el control en la almohadilla grasa mamaria de ratones NOD/SCID. La tumorigenicidad de las células madre del cáncer basándose en el número de células inyectadas necesarias para la formación constante de tumores se determinó de esta manera.

En ciertas realizaciones, se inyectaron hembras de ratones doble knockout *rag-2/cadena* y a la edad de 5-7 semanas con 50.000 células derivadas del tumor WNT1- virus del tumor de mama del ratón (MMTV) en la almohadilla grasa mamaria superior derecha. Los ratones transgénicos (MMTV)-Wnt1 mostraban etapas separadas de tumorigénesis mamaria, que incluían, hiperplasia, carcinoma invasiva ductal, y metástasis distantes, y por lo tanto este modelo de ratón de tumor de mama proporciona una herramienta útil para analizar el papel de los Wnt en la formación y crecimiento de tumores (Nusse y Varmus (1982) Cell 31:99-109). Los tumores de estos ratones se disociaron y estas células tumorales disociadas se utilizaron con fines de propagación tumoral. Los ratones con células tumorales implantadas en la almohadilla grasa mamaria se trataron 5x semanalmente con 200 μ l de PBS (n = 10) o con el receptor FZD8 Fri.Fc soluble (10 mg/kg) diluido en PBS. Una vez que los tumores eran palpables, se midieron los tamaños tumorales dos veces a la semana. El tratamiento con el receptor FZD8 Fri.Fc disminuía drásticamente el crecimiento de tumores en comparación con el tratamiento de control con PBS (Fig. 5).

Para ensayar de nuevo la capacidad e los receptores FZD solubles para inhibir el crecimiento tumoral, se inyectaron ratones NOD/SCID con 50.000 células tumorales de mama PE13. Un día después de la inyección celular, se inyectaron i.p. 200 μ l de receptor FZD8 Fri.Fc soluble diluido en PBS a 10 mg/kg o se inyectaron 200 μ l de PBS y se continuó el tratamiento 5x a la semana (n = 10 por grupo experimental). El crecimiento tumoral se controló semanalmente hasta que se detectó crecimiento, luego se midió el crecimiento tumoral dos veces a la semana. El tratamiento de los animales con FZD8 Fri.Fc reducía significativamente el crecimiento celular del tumor de mama en comparación con los controles inyectados con PBS (Fig. 6).

Ejemplo 4

Tratamiento *in vivo* del crecimiento tumoral utilizando el receptor proteico FZD Fc soluble

5 Este ejemplo describe el uso de un receptor FZD Fc soluble para tratar tumores en un modelo de xenoinjerto.

En ciertas realizaciones, se implantaron por vía subcutánea 50.000 células derivadas del tumor de mama MMTV Wnt1 en Matrigel en ratones hembras doble knockout *rag-2/ cadena* γ de 5-7 semanas de edad. El día diecinueve, los ratones con tumores se asignaron aleatoriamente en grupos con un volumen de tumor medio de 65 mm³, y el día
10 veintiséis, se inició el tratamiento con proteínas de fusión FZD8 Fri.Fc o FZD5 Fri.Fc. Específicamente, se administró cinco veces por semana la proteína de fusión FZD8 Fri.Fc en concentraciones crecientes (5 mg/kg, 10 mg/kg, y 30 mg/kg), y se administró FZD5 Fri.Fc a 10 mg/kg. Los animales de control se trataron con PBS.

Se observó una actividad anti-tumoral dependiente de la dosis de la proteína de fusión FZD8 Fri.Fc (Fig. 7). En la
15 dosis más baja de FZD8 Fri.Fc a 5 mg/kg se reducía el crecimiento de los tumores con respecto a los ratones tratados con PBS, pero los regímenes de tratamiento de 10 mg/kg y 30 mg/kg con FZD8 Fri.Fc eran significativamente más eficaces en la reducción del tamaño de tumores pre-establecidos. Por el contrario, el FZD5 Fri.Fc no presentaba efectos anti-tumorales en tumores de mama establecidos que necesitan Wnt1 para el crecimiento.

20 Ejemplo 5

Tratamiento de tumores *in vivo* utilizando receptores proteicos FZD Fc solubles

25 Este ejemplo describe el uso de un receptor FZD Fc soluble para tratar el cáncer en un modelo de xenoinjerto.

Las células tumorales de una muestra de un paciente (biopsia de un tumor sólido o derrame pleural) que se habían pasado como xenoinjerto en ratones se prepararon para el re-pasaje en animales experimentales. El tejido tumoral se retira, se corta en pequeños pedazos, se pica completamente utilizando cuchillas estériles, y se obtuvieron
30 suspensiones celulares únicas por digestión enzimática y destrucción mecánica. Las células tumorales disociadas se inyectaron entonces por vía subcutánea en las almohadillas grasas mamarias para los tumores de mama y en el flanco para los tumores no mamarios en ratones NOD/SCID para producir el crecimiento tumoral. De manera alternativa se aislaron las células tumorales tumorigénicas Lin⁺ESA⁺, CD44⁺, CD24⁻/bajo, como se describe en detalle anteriormente y se inyectaron.

Después de la inyección de células del tumor, se controlaron el crecimiento tumoral en los animales. Una vez que los tumores alcanzaban el tamaño medio de aproximadamente 150 a 200 mm, comenzó el tratamiento con proteína FZD Fc. Cada animal recibía 120 mg/kg de FZD Fc o proteína de control i.p. dos a cinco veces a la semana durante un total de 6 semanas. El tamaño del tumor se evaluó dos veces a la semana durante esas 6 semanas. La capacidad del FZD Fc para evitar más crecimiento tumoral o para reducir el tamaño tumoral en comparación con los anticuerpos de control se determinó de esta manera.
40

Ejemplo 6

45 Tratamiento del cáncer humano utilizando el receptor proteico FZD Fc soluble

Este ejemplo describe métodos para tratar el cáncer utilizando un receptor FZD Fc soluble que se dirige a tumores que comprenden células madre del cáncer y/o células tumorales en las que se ha detectado la expresión del receptor FZD.
50

La presencia de la expresión del marcador de células madre del cáncer se puede determinar en primer lugar por una biopsia tumoral. Las células tumorales de una biopsia de un paciente diagnosticado con cáncer se retiran bajo condiciones de esterilidad. En una realización el tejido de biopsia se enfría-congela en nitrógeno líquido, embebido en O.C.T., y se corta en un criostato en secciones de 10 μ m en portaobjetos de cristal. De manera alternativa el
55 tejido de biopsia se fija con formalina, se embebe en parafina, y se corta en un microtomo en secciones de 10 μ m en portaobjetos de cristal. Las secciones se incubaron con anticuerpos contra el receptor FZD para detectar la expresión proteica. De manera adicional, se puede determinar la presencia de células madre del cáncer. Las muestras de tejido de biopsia se cortan en pequeños pedazos, se pican completamente utilizando cuchillas estériles, y las células se someten a digestión enzimática y destrucción mecánica para obtener una suspensión celular única.
60 Las células tumorales disociadas se incuban entonces con anticuerpos anti-ESA, anti-CD44, anti-CD24, anti-Lin, y anti-FZD para detectar las células madre del cáncer, y la presencia de células madre tumorales ESA⁺, CD44⁺, CD24⁻/bajo, Lin⁻, FZD⁺ se determina por citometría de flujo como se ha descrito en detalle anteriormente.

Los pacientes de cáncer cuyos tumores se diagnostican con células madre del cáncer se tratan con un receptor FZD Fc soluble. La proteína de fusión FZD Fc humana generada como se ha descrito anteriormente se purifica y formula con un vehículo farmacéutico adecuado en PBS para inyección. Los pacientes se tratan con FZD Fc
65

preferentemente una vez a la semana durante al menos 10 semanas, pero más preferentemente una vez a la semana durante al menos 14 semanas. Cada administración de FZD Fc debería ser a una dosis eficaz de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 mg/ml o aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mg/ml. El FZD Fc se puede administrar antes de, concurrentemente con, o después de regímenes de radioterapia o regímenes de quimioterapia de referencia utilizando uno o más agentes quimioterápicos, tal como oxaliplatino, fluorouracilo, leucovorina, o estreptozocina. Los pacientes se controlan para determinar si tal tratamiento ha dado como resultado una respuesta anti-tumoral, por ejemplo, sobre la base de la regresión tumoral, reducción en las incidencias de nuevos tumores, menor expresión de antígenos tumorales, disminución del número de células madre del cáncer, u otros medios de evaluación del pronóstico de la enfermedad.

SEC ID N° 1
Dominio extracelular del extremo N FZD10

MQRPGPRLWLVLQVMGSCAAISSMDMERPGDGKCPPIBPMCKDIGYNMTRMPNLMGHENQRBA
AIQLHEFAPLVEYGCHGLRFFLCSLYAPMCTEQVSTPIPACRVMCEQARLKCSPIMEQFNFKWPD
SLDCRKLPNKNDPNYLCMEAPNNGSDEPTRGSGLFPPLFRPQRPHSAQEHPKLDGGGPRGGCDNP
GKPFHVVEKSASCAPLCTPGVDVYWSREDKRFA

SEC ID N° 2
Dominio extracelular del extremo N FZD7

MRDPGAAAPLSSLGLCALVLALLGALSAGAGAQPYHGBKGISVDPDHGFCQPISEPLCTDIAYNQTL
PNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFLCSMYAPVCTVLDQAIPPCRS LCERARQGCEA
LMNKFGFQWPERLRCENFPVHGAGEICVQNTSDGSGGGPGGPTAYPTAPYLPDLPTALPPGASD
GRGRPAFPFSCPRQLKVPYLYGRFLGERDCGAPCEPGRANGLMYFKEEERFARL

SEC ID N° 3
Dominio extracelular del extremo N FZD5

MARPDFSAPPSLLLLLLAQLVGRAAAASKAPVCQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQDEAGL
EVHQFWPLVEIQSPDLRFFLCSMYTPICLPDYHKPLPPCRSVCERAKAGCSPLMRQYGFAWPERM
SCDRPLVLRDAEVLCDYNRSEATTAPPRPFAKPTLPGPPGAPASGGGECAGGPFVCKCREPFV
PILKESHPLYNKVRTGQVPNCAVPCYQPSFSADERT

SEC ID N° 4
Fc de IgG1 humana

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSQSVMHLEAHNHHTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 5
Dominio extracelular del extremo N FZD6

MEMFTFLLTICIFLPLLRGHSFLTCEPITVPRCMKMAYNMTFFPNLMGHYDQSIAAVEMEHFLPLAN
LECSPIETFLCKAFVPTCIEQIHVPPCRKLCEKVYSDCKKLIDTFGIRWPEEBLECDRLQYCDETVP
VTFDPHTEFLGPQKKTEQVQRDIGFWCPRHLKTSGGQGYKFLGIDQCAPPNMYFKSDELEFAKS
FIGTVSI

SEC ID N° 6
Dominio extracelular del extremo N FZD

MLAMAWRGAGPSVPGAPGGVGLSLGLLLQLLLLLGPARGFGDEEBERRCDPIRISMCONLGYNVTK
MPNLVGHQLQDAELQLTFTPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINIPGPGGMCLSVKRRCE
PVLKEFGFAWPESLNCSEKFPQNDHNHMCMEGPGDEEVPLPHKTPIQGEECHSVGTNSDQYTWV
KRSLNCVLKCGYDAGLYRSASKEFTDI

SEC ID N° 7
Dominio FZD8 Fri

MEWGYLLEVTSLAALALLQRSSGAAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDE
AGLEVHQFWPLVEIQSPDLKFFLCSMYTPICLEDYKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAPW
DRMRCDRLPEQGNPDTLCMDYNRDILT

SEC ID Nº 8
Dominio FZD4 Fri

MLAMAWRGAGPSVPGAPGGVGLSLGLLLQLLLLLGFARGFGDEEERRCDPIRISM CQNLGYNVTK
MPNLVGHQLQTD AELQLTFTPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINIPGPGGMCLSVKRRCE
PVLKEFGFAWPESLNC SKFPPQNDHNHMCMEGPGDEEV

5

SEC ID Nº 9
Dominio FZD5 Fri

MARPDPSPAPSLLLLLLAQLVGRAAAAASKAPVCQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQDEAGL
EVHQFWPLVEIQCSFDLRFFLCSMYTPICLPDYHKPLPPCRSVCERAKAGCSPLMRQYGFAWPERM
SCDRLPVLGRDAEVL CMDYNRSEATT

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> OncoMed Pharmaceuticals, Inc.

15

<120> Composiciones y métodos para diagnosticar y tratar el cáncer

<130> HMK/FP6810626

<140> EP

20

<141> 31-10-2006

<150> EP 07752161.5

<151> 31-10-2006

25

<150> PCT/US2007/005443

<151> 31-10-2006

<150> US 60/812.966

<151> 13-06-2006

30

<150> US 60/731.468

<151> 31-10-2005

<160> 9

35

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 227

40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio extracelular del extremo N de FZD10 humano

45

<400> 1

Met Gln Arg Pro Gly Pro Arg Leu Trp Leu Val Leu Gln Val Met Gly
 1 5 10 15

Ser Cys Ala Ala Ile Ser Ser Met Asp Met Glu Arg Pro Gly Asp Gly
 20 25 30

Lys Cys Gln Pro Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr Asn
 35 40 45

Met Thr Arg Met Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu Ala
 50 55 60

Ala Ile Gln Leu His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys His
 65 70 75 80

Gly His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr
 85 90 95

Glu Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu Gln
 100 105 110

Ala Arg Leu Lys Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Lys Trp
 115 120 125

Pro Asp Ser Leu Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro Asn
 130 135 140

Tyr Leu Cys Met Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser Asp Glu Pro Thr Arg
 145 150 155 160

Gly Ser Gly Leu Phe Pro Pro Leu Phe Arg Pro Gln Arg Pro His Ser
 165 170 175

Ala Gln Glu His Pro Leu Lys Asp Gly Gly Pro Gly Arg Gly Gly Cys
 180 185 190

Asp Asn Pro Gly Lys Phe His His Val Glu Lys Ser Ala Ser Cys Ala
 195 200 205

Pro Leu Cys Thr Pro Gly Val Asp Val Tyr Trp Ser Arg Glu Asp Lys
 210 215 220

Arg Phe Ala
 225

<210> 2
 <211> 255

ES 2 547 421 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Dominio extracelular del extremo N de FZD7 humano

<400> 2

```

Met Arg Asp Pro Gly Ala Ala Ala Pro Leu Ser Ser Leu Gly Leu Cys
 1           5           10           15

Ala Leu Val Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu Ser Ala Gly Ala Gly Ala
 20           25           30

Gln Pro Tyr His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Val Pro Asp His Gly Phe
 35           40           45

Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln
 50           55           60

Thr Ile Leu Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly
 65           70           75           80

Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Pro
 85           90           95
    
```

Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val
 100 105 110
 Leu Asp Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg
 115 120 125
 Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu
 130 135 140
 Arg Leu Arg Cys Glu Asn Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Ile Cys
 145 150 155 160
 Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly Ser Gly Gly Pro Gly Gly Gly Pro
 165 170 175
 Thr Ala Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Leu Pro Asp Leu Pro Phe Thr Ala
 180 185 190
 Leu Pro Pro Gly Ala Ser Asp Gly Arg Gly Arg Pro Ala Phe Pro Phe
 195 200 205
 Ser Cys Pro Arg Gln Leu Lys Val Pro Pro Tyr Leu Gly Tyr Arg Phe
 210 215 220
 Leu Gly Glu Arg Asp Cys Gly Ala Pro Cys Glu Pro Gly Arg Ala Asn
 225 230 235 240
 Gly Leu Met Tyr Phe Lys Glu Glu Glu Arg Arg Phe Ala Arg Leu
 245 250 255

<210> 3

<211> 233

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio extracelular del extremo N de FZD5 humano

<400> 3

Met Ala Arg Pro Asp Pro Ser Ala Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Ala Gln Leu Val Gly Arg Ala Ala Ala Ala Ser Lys Ala Pro Val
 20 25 30

Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg Gly Ile Gly Tyr Asn Leu
 35 40 45

Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu Ala Gly
 50 55 60

Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys Ser Pro
 65 70 75 80

Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys Leu Pro
 85 90 95

Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu Arg Ala
 100 105 110

Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala Trp Pro
 115 120 125

Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg Leu Pro Val Leu Gly Arg Asp Ala Glu
 130 135 140

Val Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Ser Glu Ala Thr Thr Ala Pro Pro
 145 150 155 160

Arg Pro Phe Pro Ala Lys Pro Thr Leu Pro Gly Pro Pro Gly Ala Pro
 165 170 175

Ala Ser Gly Gly Glu Cys Pro Ala Gly Gly Pro Phe Val Cys Lys Cys
 180 185 190

Arg Glu Pro Phe Val Pro Ile Leu Lys Glu Ser His Pro Leu Tyr Asn
 195 200 205

Lys Val Arg Thr Gly Gln Val Pro Asn Cys Ala Val Pro Cys Tyr Gln
 210 215 220

Pro Ser Phe Ser Ala Asp Glu Arg Thr
 225 230

ES 2 547 421 T3

<210> 4
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Fc de IgG1 humana

10

<400> 4

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35		40		45											
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
50						55					60				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
65					70					75					80
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				85					90					95	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			100					105					110		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
		115					120					125			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
	130					135					140				
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
145					150					155					160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
				165					170					175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
			180					185					190		
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
		195					200					205			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
	210					215					220				
Pro	Gly	Lys													
225															

<210> 5
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio extracelular del extremo N de FZD6 humano

<400> 5

5

10

<220>

<223> Dominio Fri de FZD8 humano

5 <400> 7

Met Glu Trp Gly Tyr Leu Leu Glu Val Thr Ser Leu Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Ala Leu Leu Gln Arg Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ser Ala Lys Glu
20 25 30

Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys Lys Gly Ile Gly Tyr
35 40 45

Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu
50 55 60

Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys
65 70 75 80

Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys
85 90 95

Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu
100 105 110

Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala
115 120 125

Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro Glu Gln Gly Asn Pro
130 135 140

Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp Leu Thr Thr
145 150 155

<210> 8

10 <211> 170

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Dominio Fri de FZD4 humano

<400> 8

Met Leu Ala Met Ala Trp Arg Gly Ala Gly Pro Ser Val Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Pro Gly Gly Val Gly Leu Ser Leu Gly Leu Leu Leu Gln Leu Leu Leu
 20 25 30

Leu Leu Gly Pro Ala Arg Gly Phe Gly Asp Glu Glu Glu Arg Arg Cys
 35 40 45

Asp Pro Ile Arg Ile Ser Met Cys Gln Asn Leu Gly Tyr Asn Val Thr
 50 55 60

Lys Met Pro Asn Leu Val Gly His Glu Leu Gln Thr Asp Ala Glu Leu
 65 70 75 80

Gln Leu Thr Thr Phe Thr Pro Leu Ile Gln Tyr Gly Cys Ser Ser Gln

85

90

95

Leu Gln Phe Phe Leu Cys Ser Val Tyr Val Pro Met Cys Thr Glu Lys
 100 105 110

Ile Asn Ile Pro Ile Gly Pro Cys Gly Gly Met Cys Leu Ser Val Lys
 115 120 125

Arg Arg Cys Glu Pro Val Leu Lys Glu Phe Gly Phe Ala Trp Pro Glu
 130 135 140

Ser Leu Asn Cys Ser Lys Phe Pro Pro Gln Asn Asp His Asn His Met
 145 150 155 160

Cys Met Glu Gly Pro Gly Asp Glu Glu Val
 165 170

<210> 9

<211> 157

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio Fri de FZD5 humano

<400> 9

5

10

ES 2 547 421 T3

Met Ala Arg Pro Asp Pro Ser Ala Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Ala Gln Leu Val Gly Arg Ala Ala Ala Ala Ser Lys Ala Pro Val
 20 25 30

Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg Gly Ile Gly Tyr Asn Leu
 35 40 45

Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu Ala Gly
 50 55 60

Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys Ser Pro
 65 70 75 80

Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys Leu Pro
 85 90 95

Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu Arg Ala
 100 105 110

Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala Trp Pro
 115 120 125

Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg Leu Pro Val Leu Gly Arg Asp Ala Glu
 130 135 140

Val Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Ser Glu Ala Thr Thr
 145 150 155

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un receptor FZD8 soluble y un vehículo, excipiente y/o estabilizante farmacéuticamente aceptable, en donde la secuencia de aminoácidos del receptor FZD8 soluble consiste en los restos 28 a 158 de la SEC ID N° 7, unida a una secuencia de no receptor FZD, en donde la secuencia de no receptor FZD comprende un Fc humano.
- 10 2. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el Fc humano es un Fc de IgG1 humana.
3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos del receptor soluble consiste en los restos 28 a 158 de la SEC ID N° 7, unida a la SEC ID N° 4.
- 15 4. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia.
5. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un método de tratamiento del cáncer.
- 20 6. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, un tumor de pulmón, cáncer ovárico, melanoma, carcinoma de células basales, sarcoma o cáncer hepatocelular.
- 25 7. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde el método comprende la administración del receptor soluble a un paciente humano con radioterapia, quimioterapia, o un anticuerpo contra un antígeno adicional asociado al tumor.

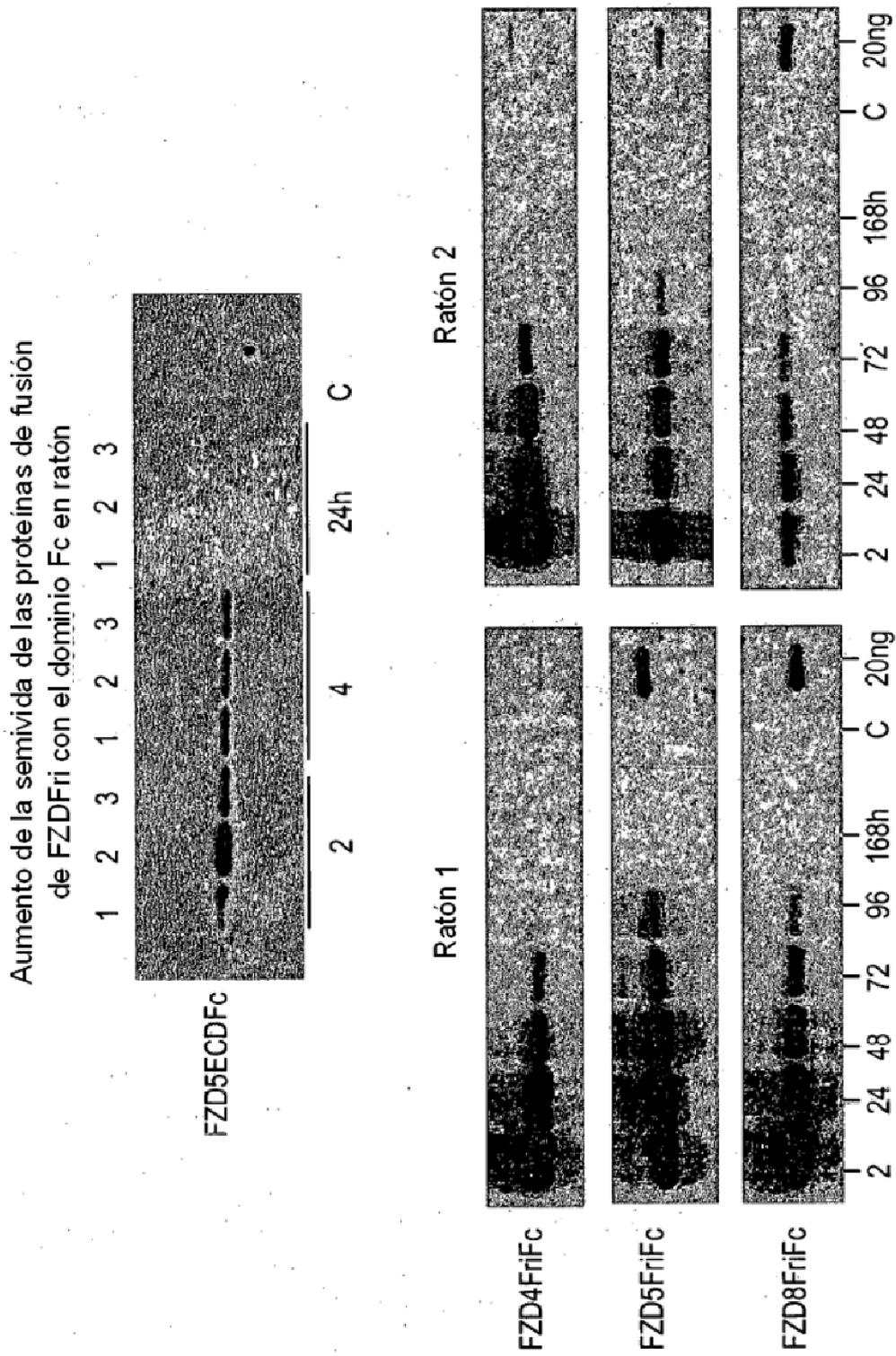


FIG. 1

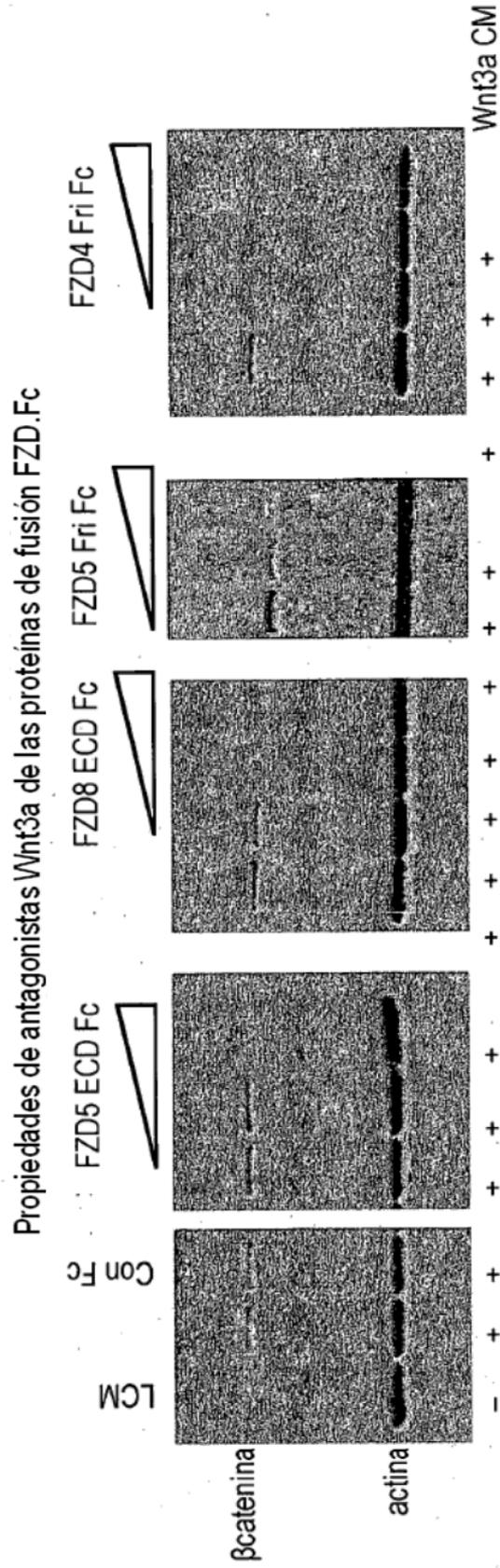


FIG. 2

Subfamilia FZD responsable de la unión de Wnt que activa la beta-Catenina

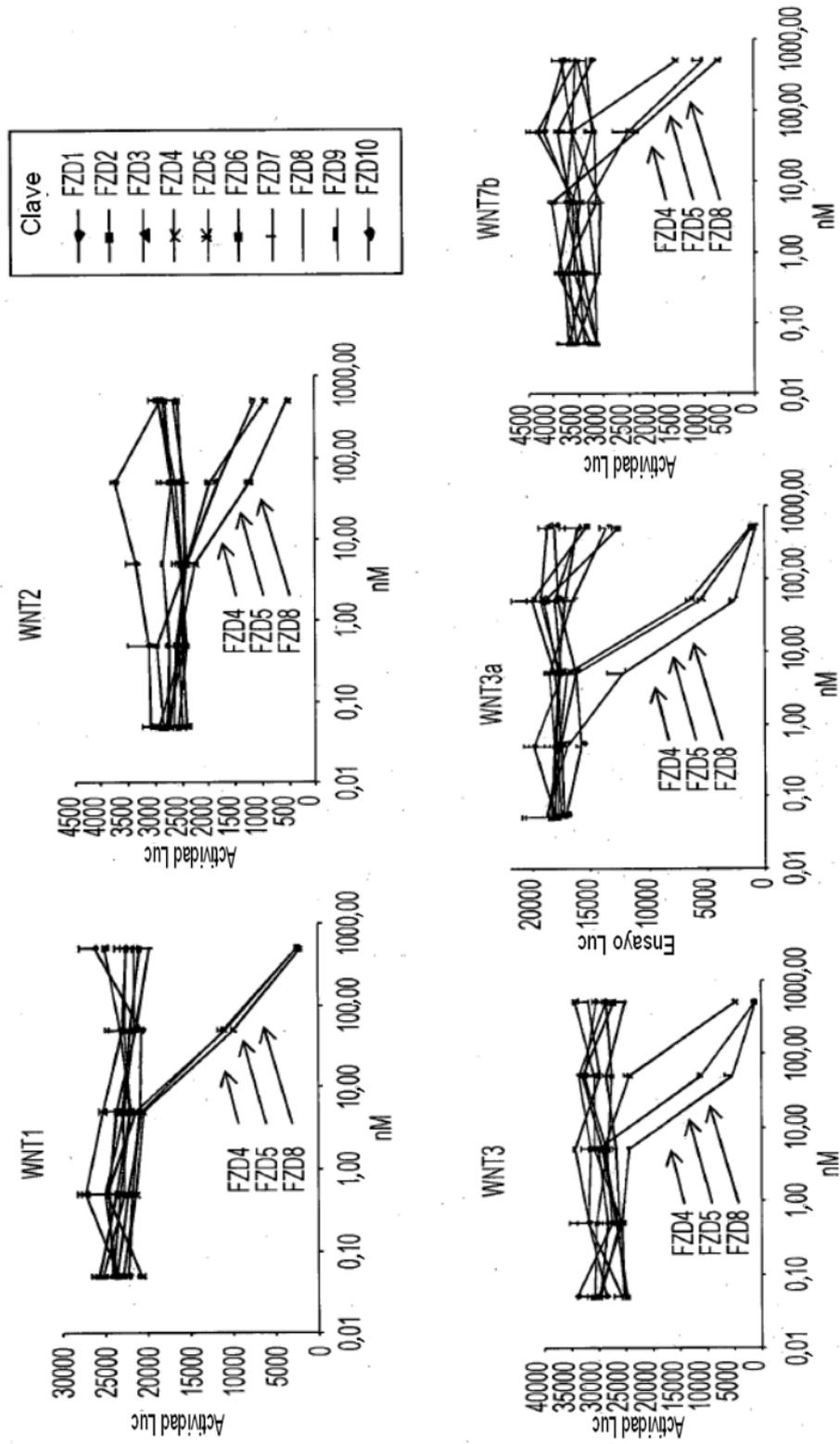


FIG. 3

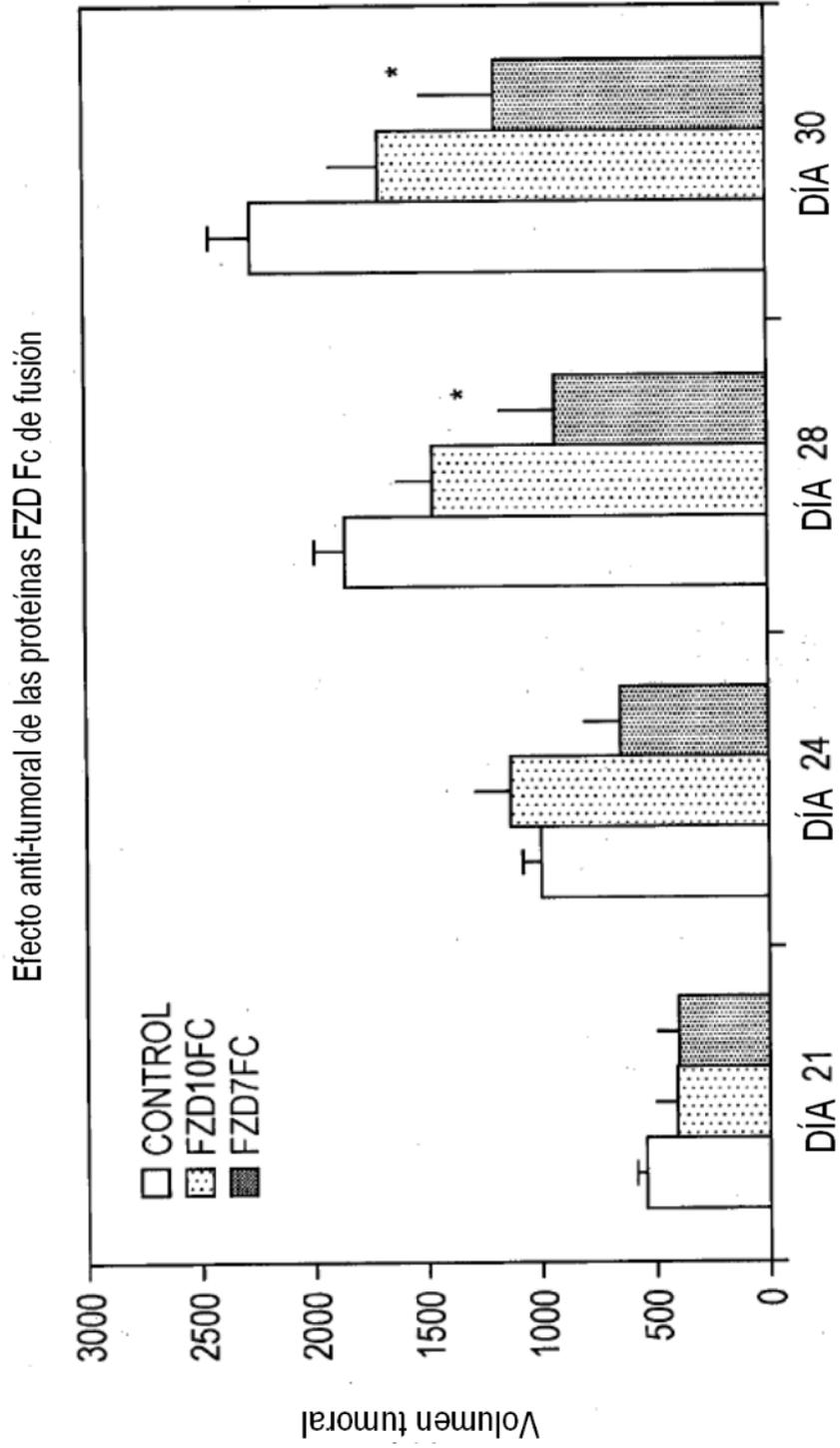


FIG. 4

Tratamiento con FZD8Fc de tumores WNT1
(5x semanalmente; 10 mg/kg)

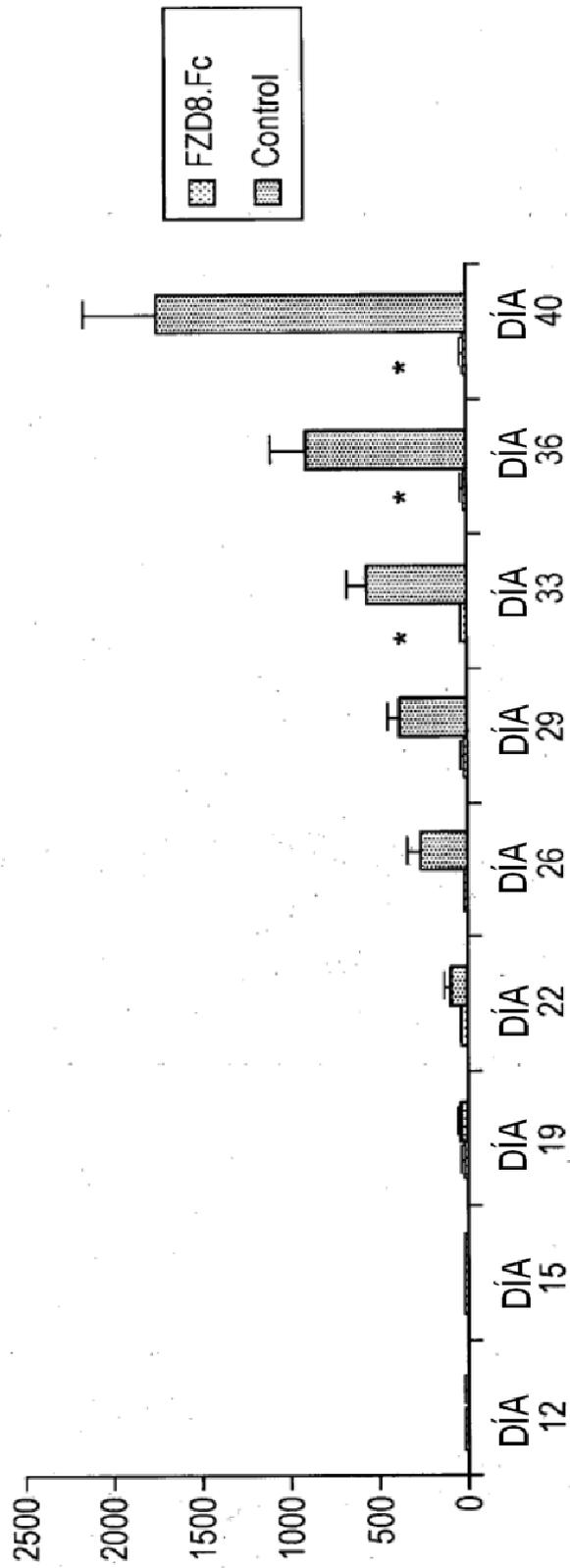


FIG. 5

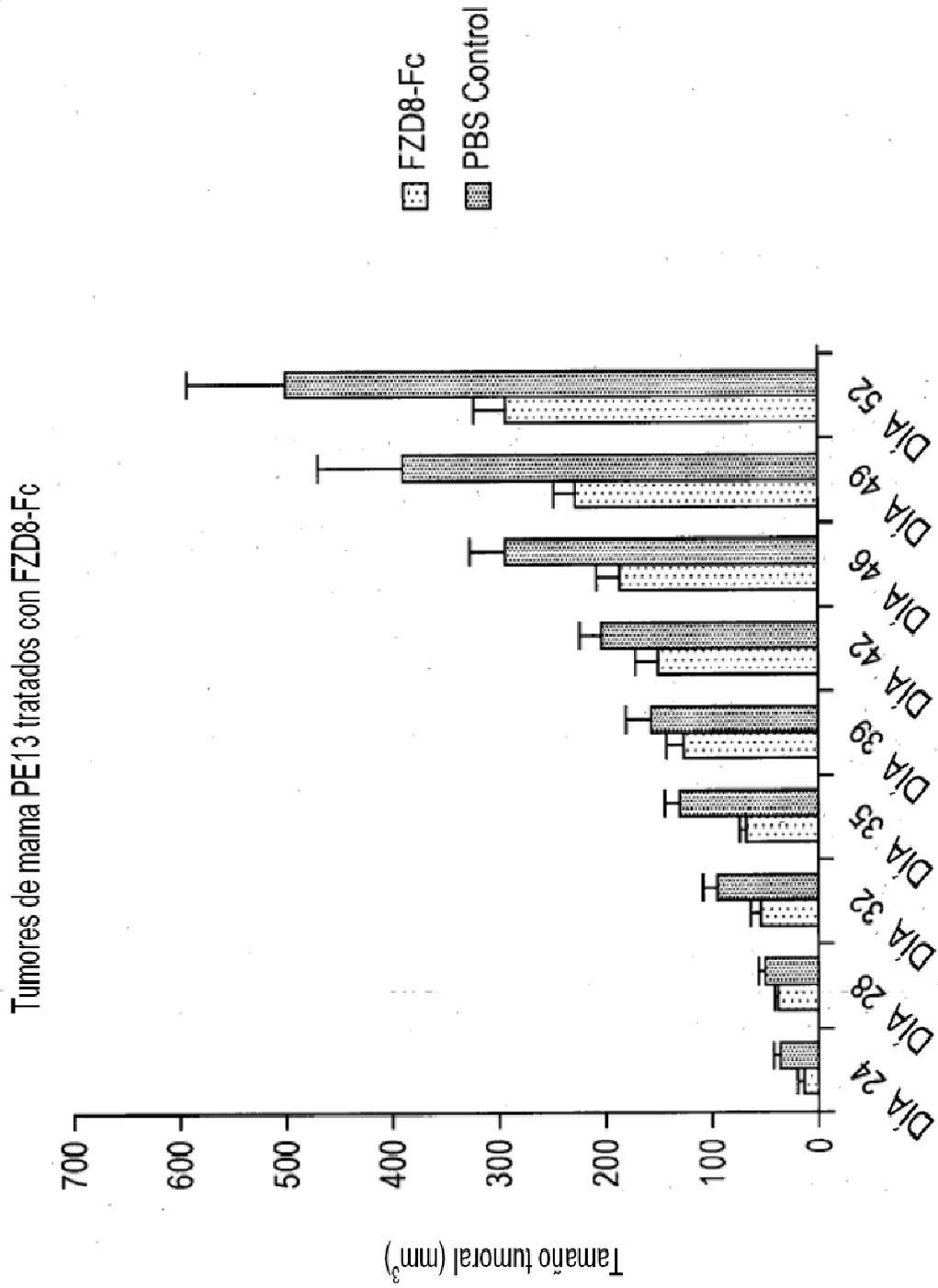


FIG. 6

Efecto de FZD8FriFc en Tumores MMTV WNT1 Establecidos

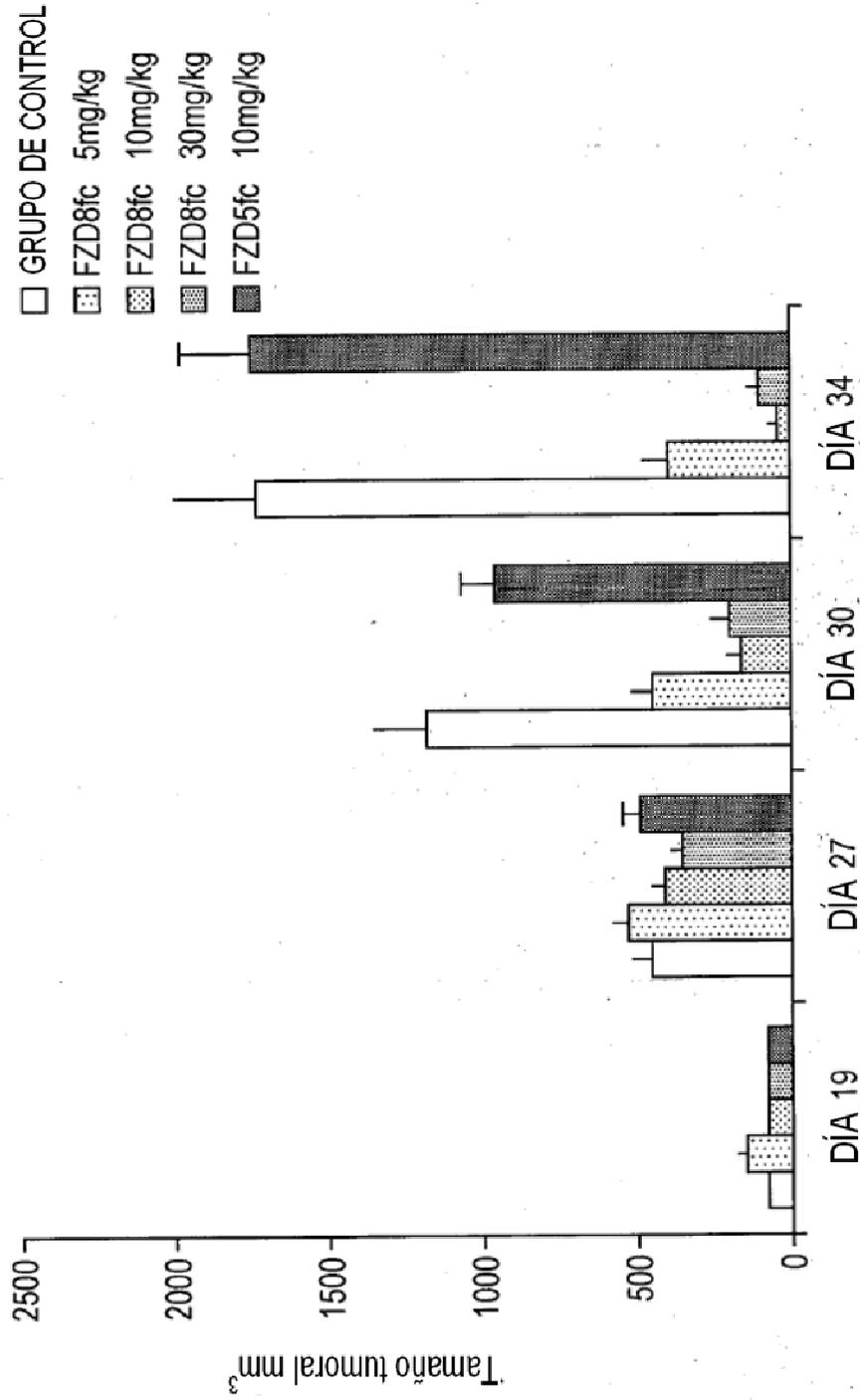


FIG. 7