

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 532**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2008 E 08844924 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2209491**

54 Título: **Moléculas y métodos de modulación de la proteína 6 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP6)**

30 Prioridad:

02.11.2007 US 984827 P

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

19.02.2016

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CONG, FENG;
RANGWALA, SHAMINA M.;
ETTENBERG, SETH y
GUTH, SABINE**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 560 532 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).

MOLÉCULAS Y MÉTODOS DE MODULACIÓN DE LA PROTEÍNA 6 RELACIONADA CON EL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD (LRP6)

Descripción

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La familia de genes Wnt codifica una gran clase de proteínas secretadas relacionadas con el protooncogén Int1/Wnt1 y *wingless* ("Wg") de *Drosophila*, un homólogo de Wnt1 de *Drosophila* (Cadigan *et al.* (1997) *Genes & Development* 11:3286-3305). Los Wnt se expresan en diversos tejidos y órganos, y son necesarios para muchos procesos del desarrollo, incluida la segmentación en *Drosophila*; el desarrollo del endodermo en *C. elegans*; y el establecimiento de la polaridad de las extremidades, la diferenciación de la cresta neural, la morfogénesis renal, la determinación del sexo y el desarrollo cerebral en los mamíferos (Parr, *et al.* (1994) *Curr. Opin. Genetics & Devel.* 4:523-528). La vía Wnt es un regulador maestro en el desarrollo animal, tanto durante la embriogénesis como en el organismo maduro (Eastman, *et al.* (1999) *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:233-240; Peifer, *et al.* (2000) *Science* 287:1606-1609).

20 Las señales de Wnt son transducidas por la familia *frizzled* ("Fz") de siete receptores con dominio transmembrana (Bhanot *et al.* (1996) *Nature* 382:225-230). Los receptores de superficie celular *frizzled* (Fzd) desempeñan un papel esencial en la señalización de Wnt tanto canónica como no canónica. En la vía canónica, tras la activación de Fzd y LRP5/6 (proteína 5 y 6 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad) por las proteínas Wnt, se genera una señal que impide la fosforilación y degradación de la β -catenina por el "complejo de destrucción de β -cat", permitiendo la translocación de la β -catenina estable y la acumulación en el núcleo, y por lo tanto, la transducción de señales de Wnt (Perrimon (1994) *Cell* 76:781-784) (Miller, J.R. (2001) *Genome Biology*; 3(1):1-15). La vía de señalización de Wnt no canónica no está tan bien definida: se han propuesto al menos dos vías de señalización de Wnt no canónicas, incluidas la vía de polaridad celular planar (PCP), la vía Wnt/Ca⁺⁺, y la vía de convergencia y elongación.

30 La glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3, conocida como *shaggy* en *Drosophila*), el producto de genes supresores de tumores APC (poliposis adenomatosa coli) (Gumbiner (1997) *Curr. Biol.* 7:R443-436), y la proteína de andamiaje Axin, son todos reguladores negativos de la vía Wnt, y juntos forman el "complejo de destrucción de β -cat". En ausencia de un ligando de Wnt, estas proteínas forman un complejo y promueven la fosforilación y degradación de la β -catenina, mientras que la señalización de Wnt inactiva el complejo y evita la degradación de la β -catenina. Como resultado, la β -catenina estabilizada se transloca al núcleo, donde se une a factores de transcripción TCF (factor de células T) (también conocido como factor 1 de unión al potenciador linfoide (LEF1)) y hace de coactivador de la transcripción inducida por TCF/LEF (Bienz, *et al.* (2000) *Cell* 103:311-320; Polakis, *et al.* (2000) *Genes Dev.* 14:1837-51).

40 La señalización de Wnt se produce a través de mecanismos canónicos y no canónicos. En la vía canónica, tras la activación de Fzd y LRP5/6 por las proteínas Wnt, la β -catenina estabilizada se acumula en el núcleo y conduce a la activación de los genes diana de TCF (como se ha descrito anteriormente) (Miller, J.R. (2001) *Genome Biology*; 3(1):1-15). La vía de señalización de Wnt no canónica no está tan bien definida: se han propuesto al menos dos vías de señalización de Wnt no canónicas incluidas la vía de polaridad celular planar (PCP) y la vía Wnt/Ca⁺⁺.

45 La activación de la vía Wnt anormalmente alta, a través de la estabilización de la β -catenina, desempeña un papel central en la tumorigénesis para muchos carcinomas colorrectales. Se estima que un 80% de los carcinomas colorrectales (CRC) albergan mutaciones inactivadoras en el represor tumoral APC, lo que permite la señalización ininterrumpida de Wnt. Además, hay un creciente conjunto de pruebas que sugieren que la activación de la vía Wnt puede estar implicada en el melanoma, los cánceres de mama, hepático, pulmonar y gástrico. Existe una conexión reconocida desde hace tiempo entre los Wnt, el desarrollo normal y el cáncer, una conexión establecida adicionalmente con la identificación del protooncogén c-Myc como diana de la señalización de Wnt (He *et al.* (1998) *Science* 281:1509-3512).

55 Además, otros trastornos asociados con niveles patológicamente altos o bajos de la señalización de Wnt incluyen, pero no se limitan a, la osteoporosis, la osteoartritis, la enfermedad poliquística renal, la diabetes, la esquizofrenia, la enfermedad vascular, la cardiopatía, enfermedades proliferativas no oncogénicas y enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer. La regulación positiva aberrante de la señalización de Wnt está asociada con el cáncer, la osteoartritis y la enfermedad poliquística renal, mientras que la regulación negativa aberrante de la señalización de Wnt se ha relacionado con la osteoporosis, la obesidad, la diabetes, trastornos fibróticos y enfermedades degenerativas neuronales.

60 El paradigma actual para el desarrollo de terapias para los trastornos relacionados con la señalización de Wnt, tal como el cáncer colorrectal, se basa en dirigirse contra β -cat o componentes de la vía Wnt corriente abajo de β -cat. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la señalización de Wnt autocrina mediada por el receptor de Wnt *frizzled* y LRP5/6 puede desempeñar un papel clave en la regulación del crecimiento y la supervivencia tumoral. Existe la necesidad de agentes y métodos que inhiban o potencien la actividad de transducción de señales de Wnt

65

mediante la modulación de la activación de la vía Wnt a lo largo de otros momentos críticos, tratando, diagnosticando, previniendo y/o mejorando así trastornos relacionados con la señalización de Wnt.

Li *et al.* (2002) describen un anticuerpo anti-LRP6 contra el segundo dominio helicoidal que inhibe Wnt3a.

5

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

10

La presente invención se refiere a una molécula de unión al polipéptido proteína 6 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP6) que comprende una porción de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la primera hélice de LRP6, en la que la porción de unión al antígeno se une a un epitopo dentro de la hélice 1 de la LRP6 humana dentro de o solapando los aminoácidos 20-326 de

15

MGAVLRSL LACSFCVLLRAAPLLLYANRRDLRLVDATNGKENATIVVGGLEDAAAVDFV
 FSHGLIYWSDVSEEAIKRTEFNKTESVQNVVVSGLLSPDGLACDWLGEKLYWTDSETNRI
 EVSNLDGSLRKVLFWQELDQPRAIALDPSSGFMWTDWGEVPKIERAGMDGSSRFIIINS
 EIYWPNGLTLDYEEQKLYWADAKLNFHKSNDLGTNRQAVVKGSLPHFPALTLFEDILYW
 TDWSTHSILACNKYTGEGLREIHSDFSPMDIHAFSQRPNATNPCGIDNNGGCSHLCLMS
 20 PVKPFYQCACPTGVKLENGKTKCKDGATELLLLARRTDLRRISLDTPDFTDIVLQLEDIRH
 AIAIDYDPVEGYIYWTDDDEVRAIRRSFIDGSGSQFVVTAQIAHPDGIADVWVARNLYWTD
 TGTDRIEVTRLNGTMRKILISEDLEEPRAIVLDPVMVGYMYWTDWGEIPKIERAALDGSDR
 25 VVLVNTSLGWPNGLALDYDEGKIYWGDAKTDKIEVMNTDGTGRRVLVEDKIPHIFGFTL
 LGDYVYWTDWQRRSIEVHKRSAEREVIIDQLPDLMLKATNVHRVIGSNPCAEEGGC
 SHLCLYRPQGLRCACPIGFELISDMKTCIVPEAFLLFSRRADIRRSLETNNNNVAIPLTGKVK
 30 EASALDFDVTDNRIYWTDISLKTISRAFMNGSALEHVVEFGLDYPEGMAVDWLKGNLY
 WADTGTNRIEVSKLDGQHRQVLVWKDLDSPRALALDPAEGFMWTEWGGKPKIDRAA
 MDGSERTTLVNVGRANGLTIDYAKRRLYWTDLDTNLISSNMLGLNREVIADDLPHPFGL
 35 LTQYQDYIYWTDWSRRSIERANKTSGQNRTIIQGHLDYVMDILVFHSSRQSGWNECASSN
 GHCSHLCLAVPVGGFVCGCPAHYSLNADNRTCSAPTTFLLFSQKSAINRMVIDEQQSPDII
 LPIHSLRNVRAIDYDPLDKQLYWIDSRQNMIRKAQEDGSGQFTVVVSSVPSQNLEIQPYD
 40 LSIDIYSRYIYWTCEATNVINVTRLDGRSVGVVLKGEQDRPRAVVVNPEKGYMYFTNLQ
 ERSFKIERAALDGTEREVLFFSGLSKPIALALDSRLGKLFWADSDLRRIESSDLSGANRIVL
 EDSNILQPVGTLVFENWLYWIDKQQMIEKIDMTGREGRTKVQARIAQLSDIHAVKELNL
 QEYRQHPCAQDNGGCSHICLVKGDGTRCSCPMHLVLLQDELSCGEPPTCSPQQFTCFTG
 45 EIDCIPVAWRCDGFTECEDHSDELNCPVCSSESQFCASGQCIDGALRCNGDANCQDKSDE
 KNCEVLCLIDQFRCANGQCIGKHKKCDHNVDKSDKDELDCYPTEEPAPQATNTVGSVI
 GVIVTIFVSGTVYFICQRMCLPRMKGDGETMTNDYVVHGPASVPLGYVPHPSLSGSLPG
 50 MSRGKSMISSLSIMGGSSGPPYDRAHVTVGASSSSSSSTKGTYPAILNPPSPATERSHYTM
 EFGYSSNSPSTHRYSYRPPYSYRHFAPPTTPCSTDVCDSDYAPSRMRTSVATAKGYTSDLN
 YDSEPVPPTPRSQYLSAENYESCPSPTYTERSYSHH LYPPPPSPCTDSS;

55

y en la que la porción de unión al antígeno es capaz de actuar como antagonista de la vía de señalización inducida por Wnt1. Pueden utilizarse moléculas antagonistas de unión a LRP6 para inhibir la señalización de la vía Wnt; pueden utilizarse para, por ejemplo, diagnosticar, mejorar los síntomas de, proteger frente a, y tratar trastornos de señalización de Wnt asociados con niveles anormalmente altos de señalización de la vía Wnt. Un ejemplo no limitativo de un trastorno asociado con la regulación positiva aberrante de la señalización de Wnt es el cáncer (por ejemplo, el cáncer de mama, el cáncer pulmonar y el cáncer de colon). Las moléculas de unión a LRP6 que actúan como antagonistas de la vía de señalización de Wnt impiden que los ligandos Wnt1 o Wnt3a se unan a LRP6. Por ejemplo, la actividad de señalización específica de Wnt3 y de Wnt3a puede ser inhibida de la manera más eficaz por una molécula antagonista de unión a LRP6 específica de Wnt3a. La molécula antagonista de unión a LRP6 específica de Wnt1 de la invención puede inhibir eficazmente la actividad de señalización específica de Wnt1.

60

65

- 5 La molécula de unión a LRP6 (por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-LRP6) puede presentar reacción cruzada con la proteína LRP6 (o parte de la misma) de un primate no humano (por ejemplo, un mono cynomolgus, o un mono rhesus). La molécula de unión a LRP6 puede presentar reacción cruzada con LRP6 de una especie de roedor (por ejemplo, LRP6 murina, LRP6 de rata). La molécula de unión a LRP6 puede presentar reacción cruzada con la LRP5 humana.
- 10 En diversas formas de realización, la molécula de unión a LRP6 (por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-LRP6) es capaz de unirse e inhibir la LRP6 fosforilada (fosfo-LRP6).
- 15 En diversas formas de realización, la porción de unión al antígeno de la molécula de unión a LRP6 se une a LRP6 con una constante de disociación (K_D) igual o inferior a 1 nM, 0,5 nM, 0,25 nM ó 0,1 nM.
- 20 En diversas formas de realización, la porción de unión al antígeno de la molécula de unión a LRP6 se une a LRP6 de un primate no humano (por ejemplo, mono cynomolgus o chimpancé) con una K_D igual o inferior a 1 nM, 0,5 nM, 0,25 nM ó 0,1 nM.
- 25 En diversas formas de realización, la porción de unión al antígeno se une a LRP6 de ratón con una K_D igual o inferior a 1 nM, 0,5 nM, 0,25 nM ó 0,1 nM.
- 30 El anticuerpo puede ser un anticuerpo híbrido (por ejemplo, humanizado) o un anticuerpo humano. En una forma de realización, la porción de unión al antígeno es una porción de unión al antígeno de un anticuerpo humano.
- 35 La molécula de unión a LRP6 incluye, por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un $F(ab')_2$, o un fragmento Fv del anticuerpo. La molécula de unión a LRP6 también incluye, por ejemplo, anticuerpos completos, por ejemplo, anticuerpos IgG bivalentes. En algunas formas de realización, un Fab u otro fragmento de anticuerpo monovalente que es capaz de actuar como antagonista de LRP6 puede convertirse en un anticuerpo bivalente completo, por ejemplo, un anticuerpo IgG bivalente, que es capaz de actuar como antagonista de LRP6.
- 40 En otras formas de realización, la molécula de unión a LRP6 se conjuga o acopla con un agente para aumentar dicha molécula de unión. En algunos casos, la molécula de unión a LRP6 se conjuga con proteína(s) de unión de albúmina de suero humano (HSA). En algunas formas de realización, la molécula de unión a LRP6 se somete a pegilación (por ejemplo, utilizando la tecnología patentada que se describe en cualquiera de los números de patente de EE.UU. US 5.840.526; US 5.874.541; US 6.005.079; y US 6.765.087 (las "patentes Hamers"), y en la familia de patentes que incluye la publicación PCT WO97/49805). En algunas formas de realización, la molécula de unión a LRP6 es un fragmento Fab pegilado. Pueden encontrarse ejemplos no limitativos de técnicas que pueden emplearse para la fabricación de dichos conjugados de moléculas de unión a LRP6 en las familias de patentes que incluyen una o más de los siguientes: los números de patente de EE.UU. US 5.840.526; US 5.874.541; US 6.005.079; y US 6.765.087 (las "patentes Hamers"); la publicación PCT WO97/49805; la patente europea EP1517921B1; la patente de EE.UU. 6.267.974; y la publicación de EE.UU. US2003-0175921.
- 45 En una forma de realización, la molécula de unión a LRP6 es un anticuerpo humano.
- 50 En una forma de realización, la molécula de unión a LRP6 incluye un Fv monocatenario.
- 55 En una forma de realización, la molécula de unión a LRP6 incluye un diacuerpo (por ejemplo, un diacuerpo monocatenario, o un diacuerpo con dos cadenas polipeptídicas).
- 60 En algunas formas de realización, la porción de unión al antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo de uno de los siguientes isotipos: IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas formas de realización, la porción de unión al antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo de un isotipo IgA o IgE.
- 65 A modo de ejemplo no limitativo, una molécula antagonista de unión a LRP6 puede inhibir, atenuar o evitar la activación y señalización de la vía Wnt al competir con los miembros de la vía de señalización de Wnt por la unión a LRP6. A modo de ejemplo, una molécula antagonista de unión a LRP6 específica de Wnt1 puede evitar la activación y señalización de la vía Wnt por cualquiera de Wnt1, Wnt2, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b y Wnt10.
- En algunas formas de realización, la molécula de unión a LRP6 modula las actividades biológicas corriente abajo normalmente moduladas de manera directa o indirecta por LRP6 (por ejemplo, la modulación de la fosforilación y la degradación de la β -catenina). Por ejemplo, una molécula antagonista de unión a LRP6 permite la fosforilación y la degradación de la β -catenina en un margen superior a al menos un 5%, 10%, 15%, 25% ó 50% en comparación con un control (por ejemplo, en comparación con la actividad en ausencia de la molécula antagonista de unión a LRP6).
- En una forma de realización, la molécula antagonista de unión a LRP6 específica de Wnt1 permite la fosforilación y la degradación de la β -catenina en un margen superior a al menos un 5%, 10%, 15%, 25% ó 50% en

comparación con un control evitando la activación y señalización de la vía Wnt. En otra forma de realización, una molécula antagonista de unión a LRP6 específica de Wnt1 permite la fosforilación y la degradación de la β -catenina en un margen superior a al menos un 5%, 10%, 15%, 25% ó 50% en comparación con un control evitando la unión de Wise a LRP6.

5 La invención también presenta una composición farmacéutica que incluye una molécula de unión a LRP6 que se describe en el presente documento. La composición incluye, por ejemplo, una molécula de unión a LRP6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 La invención también presenta métodos de uso de las moléculas de unión a LRP6 que se describen en el presente documento.

15 En un aspecto, la invención presenta un método para inhibir el crecimiento de una célula tumoral. El método incluye poner en contacto la célula tumoral con una molécula antagonista de unión a LRP6 (por ejemplo, una molécula de unión a LRP6 que incluye una porción de unión al antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a una LRP6), estabilizando así el complejo de destrucción de β -catenina, generando la fosforilación y degradación de la β -catenina, y evitando la transducción de señales de la vía Wnt dentro de la célula tumoral.

20 En otro aspecto, la invención presenta un método para inducir la apoptosis en una célula tumoral. El método incluye poner en contacto la célula tumoral, o el entorno de la célula hospedadora, con una molécula antagonista de unión a LRP6 (por ejemplo, una molécula de unión a LRP6 que incluye una porción de unión al antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a una LRP6), estabilizando así el complejo de destrucción de β -catenina, generando la fosforilación y la degradación de la β -catenina, y evitando la transducción de señales de la vía Wnt dentro de la célula tumoral.

25 En aun otro aspecto, la invención presenta un método para mermar el soporte del estroma para los tumores cancerosos. El método incluye poner en contacto la célula tumoral con una molécula antagonista de unión a LRP6 (por ejemplo, una molécula de unión a LRP6 que incluye una porción de unión al antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a una LRP6), destruyendo así los vasos sanguíneos (angiogénicos o de otra manera) y/u otros componentes estructurales de los que depende el tumor.

30 En los casos anteriormente indicados, la molécula antagonista de unión a LRP6 puede administrarse en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de una célula tumoral, o para inducir la apoptosis en una célula tumoral, respectivamente. La relación entre células cancerosas y células sanas del sujeto puede reducirse en al menos un 10%, en comparación con dicha relación antes de la administración de la composición (por ejemplo, la relación entre células cancerosas y células sanas se reduce en al menos un 25%, 30%, 50 %, 60%, 75% ó 100%). En algunas formas de realización, el sujeto también está recibiendo tratamiento con un agente quimioterapéutico.

40 En algunas formas de realización, la composición se administra por vía intravenosa.

En la siguiente descripción se exponen los detalles de una o más formas de realización de la invención. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones.

45 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

50 La secuencia de longitud completa de la LRP6 humana (hLRP6) se encuentra con el número de registro del GenBank GI:148727288, gb|NP_002327, y se muestra en la Tabla I como la SEQ ID NO: 1. Una secuencia de ARNm que codifica hLRP6 se encuentra con el número de registro GI: 148727287, nM_002336.

55

60

65

Tabla I: Secuencia de aminoácidos de LRP6 humana

5	1	MGAVLRSLLA	CSFCVLLRAA	PLLLYANRRD	LRLVDATNGK	ENATIVVGGGL	EDAAAVDFVVF
	61	SHGLIYWSDV	SEEAIKRTEF	NKTESVQNVV	VSGLLSPDGL	ACDWLGEKLY	WTDSETNRIE
	121	VSNLDGSLRK	VLFWQELDQP	RAIALDPSSG	FMYWTDWGEV	PKIERAGMDG	SSRFIIINSE
	181	IYWPNGLTLD	YEEQKLYWAD	AKLNFIHKS	LDGTNRQAVV	KGSLPHFPAL	TLFEDILYWT
	241	DWSTHSILAC	NKYTGEGLRE	IHSDIFSPMD	IHAFSQQRQP	NATNPCGIDN	GGCSHLCLMS
	301	PVKPFYQCAC	PTGVKLENG	KTCKDGADEL	LLLARRTDLR	RISLDTPDFT	DIVLQLEDIR
10	361	HAIALDYDPV	EGYIYWTDD	VRAIRRSFID	SGSQFVVTA	QIAHPDGIIV	DWVARNLYWT
	421	DTGTDRIEVT	RLNGTMRKIL	ISEDLEEPR	IVLDPMVGVM	YWTDWGEIIPK	IERAALDGSD
	481	RVVLVNTSLG	WPNGLALDYD	EGKIYWGDAK	TDKIEVMNTD	GTGRRVLVED	KIPHIFGFTL
	541	LGDYVYWDW	QRRSIERVHK	RSAEREVIID	QLPDLMGLKA	TNVHRVIGSN	PCAEEGGCS
	601	HLCLYRPQGL	RCACPIGFEL	ISDMKTCIVP	EAFLLFSRRA	DIRRISLETN	NNNVAIPLTG
	661	VKEASALDFD	VTDNRIYWTD	ISLKTISRFA	MNGSALEHVV	EFGLDYPEGM	AVDWLKGKLY
15	721	WADTGTNRIE	VSKLDGQHRQ	VLVWKDLDSP	RALALDPAEG	FMYWTEWGGK	PKIDRAMDGM
	781	SERTTLVPMV	GRANGLTIDY	AKRRLYWTDL	DTNLIESSNM	LGLNREVIAD	DLPHFPGLTQ
	841	YQDYIYWDW	SRRSIERANK	TSGQNRITIQ	GHLDYVMDIL	VFHSRQSGVM	NECASSNGHC
	901	SHLCLAVPVG	GFVCGCPAHY	SLNADNRTCS	APTTFLLFSQ	KSAINRMVID	EQQSPDIILP
	961	IHSLRNVRAI	DYDPLDKQLY	WIDSRQNMIR	KAQEDGSQGF	TVVVSSVPSQ	NLEIQPYDLS
20	1021	IDIYSRYIYW	TCEATNVINV	TRLDGRSVGV	VLKGEQDRPR	AVVVNPEKGY	MYFTNLQERS
	1081	PKIERAALDG	TEREVLFFSG	LSKPIALALD	SRLGKLFWAD	SDLRRIESSD	LSGANRIVLE
	1141	DSNILQPVGL	TVFENWLYWI	DKQQMIEKI	DMTGREGRTK	VQARIAQLSD	IHAVKELNLQ
	1201	EYRQHPCAQD	NGGCSHICLV	KGDGTRCSC	PMHLVLLQDE	LSCGEPPTCS	PQQTCTFTGE
	1261	IDCIPVAWRC	DGFTECEDHS	DELNCPVCSE	SQFQCASGQC	IDGALRCNGD	ANCQDKSDEK
25	1321	NCEVLCLIDQ	FRCANGQCIG	KHKKCDHNVD	CSDKSDELDC	YPTTEEPAPQA	TNTVGSVIGV
	1381	IVTIFVSGTV	YFICQRMLCP	RMKGDGETMT	NDYVVHGPAS	VPLGYVPHPS	SLSGSLPGMS
	1441	RKSMISSLS	IMGGSSGPPY	DRAHVTGASS	SSSSSTKGTY	FPAILNPPPS	PATERSHYTM
	1501	EFGYSSNSPS	THRSYSYRPY	SYRHFAPPTT	PCSTDVCDSD	YAPSRRTSV	ATAKGYTSDL
	1561	NYDSEPVPPP	PTPRSQYLSA	EENYESCPPS	PYTERSYSHH	LYPPPPSPCT	DSS (SEQ ID NO:1)

30 Las ubicaciones de los dominios dentro de la secuencia de la proteína LRP6 humana (SEQ ID NO: 1) son las siguientes: el péptido señal puede encontrarse desde los restos de aminoácidos 1-19 de la SEQ ID NO: 1; los cuatro dominios β -helicoidales de tipo YWTD (tirosina, triptófano, treonina y ácido aspártico), cada uno de los cuales forma una estructura β -helicoidal de seis aspas (Springer (1998) J. Mol Biol.; 283:837; Jeon. *et al.* (2001) Nat. Struct. Biol. 22:1172) puede encontrarse en los aminoácidos 20-326 de la SEQ ID NO: 1; los aminoácidos 327-630 de la SEQ ID NO: 1; los aminoácidos 631-932 de la SEQ ID NO: 1; y los aminoácidos 933-1246 de la SEQ ID NO: 1. La LRP6 humana está N-glicosilada en N42, N81, N281, N433, N486, N692, N859, N865, N926 y N1039.

35 La secuencia de aminoácidos de LRP6 de ratón tiene el nº de registro del GenBank GI: 148727327, NP_032540. La secuencia *Arrow* de *Drosophila* se encuentra con el nº de registro GI: 24653390, NP_524737, y la secuencia de LRP6 de *Xenopus* se encuentra con el nº de registro GI: 10280605, AAG15429. La LRP6 humana se identificó por su homología con LRP5, que se aisló originariamente por su homología con LDLR (receptor de lipoproteína de baja densidad). *Arrow*/LRP5/LRP6 son proteínas transmembrana de un solo cruce de tipo I con 1.678, 1.615 y 1.613 restos de aminoácidos, respectivamente. LRP5 y LRP6 comparten un 73% y un 64% de identidad en los dominios extracelular e intracelular, respectivamente, mientras que *Arrow* está igualmente relacionada (idéntica en un 40%) con LRP5 y LRP6. De hecho, los sustitutos de LRP6 para *Arrow* durante la señalización de Wg en células de *Drosophila* cultivadas (Schweizer *et al.* (2003) BMC Cell Biol. 4, 4) y *Arrow* constitutivamente activada, activan la señalización de Wnt/ β -catenina en células de mamífero y embriones de *Xenopus* (Tamai *et al.* (2004) Nature 407:530).

50 Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "trastornos relacionados con la señalización de Wnt" se refiere a enfermedades y afecciones asociadas con una señalización de Wnt aberrante, incluidas pero no limitadas a cánceres (por ejemplo, carcinomas colorrectales (CRC), melanoma, cáncer de mama, hepático, pulmonar y gástrico; otras enfermedades proliferativas no oncogénicas, tales como trastornos proliferativos de la piel (por ejemplo, psoriasis, dermatitis); la osteoporosis; la osteoartritis, trastornos fibróticos; la esquizofrenia, la enfermedad vascular, la cardiopatía; el crecimiento anormal del cabello o problemas de crecimiento del cabello; la cicatrización de heridas; las necrosis regenerativas (hígado, pulmón, miembros); y enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer. La regulación positiva aberrante de la señalización de Wnt está asociada con el cáncer, la osteoartritis y la enfermedad poliquística renal, mientras que la regulación negativa aberrante de la señalización de Wnt se ha relacionado con la osteoporosis, la obesidad, la diabetes y enfermedades degenerativas neuronales.

65 Tal como se utiliza en el presente documento, "cánceres relacionados con la señalización de Wnt" incluye pero no se limita a los carcinomas colorrectales (CRC), el melanoma, el cáncer de mama, hepático, pulmonar y gástrico. La expresión "cáncer relacionado con Wnt", tal como se utiliza en el presente documento también incluye el

meduloblastoma maligno y otros tumores primarios neuroectodérmicos malignos del SNC, el rabdomiosarcoma, el cáncer pulmonar, los tumores de origen intestinal, incluidos pero no limitados al cáncer de esófago, estómago, páncreas y del sistema de conductos biliares; los cánceres de próstata y vejiga; el cáncer de colon; las leucemias y otras neoplasias hematológicas (por ejemplo, la leucemia linfocítica crónica (CLL), la leucemia mielógena aguda (AML), la leucemia linfocítica aguda (ALL), la leucemia mielógena crónica (CML) y los síndromes mielodisplásicos (MDS)); y los linfomas (por ejemplo, el linfoma de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin).

Tal como se utiliza en el presente documento, "modular" indica la capacidad de controlar o influir, directa o indirectamente, y a modo de ejemplos no limitativos, puede referirse de manera alternativa, a inhibir o estimular, actuar como agonista o actuar como antagonista, obstaculizar o promover, y fortalecer o debilitar.

Tal como se utiliza en el presente documento, "actuar como antagonista" indica la capacidad de inhibir o detener, por ejemplo, una vía de señalización tal como Wnt. A modo de ejemplo, una molécula antagonista de unión a LRP6 puede evitar la transducción de señales a través de la vía de señalización de Wnt, por ejemplo, interfiriendo con la capacidad de LRP6 para unirse a miembros de la vía Wnt (por ejemplo, los ligandos DKK1 (dickkopf 1), DKK2, DKK4, SOST1, SOSD1 (USAG1), sFRP (proteína soluble relacionada con Fzd) 1-4, Wise o Wnt), y promoviendo así la fosforilación y degradación de la β -catenina.

Tal como se utiliza en el presente documento, "actuar como agonista" indica la capacidad de generar, promover, potenciar o facilitar, por ejemplo, una vía de señalización tal como Wnt. A modo de ejemplo, una molécula agonista de unión a LRP6 de la invención puede promotor o potenciar la transducción de señales a través de la vía de señalización de Wnt, por ejemplo, facilitando la capacidad de LRP6 de unirse a miembros de la vía Wnt (por ejemplo, los ligandos DKK1 (dickkopf 1), DKK2, DKK4, SOST1, SOSD1 (USAG1), sFRP (proteína soluble relacionada con Fzd) 1-4, Wise o Wnt), y evitando así la fosforilación y degradación de la β -catenina (permitiendo así que la β -catenina alcance el núcleo de la célula y se una a factores de transcripción).

Tal como se utiliza en el presente documento, "trastornos fibróticos" se refiere a cualquier trastorno fibrótico en seres humanos caracterizado por la excesiva proliferación de fibroblastos o miofibroblastos y producción de matriz del tejido conectivo, incluido colágeno, fibronectina y glicosaminoglicanos (GAG). Dichos trastornos incluyen pero no se limitan a: formación de queloides cutáneos; esclerosis sistémica progresiva (PSS); cirrosis hepática; fibrosis pulmonar idiopática y de origen medicamentoso; enfermedad crónica de injerto contra hospedador; esclerodermia (local y sistémica); enfermedad de Peyronie; estenosis uretral tras una cistoscopia; adherencias internas posquirúrgicas; fibrosis retroperitoneal idiopática y de origen medicamentoso; y mielofibrosis.

Tal como se utiliza en el presente documento, "trastornos fibróticos" también incluye, pero no se limita a, trastornos fibróticos pulmonares (por ejemplo, la fibrosis inducida por radiación, y la fibrosis asociada con el asma, la EPOC y la sarcoidosis); trastornos fibróticos hepáticos (por ejemplo, alcohólico, asociado a la hepatitis C, y fibrosis biliar primaria, así como la esteatosis no alcohólica, la colangitis esclerosante y la fibrosis resultante de la esquistosomiasis); trastornos fibróticos renales (por ejemplo, la nefropatía diabética, la glomeruloesclerosis lúpica, el síndrome de Alport y el rechazo de aloinjerto renal crónico); trastornos fibróticos cardiovasculares (por ejemplo, las cicatrices tras un infarto de miocardio, la hipertrofia cardíaca, la restenosis arterial y la aterosclerosis); trastornos fibróticos cutáneos (por ejemplo, la cicatrización hipertrófica, cicatrices por quemadura y dermatopatía fibrosante nefrogénica); trastornos fibróticos oculares (por ejemplo, vitreorretinopatía y fibrosis retroorbital)

Una "dosis terapéuticamente eficaz" de molécula de unión a LRP6 puede dar como resultado una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad (por ejemplo, una disminución de los síntomas de los trastornos asociados con una señalización de Wnt anormalmente alta (por ejemplo, una disminución del número, velocidad de crecimiento o malignidad de las células tumorales), o de los síntomas de los trastornos asociados con una señalización de Wnt anormalmente baja (por ejemplo, aumento de los niveles de LDL y triglicéridos)), un aumento de la frecuencia y duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debido a las dolencias de la enfermedad.

El término "sujeto" pretende incluir organismos, por ejemplo, eucariotas, que padecen o que están aquejados de una enfermedad, trastorno o afección asociada con una señalización de Wnt aberrante. Los ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, por ejemplo, seres humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales no humanos transgénicos. En determinadas formas de realización, el sujeto es un ser humano, por ejemplo, un ser humano que padece, que corre el riesgo de padecer, o que tiene posibilidades de padecer cáncer (por ejemplo, cáncer de colon) y otras enfermedades proliferativas, osteoporosis, y esquizofrenia, y otras enfermedades o afecciones descritas en el presente documento (por ejemplo, un trastorno relacionado con la señalización de Wnt).

El término "anticuerpo" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo intacto o a un fragmento de unión al antígeno (es decir, "porción de unión al antígeno") o a una sola cadena (es decir, la cadena ligera o pesada) del mismo. Un anticuerpo intacto es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante

de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales ("framework regions", FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR dispuestas del extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden intervenir en la unión de la inmunoglobulina a factores o tejidos del hospedador, incluidas diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, las células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

La expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que conservan la capacidad de unirse específicamente a un determinado antígeno (por ejemplo, hLRP6). Las funciones de unión al antígeno de un anticuerpo pueden ser realizadas por fragmentos de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de unión comprendidos dentro de la expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y CH1; un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab (generalmente uno de una cadena pesada y uno de una cadena ligera) unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo de dominio único (dAb) (Ward *et al.*, 1989 Nature 341:544-546), que consiste en un dominio V_H; y una región determinante de complementariedad aislada (CDR).

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector peptídico artificial que permite producirlos como una sola cadena proteica en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.*, 1988 Science 242:423-426; y Huston *et al.*, 1988 Proc Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Tales anticuerpos monocatenarios incluyen una o más "porciones de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos se criban para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Las porciones de unión al antígeno también pueden incorporarse en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136). Las porciones de unión al antígeno de los anticuerpos puede injertarse en andamiajes basados en polipéptidos tales como fibronectina de tipo III (Fn3) (véase la patente de EE.UU. nº 6.703.199, que describe monocuerpos polipeptídicos de fibronectina).

Las porciones de unión al antígeno pueden incorporarse en moléculas monocatenarias que comprenden un par de segmentos de Fv en tándem (V_H-CH1-V_H-CH1) que, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementaria, forman un par de regiones de unión al antígeno (Zapata *et al.*, 1995 Protein Eng. 8(10):1057-1062; y la patente de EE.UU. nº 5.641.870).

La expresión "anticuerpo de camélido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de una proteína anticuerpo intacto obtenida de miembros de la familia del camello y el dromedario (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromaderius*), incluidos miembros del Nuevo Mundo, tales como las especies de llamas (*Paccos Lama*, *Lama glama* y *Lama vicugna*). Puede obtenerse por ingeniería genética una región del anticuerpo de camélido que es el dominio variable único pequeño, identificada como V_{HH}, para producir una proteína pequeña que tiene alta afinidad por una diana, lo que da como resultado una proteína derivada de anticuerpo de bajo peso molecular conocida como "nanocuerpo de camélido". Véase la patente de EE.UU. nº 5.759.808; véase también Stijlemans *et al.*, 2004 J. Biol. Chem. 279:1256-1261; Dumoulin *et al.*, 2003 Nature 424:783-788; Pleschberger *et al.*, 2003 Bioconjugate Chem. 14:440-448; Cortez-Retamozo *et al.*, 2002 Int. J. Cancer 89: 456-62; y Lauwereys *et al.*, 1998 EMBO J. 17: 3512-3520.

Una "molécula aislada de unión a LRP6", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de unión que carece prácticamente de moléculas con especificidades antigénicas para antígenos distintos de LRP6 (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hLRP6 carece prácticamente de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de hLRP6). Sin embargo, una molécula aislada de unión que se une específicamente a hLRP6 puede presentar reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de LRP6 de otras especies. Una molécula de unión está "purificada" si carece prácticamente de material celular.

La expresión "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una sola especificidad de unión y afinidad por un epítipo concreto.

5 La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos con regiones variables en las que las regiones estructural y CDR se derivan de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de tales secuencias humanas, por ejemplo, secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutadas de las secuencias de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o dirigida *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se han injertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamíferos, tal como un ratón, en las secuencias estructurales humanas.

15 La expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a un anticuerpo que presenta una única especificidad de unión que tiene regiones variables en las que las regiones estructural y CDR se derivan de secuencias humanas. En una forma de realización, el anticuerpo monoclonal humano es producido por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano (por ejemplo, un ratón transgénico con un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada y un transgén de la cadena ligera humanas) fusionado a una célula inmortalizada.

25 La expresión "anticuerpo humano recombinante", tal como se utiliza en el presente documento, incluye cualquier anticuerpo humano que se prepara, expresa, crea o aísla por medios recombinantes, tal como un anticuerpo aislado de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo; un anticuerpo aislado a partir de una célula hospedadora transformada para que exprese el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma; un anticuerpo aislado de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria recombinante; y un anticuerpo preparado, expresado, creado o aislado por cualquier otro medio que implique corte y empalme de la totalidad o de una porción de una secuencia génica de una inmunoglobulina humana con otra secuencia de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones estructural y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en determinadas formas de realización, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos en un ser humano.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgE, IgG tal como IgG1 o IgG4) que está codificado por el gen de la región constante de la cadena pesada.

40 Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se utilizan indistintamente en el presente documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno."

45 Tal como se utiliza en el presente documento, una molécula de unión a LRP6 (por ejemplo, un anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo) que "se une específicamente a LRP6" pretende referirse a una molécula de unión a LRP6 que se une a LRP6 con una K_D de 1×10^{-7} M o inferior. Una molécula de unión a LRP6 (por ejemplo, un anticuerpo) que "presenta reacción cruzada con un antígeno" pretende referirse a una molécula de unión a LRP6 que se une a ese antígeno con una K_D de 1×10^{-6} M o inferior. Una molécula de unión a LRP6 (por ejemplo, un anticuerpo) que "no presenta reacción cruzada" con un determinado antígeno pretende referirse a una molécula de unión a LRP6 que, o bien no se une de forma detectable al determinado antígeno, o se une con una K_D de 1×10^{-5} M o superior. En determinadas formas de realización, tales moléculas de unión que no presentan reacción cruzada con el antígeno presentan una unión básicamente indetectable contra estas proteínas en ensayos de unión convencionales.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "alta afinidad", cuando se refiere a un anticuerpo IgG, indica que el anticuerpo tiene una K_D de 10^{-9} M o inferior para un antígeno diana.

60 Se dice que una secuencia nucleotídica está "optimizada" si se ha modificado para que codifique una secuencia de aminoácidos que utiliza los codones que son preferentes en la célula u organismo de producción, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de una levadura tal como *Pichia*, una célula de insecto, una célula de mamífero tal como células de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia nucleotídica optimizada se diseña para que codifique una secuencia de aminoácidos idéntica o casi idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia nucleotídica de partida original, que también se conoce como secuencia "parental".

65

En las siguientes subsecciones se describen con mayor detalle diversos aspectos de la invención.

En la técnica se conocen ensayos convencionales para evaluar la capacidad de las moléculas para unirse a LRP6 de diversas especies, y epítomos concretos de LRP6, incluidos, por ejemplo, los ELISA y las transferencias de western. La determinación de si una molécula de unión a LRP6 se une a un epítomo específico de LRP6 puede emplear un ensayo de competición por epítomo peptídico. Por ejemplo, se incubaba una molécula de unión a LRP6 con un péptido correspondiente a un epítomo de LRP6 de interés a concentraciones de saturación del péptido. La molécula de unión a LRP6 preincubada se ensaya para la unión a LRP6 inmovilizada, por ejemplo, mediante análisis Biacore®. La inhibición de la unión a LRP6 por preincubación con el péptido indica que la molécula de unión a LRP6 se une al epítomo peptídico (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. 20070072797). La cinética de unión también puede evaluarse mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como mediante análisis Biacore® o unión aparente mediante análisis FACS. A continuación se describen con mayor detalle los ensayos para evaluar los efectos de las moléculas de unión a LRP6 sobre las propiedades funcionales de LRP6.

Por consiguiente, se entenderá que una molécula de unión a LRP6 que "inhibe" una o más de estas propiedades funcionales de LRP6 (por ejemplo, la actividad bioquímica, celular, fisiológica u otras actividades biológicas, o similares), tal como se determina según metodologías conocidas en la técnica y que se describen en el presente documento, produce una disminución estadísticamente significativa de la propiedad funcional concreta en comparación con la observada en ausencia de la molécula de unión (por ejemplo, cuando se encuentra presente una molécula de control de especificidad irrelevante). Una molécula de unión a LRP6 que inhibe la actividad de LRP6 logra una disminución estadísticamente significativa de este tipo en al menos un 5% del parámetro medido. En determinadas formas de realización, un anticuerpo antagonista u otra molécula de unión a LRP6 puede producir una disminución de la propiedad funcional seleccionada de al menos un 10%, 20%, 30% ó 50% en comparación con el control.

En algunas formas de realización, la inhibición de LRP6 se determina midiendo los niveles de proteínas o la estabilidad de las proteínas en la vía de señalización de Wnt (por ejemplo, Wnt, Wise, DKK1, DKK2, DKK4, SOST1, SOSD1 (USAG1), sFRP (proteína soluble relacionada con Fzd) 1-4 Axin o β -catenina). En otras formas de realización, los cambios biológicos, fisiológicos y/o morfológicos indican que la molécula de unión a LRP6 inhibe LRP6, por ejemplo, para inhibir el crecimiento de una célula tumoral o para inducir la apoptosis en una célula tumoral; o para disminuir la densidad mineral ósea.

En algunas formas de realización, la inhibición de LRP6 se determina midiendo los niveles de expresión o estabilidad de los mensajes ARNm o proteínas corriente abajo en la vía de señalización de Wnt (por ejemplo, Axin, AXIN2, β -catenina, VEGF, cMyc, ciclina D1, SNAIL). En otras formas de realización, los cambios biológicos, fisiológicos y/o morfológicos indican que la molécula de unión a LRP6 inhibe la señalización de Wnt, por ejemplo, disminuye la densidad mineral ósea o la secreción de insulina normales.

Anticuerpos

Los anticuerpos anti-LRP6 descritos en el presente documento incluyen anticuerpos monoclonales humanos. En algunas formas de realización, las porciones de unión al antígeno de los anticuerpos que se unen a LRP6 (por ejemplo, las cadenas V_H y V_L) se "mezclan y aparean" para crear otras moléculas de unión anti-LRP6. La unión de tales anticuerpos "mezclados y apareados" puede ensayarse utilizando los ensayos de unión anteriormente mencionados (por ejemplo, FACS, ELISA). Cuando se selecciona una V_H para que se mezcle y aparee con una secuencia V_L concreta, por lo general se selecciona una V_H que sea estructuralmente similar a la V_H que sustituye en el apareamiento con esa V_L . Asimismo, una secuencia de cadena pesada de longitud completa de un apareamiento concreto cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa se sustituye generalmente con una secuencia de cadena pesada de longitud completa estructuralmente similar. Asimismo, una secuencia V_L de un apareamiento concreto V_H/V_L , debe reemplazarse con una secuencia V_L estructuralmente similar. Asimismo, una secuencia de cadena ligera de longitud completa de un apareamiento concreto cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa debe reemplazarse con una secuencia de cadena ligera de longitud completa estructuralmente similar. La identificación de la similitud estructural en este contexto es un proceso bien conocido en la técnica.

En otros aspectos, los anticuerpos proporcionados comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y la cadena ligera de uno o más anticuerpos de unión a LRP6, en diversas combinaciones. Dado que cada uno de estos anticuerpos pueden unirse a LRP6 y que la especificidad de unión al antígeno es proporcionada principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias CDR1, 2 y 3 de V_H y las secuencias CDR1, 2 y 3 de V_L pueden "mezclarse y aparearse" (es decir, las CDR de diferentes anticuerpos pueden mezclarse y aparearse). La unión a LRP6 de tales anticuerpos "mezclados y apareados" puede ensayarse utilizando los ensayos de unión descritos en el presente documento (por ejemplo, ELISA). Cuando se mezclan y aparean secuencias CDR de V_H , la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_H concreta debe reemplazarse con una secuencia o secuencias CDR estructuralmente similares. Asimismo, cuando se mezclan y aparean secuencias CDR de V_L , la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_L concreta debe reemplazarse con una secuencia o

secuencias CDR estructuralmente similares. La identificación de la similitud estructural en este contexto es un proceso bien conocido en la técnica.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo humano comprende las regiones variables de la cadena pesada o ligera, o las cadenas pesada o ligera de longitud completa que son "el producto de" o "se derivan de" una secuencia de la línea germinal concreta si las regiones variables o cadenas de longitud completa del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que utiliza genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana como fuente de las secuencias. En uno de tales sistemas, se genera un anticuerpo humano en un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana. El transgénico se inmuniza con el antígeno de interés (por ejemplo, un epítipo de hLRP6 descrito en el presente documento). Como alternativa, se identifica un anticuerpo humano proporcionando una genoteca de inmunoglobulinas humanas presentada en fagos y cribando la biblioteca con el antígeno de interés (por ejemplo, hLRP6 o un epítipo de hLRP6 descrito en el presente documento).

15 Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas de la línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana que sea la secuencia más cercana posible (es decir, el mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana concreta puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia codificada por la línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas naturales o mutaciones dirigidas artificiales. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado tiene por lo general una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 90% a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana y contiene restos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se comparan con las secuencias de aminoácido de inmunoglobulina de la línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de la línea germinal murina). En determinados casos, un anticuerpo humano puede ser idéntico en al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos un 95%, o incluso al menos un 96%, 97%, 98%, ó 99% en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

30 El porcentaje de identidad entre dos secuencias está en función del número de posiciones de identidad compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = n° de posiciones de identidad/ n° total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se determinan utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (1988 Comput. Appl. Biosci., 4:11-17) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla PAM120 de restos en peso, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.

40 Por lo general, una V_H o V_L de un anticuerpo humano derivado de una secuencia de la línea germinal humana concreta no presentará más de 10 diferencias de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En determinados casos, la V_H o V_L del anticuerpo humano puede presentar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 ó 1 diferencias de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

45 Anticuerpos de camélido

Se han caracterizado proteínas anticuerpo obtenidas de miembros de la familia del camello y del dromedario (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromaderius*), incluidos los miembros del Nuevo Mundo, tales como las especies de llamas (*Lama paccos*, *Lama glama* y *Lama vicugna*), con respecto al tamaño, la complejidad estructural y la antigenicidad para los sujetos humanos. Determinados anticuerpos IgG encontrados en la naturaleza en esta familia de mamíferos carecen de cadenas ligeras, y por tanto son estructuralmente distintos de la estructura cuaternaria de cuatro cadenas que tiene dos cadenas pesadas y dos ligeras típica de los anticuerpos de otros animales. Véase el documento WO 94/04678.

55 Puede obtenerse por ingeniería genética una región del anticuerpo de camélido que es el dominio variable único pequeño, identificado como V_{HH} para que produzca una proteína pequeña con alta afinidad por una diana, lo que da como resultado una proteína derivada de anticuerpo de bajo peso molecular, conocida como "nanocuerpo de camélido". Véase la patente de EE.UU. n° 5.759.808; véase también Stijlemans *et al.*, 2004 J. Biol. Chem. 279: 1256-1261; Dumoulin *et al.*, 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger *et al.*, 2003 Bioconjugate Chem. 14: 440-448; Cortez-Retamozo *et al.*, 2002 Int. J. Cancer 89: 456-62; y Lauwereys *et al.*, 1998 EMBO J. 17:3512-3520. Se dispone en el mercado de bibliotecas diseñadas de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de camélido, por ejemplo, de Ablynx, Gante, Bélgica. Al igual que con otros anticuerpos de origen no humano, puede modificarse por recombinación una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de camélido para obtener una secuencia que se asemeje más a una secuencia humana, es decir, el nanocuerpo puede "humanizarse". Por lo tanto, puede reducirse adicionalmente la baja antigenicidad natural de los anticuerpos de camélido contra seres humanos.

65

El nanocuerpo de camélido tiene un peso molecular de aproximadamente una décima parte de una molécula de IgG humana, y la proteína tiene un diámetro físico de sólo unos pocos nanómetros. Una consecuencia del pequeño tamaño es la capacidad de los nanocuerpos de camélido para unirse a sitios antigénicos que son funcionalmente invisibles para proteínas anticuerpo más grandes, es decir, los nanocuerpos de camélido son útiles como reactivos para detectar antígenos que, si no, quedan ocultos utilizando las técnicas inmunológicas clásicas, y como posibles agentes terapéuticos. Por lo tanto, otra consecuencia del pequeño tamaño es que un nanocuerpo de camélido puede inhibir como resultado de su unión a un sitio específico en un surco o hendidura estrecha de una proteína diana, y por lo tanto puede servir para desempeñar una función que se asemeja más a la función de un fármaco de bajo peso molecular clásico que la de un anticuerpo clásico.

El bajo peso molecular y el tamaño compacto dan como resultado adicionalmente que los nanocuerpos de camélido sean extremadamente termoestables, estables a pH extremo y a la digestión proteolítica, y poco antigénicos. Otra consecuencia es que los nanocuerpos de camélido se desplazan fácilmente desde el sistema circulatorio al interior de los tejidos, e incluso cruzan la barrera hematoencefálica y pueden tratar trastornos que afectan al tejido nervioso. Los nanocuerpos pueden facilitar adicionalmente el transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica. Véase la publicación de patente de EE.UU. nº 20040161738, publicada el 19 de agosto de 2004. Estas características combinadas con la baja antigenicidad en seres humanos indican un gran potencial terapéutico. Además, estas moléculas pueden expresarse íntegramente en células procariontas tales como *E. coli*.

Un anticuerpo o nanocuerpo de camélido puede producirse de forma natural en un animal camélido, es decir, es producido por el camélido tras la inmunización con LRP6 o un fragmento peptídico de la misma, utilizando las técnicas descritas en el presente documento para otros anticuerpos. Como alternativa, el nanocuerpo de camélido anti-LRP6 se diseña, es decir, se produce por selección, por ejemplo, a partir de una biblioteca de fagos que presentan proteínas nanocuerpo de camélido apropiadamente mutagenizadas utilizando procedimientos de selección ("panning") con LRP6 o un epítipo de LRP6 descrito en el presente documento como diana. Los nanocuerpos diseñados pueden adaptarse adicionalmente mediante ingeniería genética para aumentar la semivida en un sujeto receptor de 45 minutos a dos semanas.

Diacuerpos

Los diacuerpos son moléculas biespecíficas bivalentes en las que los dominios V_H y V_L se expresan en una única cadena polipeptídica, conectados por un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Los dominios V_H y V_L se aparean con los dominios complementarios de otra cadena, creando así dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Holliger *et al.*, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:6444-6448; Poljak *et al.*, 1994 Structure 2:1121-1123). Pueden producirse diacuerpos expresando dos cadenas polipeptídicas, con la estructura $V_{HA}-V_{LB}$ y $V_{HB}-V_{LA}$ (configuración V_H-V_L) o $V_{LA}-V_{HB}$ y $V_{LB}-V_{HA}$ (configuración V_L-V_H) dentro de la misma célula. La mayoría de ellos pueden expresarse en forma soluble en bacterias.

Los diacuerpos monocatenarios (scDb) se producen conectando las dos cadenas polipeptídicas que forman el diacuerpo con un conector de aproximadamente 15 restos de aminoácidos (véase Holliger y Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(3-4): 128-30; Wu *et al.*, 1996 Immunotechnology, 2(1):21-36). Los scDb pueden expresarse en bacterias en forma monomérica activa soluble (véase Holliger y Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(34): 128-30; Wu *et al.*, 1996 Immunotechnology, 2(1): 21-36; Pluckthun y Pack, 1997 Immunotechnology, 3(2): 83-105; Ridgway *et al.*, 1996 Protein Eng., 9(7): 617-21).

Un diacuerpo puede fusionarse a Fc para generar un "di-diacuerpo" (véase Lu *et al.*, 2004 J. Biol. Chem., 279(4): 2856-65).

Anticuerpos diseñados y modificados

Puede prepararse un anticuerpo de la invención utilizando como material de partida un anticuerpo que tenga una o más secuencias V_H y/o V_L para diseñar un anticuerpo modificado, anticuerpo modificado que puede tener propiedades modificadas respecto al anticuerpo de partida. Puede diseñarse un anticuerpo modificando uno o más restos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones estructurales. Además o como alternativa, puede diseñarse un anticuerpo modificando los restos dentro de la(s) región(es) constante(s), por ejemplo para modificar la(s) función(es) efectora(s) del anticuerpo.

Un tipo de diseño de la región variable que puede realizarse es el injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de restos de aminoácidos que se encuentran en las seis CDR de la cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de anticuerpos naturales específicos construyendo vectores de expresión que incluyan secuencias CDR del anticuerpo natural específico injertado en secuencias estructurales de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann *et al.*, 1998 Nature 332:323-327;

Jones *et al.*, 1986 Nature 321:522-525; Queen *et al.*, 1989 Proc. Natl. Acad. Véase el documento U.S.A. 86:10029-10033; la patente de EE.UU. nº 5.225.539, y las patentes de EE.UU. nº 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370).

5 Las secuencias estructurales pueden obtenerse a partir de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen las secuencias génicas de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, pueden encontrarse las secuencias de ADN de la línea germinal de los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humanas en la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "VBase" (disponible en Internet en www.mrcpcpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación del NIH nº 91-3242; Tomlinson *et al.*, 1992, J. Mol. Biol. 227: 776-798; y Cox *et al.*, 1994, Eur. J. Immunol. 24: 827-836.

15 Las secuencias CDR1, 2 y 3 de V_H y las secuencias CDR1, 2 y 3 de V_L pueden injertarse en regiones estructurales que tengan una secuencia idéntica a la que se encuentra en el gen de la inmunoglobulina de la línea germinal de la que se deriva la secuencia estructural, o las secuencias CDR pueden injertarse en regiones estructurales que contengan una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha descubierto que en determinados casos resulta beneficioso mutar restos dentro de las regiones estructurales para mantener o potenciar la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370).

20 Las CDR también pueden injertarse en regiones estructurales de polipéptidos distintos de los dominios de inmunoglobulina. Los andamiajes apropiados forman una región estructural conformacionalmente estable que presenta los restos injertados de manera que formen una superficie localizada y se unan a la diana de interés (por ejemplo, LRP6). Por ejemplo, las CDR pueden injertarse en un andamiaje en el que las regiones estructurales se basen en fibronectina, ankirina, lipocalina, neocarzinostaina, citocromo b, dedo de zinc de CP1, PST1, superhélice, LACI-D1, dominio Z o tendramistat (véase por ejemplo, Nygren y Uhlen, 1997, Current Opinion in Structural Biology, 7, 463-469).

25 Otro tipo de modificación de la región variable es la mutación de restos de aminoácidos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V_H y/o V_L para mejorar así una o más propiedades de unión (por ejemplo, la afinidad) del anticuerpo de interés, conocida como "maduración de afinidad". Puede realizarse la mutagénesis dirigida o la mutagénesis por PCR para introducir la(s) mutación(es), y puede evaluarse el efecto sobre la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe en el presente documento. Pueden introducirse modificaciones conservadoras. Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos. Además, por lo general no se modifican más de uno, dos, tres, cuatro o cinco restos dentro de una región CDR.

30 Los anticuerpos diseñados de la invención incluyen aquellos en los que se han realizado modificaciones en los restos estructurales dentro de V_H y/o V_L, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Por lo general, tales modificaciones estructurales se realizan para que disminuya la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque consiste en "retromutar" uno o más restos estructurales a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más concretamente, un anticuerpo que ha sido sometido a mutación somática puede contener restos estructurales que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Tales restos pueden identificarse comparando las secuencias estructurales de los anticuerpos con las secuencias de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región estructural a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas pueden "retromutarse" a la secuencia de la línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida o mutagénesis por PCR. Tales anticuerpos "retromutados" también pretenden quedar abarcados por la invención.

35 Otro tipo de modificación estructural implica mutar uno o más restos dentro de la región estructural, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar los epítopos de linfocitos T para reducir así la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se conoce como "desinmunización" y se describe con mayor detalle en la publicación de patente de EE.UU. nº 20030153043 de Carr *et al.*

40 Además de o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro de las regiones estructurales o CDR, los anticuerpos de la invención pueden diseñarse para que incluyan modificaciones dentro de la región Fc, por lo general para modificar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, pueden fijarse al anticuerpo uno o más restos químicos) o modificarse para modificar su glicosilación, de nuevo para modificar una o más propiedades funcionales del anticuerpo.

45 En una forma de realización, la región bisagra de CH1 se modifica de manera que se modifique el número de restos de cisteína en la región bisagra, por ejemplo, aumente o disminuya. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente de EE.UU. nº 5.677.425 de Bodmer *et al.* El número de restos de cisteína en la región

bisagra de CH1 se modifica para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

5 En otra forma de realización, se muta la región bisagra de Fc de un anticuerpo para que disminuya la semivida biológica del anticuerpo. Más concretamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento bisagra de Fc de manera que el anticuerpo presente una unión deficiente a la proteína A estafilocócica (SpA) en comparación con el dominio bisagra de Fc nativo de unión a SpA. Este enfoque se describe con mayor detalle en la patente de EE.UU. nº 6.165.745 de Ward *et al.*

10 En otra forma de realización, el anticuerpo se modifica para que aumente su semivida biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.277.375 describe las siguientes mutaciones en una IgG que aumentan su semivida *in vivo*: T252L, T254S, T256F. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, puede modificarse el anticuerpo dentro de la región CH1 o CL para que contenga un epítipo de unión al receptor de rescate sacado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.869.046 y 6.121.022 de Presta *et al.*

15 En otras formas de realización, la región Fc se modifica sustituyendo al menos un resto de aminoácido con un resto de aminoácido diferente para modificar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, pueden sustituirse uno o más aminoácidos con un resto de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una afinidad modificada por un ligando efector, pero conserve la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector para el que se modifica la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con mayor detalle en las patentes de EE.UU. nº 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter *et al.*

20 En otra forma de realización, pueden sustituirse uno o más aminoácidos seleccionados de entre los restos de aminoácidos con un resto de aminoácido diferente, de manera que el anticuerpo tenga una unión modificada a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o suprimida. Este enfoque se describe con mayor detalle en la patente de EE.UU. nº 6.194.551 de Idusogie *et al.*

25 En otra forma de realización, se modifican uno o más restos de aminoácidos para modificar así la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en el documento WO 94/29351 de Bodmer *et al.*

30 En otra forma de realización, se modifican uno o más restos de aminoácidos para modificar así la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en el documento WO 94/29351 de Bodmer *et al.*

35 En otra forma de realización, la región Fc se modifica para que aumente la capacidad del anticuerpo para intervenir en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe adicionalmente en el documento WO 00/42072 de Presta. Por otra parte, se han mapeado los sitios de unión en la IgG1 humana para FcγR1, FcγRII, FcγRIII y FcRn y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, R.L. *et al.*, 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

40 En otra forma de realización más, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, puede prepararse un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede modificarse, por ejemplo, para que aumente la afinidad del anticuerpo por un antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos puede lograrse, por ejemplo, modificando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región estructural de la región variable para eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Se describe un enfoque de este tipo con mayor detalle en las patentes de EE.UU. nº 5.714.350 y 6.350.861 de Co *et al.*

45 Además, o como alternativa, puede prepararse un anticuerpo que tenga un tipo de glicosilación modificada, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de restos fucosilo o un anticuerpo con un aumento de estructuras con GlcNAc de bisección. Tales patrones de glicosilación modificada han demostrado aumentar la capacidad ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora que tenga la maquinaria de glicosilación modificada. Se han descrito en la técnica células con la maquinaria de glicosilación modificada, y pueden utilizarse como células hospedadoras en las que expresar los anticuerpos recombinantes de la invención para producir así un anticuerpo con glicosilación modificada. Por ejemplo, en el documento EP 1.176.195 de Hang *et al.* se describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil transferasa, de manera que los anticuerpos expresados en una línea celular de este tipo presentan hipofucosilación. En la publicación PCT WO 03/035835 de Presta se describe una variante de la línea celular CHO, células Lecl3, con disminución de la capacidad para fijar la fucosa a los carbohidratos unidos a Asn(297), que también da como resultado la hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R.L. *et al.*, 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740). En el documento WO 99/54342 de Umana *et al.* se describen líneas celulares diseñadas para que expresen glicosil transferasas que modifican las glicoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares

diseñadas presenten un aumento de estructuras con GlcNAc de bisección que da como resultado un aumento de la actividad ADCC de los anticuerpos (véase también Umaña *et al.*, 1999, Nat Biotech. 17:176-180).

5 Otra modificación de los anticuerpos del presente documento que se contempla es la pegilación. Un anticuerpo puede pegilarse para que, por ejemplo, aumente la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, se hace reaccionar por lo general con polietilenglicol (PEG), tal como un derivado éster o aldehído reactivo de PEG, en condiciones en las que uno o más restos PEG se fijan al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La pegilación puede llevarse a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero hidrosoluble reactivo análogo). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivatizar otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En determinadas formas de realización, el anticuerpo a pegar es un anticuerpo aglicosilado. En la técnica se conocen métodos de pegilación de proteínas y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 154 316 de Nishimura *et al.* y EP 0 401 384 de Ishikawa *et al.*

Además, la pegilación puede conseguirse en cualquier parte de un polipéptido de unión a LRP6 de la invención introduciendo un aminoácido no natural. Pueden introducirse determinados aminoácidos no naturales mediante la tecnología descrita en Deiters *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 125:11782-11783, 2003; Wang y Schultz, Science 301:964-967, 2003; Wang *et al.*, Science 292:498-500, 2001; Zhang *et al.*, Science 303:371-373, 2004 o en la patente de EE.UU. nº 7.083.970. En resumen, algunos de estos sistemas de expresión implican la mutagénesis dirigida para introducir un codón sin sentido, tal como un ámbar TAG, en el marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de la invención. A continuación, tales vectores de expresión se introducen en un hospedador que puede utilizar un ARNt específico para el codón sin sentido introducido, y se cargan con el aminoácido no natural de elección. Los aminoácidos no naturales concretos que son beneficiosos a objeto de conjugar restos con los polipéptidos de la invención incluyen aquellos con cadenas laterales de acetileno y azido. Los polipéptidos que contienen estos aminoácidos novedosos pueden pegilarse en estos sitios elegidos en la proteína.

Métodos de diseño de anticuerpos

30 Tal como se ha analizado anteriormente, pueden utilizarse anticuerpos anti-LRP6 para crear nuevos anticuerpos anti-LRP6 modificando las secuencias de la cadena pesada y/o de la cadena ligera de longitud completa, las secuencias V_H y/o V_L , o la(s) región(es) constante(s) fijada(s) a las mismas. Por ejemplo, pueden combinarse una o más regiones CDR de los anticuerpos por recombinación con regiones estructurales conocidas y/u otras CDR para crear nuevos anticuerpos anti-LRP6 diseñados por recombinación. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de diseño es una o más de las secuencias V_H y/o V_L , o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo diseñado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias V_H y/o V_L , o una o más regiones CDR de las mismas. Más bien, se utiliza la información contenida en la(s) secuencia(s) como material de partida para crear una(s) secuencia(s) de "segunda generación" derivada(s) de la(s) secuencia(s) original(es) y, a continuación, la(s) secuencia(s) de "segunda generación" se prepara(n) y expresa(n) como una proteína.

45 Pueden utilizarse técnicas convencionales de biología molecular para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo modificada. El anticuerpo codificado por la(s) secuencia(s) de anticuerpo modificada(s) es aquel que conserva una, algunas o todas las propiedades funcionales del anticuerpo anti-LRP6 del que se deriva, propiedades funcionales que incluyen, pero no se limitan a, unirse específicamente a LRP6, interferir con la capacidad de LRP6 para unirse a los miembros de la vía Wnt (por ejemplo, los ligandos DKK1 (dickkopf 1), DKK2, DKK4, SOST1, SOSD1 (USAG1), sFRP (proteína soluble relacionada con Fzd) 1-4, Wise o Wnt), y modular la fosforilación y la degradación de la β -catenina. Las propiedades funcionales de los anticuerpos modificados pueden evaluarse utilizando los ensayos convencionales disponibles en la técnica y/o descritos en el presente documento (por ejemplo, ELISA).

55 En determinadas formas de realización de los métodos de diseño de anticuerpos de la invención, pueden introducirse mutaciones al azar o de manera selectiva a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia que codifica un anticuerpo anti-LRP6 y los anticuerpos anti-LRP6 modificados resultantes pueden cribarse para determinar su actividad de unión y/u otras propiedades funcionales (por ejemplo, la unión específica a LRP6, la interferencia con la capacidad de LRP6 para unirse a los miembros de la vía Wnt (por ejemplo, los ligandos DKK1 (dickkopf 1), DKK2, DKK4, SOST1, SOSD1 (USAG1), sFRP (proteína soluble relacionada con Fzd) 1-4, Wise o Wnt), y modular la fosforilación y la degradación de la β -catenina) como se describe en el presente documento. Se han descrito en la técnica métodos mutacionales. Por ejemplo, en la publicación PCT WO 02/092780 de Short se describen métodos para crear y cribar mutaciones de anticuerpos utilizando mutagénesis por saturación, ensamblaje sintético por ligación o una combinación de los mismos. Como alternativa, en el documento WO 03/074679 de Lazar *et al.* se describen métodos de uso de métodos computacionales de cribado para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

Moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención

Otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de unión a LRP6 de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o pueden ser ácidos nucleicos en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico "está aislado" o "se hace sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas convencionales, incluido el tratamiento alcalino/SDS, bandedo con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel, *et al.*, ed. 1987, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener, o no, secuencias intrónicas. En una forma de realización, el ácido nucleico es una molécula de ADNc. El ácido nucleico puede estar presente en un vector tal como un vector de presentación en fagos, o en un vector plásmido recombinante.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse mediante técnicas convencionales de biología molecular. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana como se describe más adelante), pueden obtenerse ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo generado por el hibridoma mediante técnicas convencionales de amplificación por PCR o de clonación de ADNc. Para los anticuerpos obtenidos a partir de una genoteca de inmunoglobulinas (por ejemplo, mediante técnicas de presentación en fagos), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede recuperarse a partir de diversos clones de fagos que son miembros de la genoteca.

Una vez se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L , estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas convencionales de ADN recombinante, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de las cadenas de anticuerpo de longitud completa, en genes del fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, se une operativamente un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H a otra molécula de ADN, o a un fragmento que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un conector flexible. La expresión "unido operativamente", tal como se utiliza en este contexto, pretende referirse a que los dos fragmentos de ADN se unen de manera funcional, por ejemplo, de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanezcan "in-frame", o de manera que la proteína se exprese bajo el control de un promotor deseado.

El ADN aislado que codifica la región V_H puede convertirse en un gen de la cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica V_H a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). En la técnica se conocen las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana (véase, por ejemplo, Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación del NIH nº 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede unirse operativamente a otra molécula de ADN que codifica sólo la región constante de CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región V_L puede convertirse en un gen de la cadena ligera de longitud completa (así como en un gen de la cadena ligera de Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica V_L a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. En la técnica se conocen las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana (véase, por ejemplo, Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación del NIH nº 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L se unen operativamente a otro fragmento que codifica un conector flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)₃, de manera que las secuencias V_H y V_L puedan expresarse como una proteína monocatenaria contigua, uniéndose las regiones V_L y V_H mediante el conector flexible (véase, por ejemplo, Bird *et al.*, 1988, *Science* 242:423-426; Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, 1990, *Nature* 348:552-554).

Generación de anticuerpos monoclonales

Pueden producirse anticuerpos monoclonales (AcMo) mediante diversas técnicas, incluida la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica convencional de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein (1975, *Nature*, 256:495), o mediante métodos de presentación de bibliotecas, tal como presentación en fagos.

Un sistema animal para la preparación de hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento bien establecido. En la técnica se conocen protocolos de inmunización y técnicas para

el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión. También se conocen parejas de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

5 Los anticuerpos híbridos o humanizados de la presente invención pueden prepararse en base a la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse a partir del hibridoma murino de interés y diseñarse para que contengan secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) mediante técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo híbrido, las regiones variables murinas pueden unirse a regiones constantes humanas utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.816.567 de Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas pueden insertarse en una región estructural humana utilizando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.225.539, y las patentes de EE.UU. nº 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370.

15 En una determinada forma de realización, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Pueden generarse tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra LRP6 utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados en el presente documento ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en el presente documento "ratones con Ig humana".

25 El ratón HuMAb[®] (Medarex, Inc.) contiene miniloci de genes de inmunoglobulina humana que codifican las secuencias de inmunoglobulina de la cadena pesada (μ y γ) y ligera κ humanas sin reordenar, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de la cadena μ y κ (véase, por ejemplo, Lonberg *et al.*, 1994, Nature 368(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones presentan una expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanas introducidos experimentan conmutación de clase y mutación somática para generar un anticuerpo monoclonal IgGk humano de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.*, 1994 *supra*; revisado en Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N., 1995 Ann. N.Y. Acad. Sci. 764: 536-546). La preparación y el uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas que portan tales ratones, se describe adicionalmente en Taylor, L. *et al.*, 1992 Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Chen, J. *et al.*, 1993 International Immunology 5:647-656; Tuailleon *et al.*, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 94:3720-3724; Choi *et al.*, 1993 Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. *et al.*, 1993 EMBO J. 12:821-830; Tuailleon *et al.*, 1994 J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.*, 1994 International Immunology 579-591; y Fishwild, D. *et al.*, 1996 Nature Biotechnology 14:845-851. Véanse también las patentes de EE.UU. nº 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay; la patente de EE.UU. nº 5.545.807 de Surani *et al.*; las publicaciones PCT nº WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y la publicación PCT nº WO 01/14424 nº de Korman *et al.*

40 En otra forma de realización, pueden generarse anticuerpos humanos de la invención utilizando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porta un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Tales ratones, denominados en el presente documento "ratones KM", se describen detalladamente en el documento WO 02/43478.

45 Aún más, se dispone en la técnica de sistemas alternativos de animales transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana, y pueden utilizarse para generar los anticuerpos anti-LRP6 de la invención. Por ejemplo, puede utilizarse un sistema transgénico alternativo conocido como XenoMouse[®] (Abgenix, Inc.). Tales ratones se describen en, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati *et al.*

50 Por otra parte, se dispone en la técnica de sistemas alternativos de animales transcromosómicos que expresan genes de inmunoglobulina humana, y pueden utilizarse para generar los anticuerpos anti-LRP6 de la invención. Por ejemplo, pueden utilizarse ratones que portan tanto un transcromosoma de la cadena pesada humana como un transcromosoma de la cadena ligera humana, conocidos como "ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka *et al.*, 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97:722-727. Además, se han descrito en la técnica vacas que portan transcromosomas de la cadena pesada y ligera humana (Kuroiwa *et al.*, 2002 Nature Biotechnology 20:889-894), y pueden utilizarse para generar los anticuerpos anti-LRP6 de la invención.

60 Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse utilizando métodos de presentación en fagos para el cribado de bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner *et al.*; las patentes de EE.UU. nº 5.427.908 y 5.580.717 de Dower *et al.*; las patentes de EE.UU. nº 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty *et al.*; y las patentes de EE.UU. nº 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths *et al.* Las bibliotecas pueden cribarse para determinar la unión a LRP6 longitud completa o a un epítipo concreto de LRP6.

65

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también puede prepararse utilizando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de manera que pueda generarse una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Tales ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson *et al.*

5

Generación de anticuerpos monoclonales humanos en ratones con Ig humana

Puede utilizarse como antígeno LRP6 humana recombinante purificada expresada en células procariotas (por ejemplo, *E. coli*) o en células eucariotas (por ejemplo, células de mamífero, por ejemplo, células HEK293). La proteína puede conjugarse con un transportador, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH).

10

Los anticuerpos monoclonales completamente humanos contra LRP6 se preparan utilizando cepas HCo7, HCo12 y HCo7 de ratones transgénicos HuMab y la cepa KM de ratones transcromosómicos transgénicos, cada una de las cuales expresa genes de anticuerpos humanos. En cada una de estas cepas de ratón, el gen endógeno de la cadena ligera kappa de ratón puede alterarse homocigóticamente como se describe en Chen *et al.*, 1993 EMBO J. 12:811-820 y el gen endógeno de la cadena pesada de ratón puede alterarse homocigóticamente como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01109187. Cada una de estas cepas de ratón porta un transgén de la cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild *et al.*, 1996 Nature Biotechnology 14:845-851. La cepa HCo7 porta el transgén de la cadena pesada humana HCo7 como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.545.806; 5.625.825; y 5.545.807. La cepa HCo12 porta el transgén de la cadena pesada humana HCo12 como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/09187. La cepa HCo17 porta el transgén de la cadena pesada humana HCo17. La cepa KNM contiene el transcromosoma SC20 como se describe en el documento WO 02/43478.

15

20

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos contra LRP6, se inmuniza a ratones HuMab y ratones KM con LRP6 recombinante purificada, un fragmento de LRP6, o un conjugado de los mismos (por ejemplo, LRP6-KLH) como antígeno. Los esquemas generales de inmunización para los ratones HuMab se describen en Lonberg, N. *et al.*, 1994 Nature 368(6474):856-859; Fishwild, D. *et al.*, 1996 Nature Biotechnology 14:845-851 y en el documento WO 98/24884. Los ratones tienen 6-16 semanas de edad en la primera infusión de antígeno. Se utiliza una preparación recombinante purificada (de 5 µg-50 µg) del antígeno para inmunizar a los ratones HuMab y ratones KM en la cavidad peritoneal, por vía subcutánea (Sc) o mediante inyección en la almohadilla plantar.

25

30

Se inmuniza a los ratones transgénicos dos veces con antígeno en adyuvante completo de Freund o adyuvante Ribi, en la cavidad peritoneal (IP), por vía subcutánea (Sc) o en la almohadilla plantar (FP), seguido de 3-21 días de inmunización IP, Sc o FP (hasta un total de 11 inmunizaciones) con el antígeno en adyuvante incompleto de Freund o adyuvante de Ribi. La respuesta inmunitaria se supervisa mediante sangrados retroorbitales. El plasma se criba mediante ELISA, y para las fusiones se utilizan los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-LRP6. Se refuerza por vía intravenosa a los ratones con antígeno 3 y 2 días antes del sacrificio y la extirpación del bazo. Por lo general, se realizan 10-35 fusiones para cada antígeno. Se inmuniza a varias decenas de ratones para cada antígeno. Se inmuniza a un total de 82 ratones de las cepas de ratones HCo7, HCo12, HCo17 y KM con LRP6.

35

40

Para seleccionar los ratones HuMab o KM que producen anticuerpos que se unen a LRP6, los sueros de ratones inmunizados pueden ensayarse mediante ELISA como describen Fishwild, D. *et al.*, 1996. En resumen, se recubren placas de microtitulación con LRP6 recombinante purificada a 1 µg/ml-2 µg/ml en PBS, se incuban 50 µl/pocillo a 4°C durante la noche y, a continuación, se bloquean con 200 µl/pocillo de suero de pollo al 5% en PBS/Tween (0,05%).

45

Se añaden a cada pocillo diluciones de plasma para los ratones inmunizados con LRP6 y se incuban durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavan con PBS/Tween y, a continuación, se incuban con un anticuerpo policlonal de cabra contra Fc de IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se desarrollan las placas con sustrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) y se analizan con espectrofotómetro a una DO de 415-495. Para las fusiones se utilizan los esplenocitos de los ratones que desarrollaron los títulos más elevados de anticuerpos anti-LRP6. Se realizan las fusiones y se ensayan los sobrenadantes de los hibridomas para determinar su actividad anti-LRP6 mediante ELISA.

50

55

Los esplenocitos de ratón, aislados de los ratones HuMab y ratones KM, se fusionan con PEG a una línea celular de mieloma de ratón basándose en protocolos convencionales. A continuación, los hibridomas resultantes se criban para determinar la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Se fusionan suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de los ratones inmunizados a una cuarta parte del número de células de mieloma de ratón no secretoras SP2/0 (ATCC, CRL 1581) con PEG al 50% (Sigma). Las células se siembran en placas a aproximadamente 1x10⁵/pocillo en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de aproximadamente dos semanas de incubación en medio selectivo que contiene suero bovino fetal al 10%, medio acondicionado para P388D 1 al 10% (ATCC, CRL TIB-63), Origen[®] al 3%-5% (IGEN) en DMEM (Mediatech, CRL 10013, con alto contenido de glucosa, L-glutamina y piruvato sódico) más HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 µg/ml de gentamicina y 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Al cabo de 1-2 semanas, las células se cultivan en un medio en el que

60

65

el HAT se reemplaza con HT. A continuación, se criban los pocillos individuales mediante ELISA para detectar los anticuerpos IgG monoclonales anti-LRP6 humanos. Una vez que se produce un extenso crecimiento de hibridomas, el medio se supervisa por lo general al cabo de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos se vuelven a sembrar en placas, se criban de nuevo y, si todavía son positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales anti-LRP6 se subclonan al menos dos veces mediante dilución limitante. A continuación, los subclones estables se cultivan *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para una caracterización posterior.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos

Para generar hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales humanos de la invención, pueden aislarse esplenocitos y/o células de nódulos linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden cribarse para determinar la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados a una sexta parte del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580), con PEG al 50%. Las células se siembran en placas a aproximadamente 2 x 145 en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene suero fetal Clone al 20%, medio acondicionado "653" al 18%, Origen[®] al 5% (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina, 50 µg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Al cabo de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en un medio en el que el HAT se reemplaza con HT. A continuación, pueden cribarse los pocillos individuales mediante ELISA para determinar los anticuerpos IgM e IgG monoclonales humanos. Una vez que se produce un extenso crecimiento de hibridomas, el medio puede observarse por lo general después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos pueden volver a sembrarse en placas, cribarse de nuevo y, si todavía son positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse al menos dos veces mediante dilución limitante. A continuación, los subclones estables pueden cultivarse *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para la caracterización.

Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, los hibridomas seleccionados pueden cultivarse en matraces de agitación de dos litros para purificar el anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). Puede comprobarse la IgG eluida mediante electroforesis en gel y cromatografía de líquidos de alto rendimiento para asegurar la pureza. La solución tampón puede cambiarse a PBS, y la concentración puede determinarse mediante DO₂₈₀ utilizando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en alícuotas y almacenarse a -80°C.

Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la invención también puede producirse en un transfectoma de célula hospedadora utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como se conoce bien en la técnica (por ejemplo, Morrison, 1985 Science 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, pueden obtenerse ADN que codifican cadenas ligera y pesada de longitud parcial o completa, mediante técnicas convencionales de biología molecular (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc utilizando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADN pueden insertarse en vectores de expresión de manera que los genes se unan operativamente a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, la expresión "unido operativamente" pretende referirse a que un gen de anticuerpo se liga en un vector de manera que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector sirvan para su función prevista de regular la transcripción y la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión utilizada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o, más generalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpos se insertan en el vector de expresión mediante métodos convencionales (por ejemplo, la ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento de gen del anticuerpo y vector, o la ligación de extremos romos si no hay sitios de restricción). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden utilizarse para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican las regiones constante de la cadena pesada y constante de la cadena ligera del isotipo deseado, de manera que el segmento V_H quede unido operativamente al segmento o segmentos CH dentro del vector y el segmento V_L quede unido operativamente al segmento CL dentro del vector. Además o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo a partir de una célula hospedadora. El gen de la cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido señal quede unido "in-frame" al extremo amino terminal del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de las cadenas de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de las cadenas de anticuerpo en una célula hospedadora. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de las cadenas de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. 1990 Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA). Los expertos en la materia entenderán que el diseño del vector de expresión, incluida la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel deseado de expresión de proteína, etc. Las secuencias reguladoras para la expresión en células hospedadoras de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus de simio 40 (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal del adenovirus (AdMLP)), y polioma. Como alternativa, pueden utilizarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor ubiquitina o el promotor P-globina. Aún más, pueden utilizarse elementos reguladores compuestos por secuencias de diferentes fuentes, tal como el sistema promotor SRa, que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia humana de células T tipo 1 (Takebe *et al.*, 1988 Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Además de los genes de las cadenas de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4.399.216; 4.634.665; y 5.179.017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, por lo general el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el vector o vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una gran diversidad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección con DEAE-dextrano, y similares. Es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras procariontas o eucariotas. Se analiza la expresión de anticuerpos en células eucariotas, en particular células hospedadoras de mamífero, porque es más probable que tales células eucariotas y, en particular las células de mamífero, ensamblen y secreten un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo que las células procariontas. Se ha informado que la expresión en procariontas de genes de anticuerpos es ineficaz para producir altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss y Wood, 1985 Immunology Today 6:12-13).

Las células hospedadoras de mamífero para la expresión de los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) (incluidas células CHO dhfr, descritas en Urlaub y Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77:4216-4220 utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NS0, otro sistema de expresión es el sistema de expresión de genes GS que se muestra en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338.841. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican los genes de anticuerpos se introducen en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que crecen las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo utilizando métodos convencionales de purificación de proteínas.

Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, la presente invención presenta moléculas biespecíficas que comprenden una molécula de unión a LRP6 (por ejemplo, un anticuerpo anti-LRP6, o un fragmento del mismo) de la invención. Una molécula de unión a LRP6 de la invención puede derivatizarse o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión o moléculas diana diferentes. De hecho, la molécula de unión a LRP6 de la invención puede derivatizarse o unirse a más de una de otras moléculas funcionales para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos sitios de unión y/o moléculas diana diferentes; tales moléculas multiespecíficas también pretenden quedar abarcadas por la expresión "molécula biespecífica" tal como se utiliza en el presente documento. Para crear una molécula biespecífica de la invención, puede unirse funcionalmente un anticuerpo de la invención (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más de otras moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de manera que se obtenga una molécula biespecífica.

Por consiguiente, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para un epítipo de LRP6 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo diana, en LRP6 o en otra proteína diana. A modo de ejemplo no limitativo, una molécula biespecífica de la invención es capaz de unirse tanto a la hélice 1 como a la hélice 3 de LRP6.

En una forma de realización, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden como especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluido, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o un Fv monocatenario. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o un constructo monocatenario como se describe en la patente de EE.UU. n° 4.946.778 de Ladner *et al.*

Las moléculas biespecíficas de la presente invención pueden prepararse conjugando las especificidades de unión integrantes utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y, a continuación, conjugarse una con otra. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, pueden utilizarse diversos agentes de acoplamiento o reticulación para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky *et al.*, 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu *et al.*, 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus, 1985, Behring Ins. Mitt. n° 78,118-132; Brennan *et al.*, 1985 Science 229:81-83), y Glennie *et al.*, 1987 J. Immunol. 139:2367-2375). Los agentes de conjugación son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden conjugarse mediante unión sulfhidrilo de las regiones bisagra C-terminales de las dos cadenas pesadas. En una forma de realización concreta, la región bisagra está modificada para que contenga un número impar de residuos sulfhidrilo, por ejemplo uno, antes de la conjugación.

Como alternativa, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula hospedadora. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión AcMo x AcMo, AcMo x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula monocatenaria que comprende un anticuerpo monocatenario y un determinante de unión, o una molécula biespecífica monocatenaria que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas monocatenarias. Se describen métodos para preparar moléculas biespecíficas por ejemplo en las patentes de EE.UU. n° 5.260.203; 5.455.030; 4.881.175; 5.132.405; 5.091.513; 5.476.786; 5.013.653; 5.258.498; y 5.482.858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas puede confirmarse mediante, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (REA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento), o ensayo de transferencia de western. Cada uno de estos ensayos detecta generalmente la presencia de complejos proteína-anticuerpo de interés particular empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés.

Ensayos funcionales

Las características funcionales de las moléculas de unión a LRP6 pueden ensayarse *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, las moléculas de unión pueden ensayarse para su capacidad de interferir con la capacidad de LRP6 para unirse a miembros de la vía Wnt (por ejemplo, los ligandos DKK1 (dickkopf 1), DKK2, DKK4, SOST1, SOSD1 (USA1), sFRP (proteína soluble relacionada con Fzd) 1-4, Wise o Wnt), o para modular procesos biológicos tales como la fosforilación y la degradación de la β -catenina, el crecimiento de células tumorales, la apoptosis, la regulación de la densidad mineral ósea, y la secreción de insulina.

La unión de LRP6 a miembros de la vía Wnt (por ejemplo, los ligandos DKK1 (dickkopf 1), DKK2, DKK4, SOST1, SOSD1 (USA1), sFRP (proteína soluble relacionada con Fzd) 4-1, Wise o Wnt) puede detectarse utilizando Biacore[®] inmovilizando dichos miembros de la vía Wnt en un soporte sólido y detectando la unión de LRP6 soluble a los mismos. Como alternativa, puede inmovilizarse la LRP6, y puede detectarse la unión del miembro de la vía Wnt a la misma. La unión LRP6/miembros de la vía Wnt también puede analizarse mediante ELISA (por ejemplo, detectando la unión de LRP6 a miembros de la vía Wnt inmovilizados), o mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Para realizar la FRET, puede detectarse la unión de LRP6 marcado con fluoróforo a miembros de la vía Wnt en solución (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.631.169).

La unión de LRP6 a miembros de la vía Wnt (por ejemplo, los ligandos DKK1 (dickkopf 1), DKK2, DKK4, SOST1, SOSD1 (USAG1), sFRP (proteína soluble relacionada con Fzd) 1-4, Wise o Wnt) también puede detectarse mediante métodos de "unión en líquido", es decir, la medición de la afinidad en un contexto líquido, en lugar de en un entorno inmovilizado. Dichos métodos son ofrecidos, por ejemplo, por BioVeris (en la actualidad Roche).

La unión de LRP6 a dichos miembros de la vía Wnt puede detectarse mediante coimmunoprecipitación (Lagacé *et al.*, 2006 J. Clin. Inv. 116(11):2995-3005). Para examinar la unión LRP6-miembros de la vía Wnt de esta manera, se cultivan células HepG2 en medio empobrecido en colesterol durante 18 horas. Se añade al medio LRP6 purificada en presencia de cloroquina 0,1 mM y se incuban las células durante una hora. Se lisan las células en un detergente suave (digitonina al 1% p/vol). Se inmunoprecipita la LRP6 o un miembro de la vía Wnt a partir de los lisados celulares, se separa mediante SDS-PAGE, y se somete a inmunoblot para detectar la presencia de dicho miembro de vía Wnt o LRP6 coimmunoprecipitado, respectivamente (Lagacé *et al.*, 2006 J. Clin. Inv. 116(11):2995-3005). Estos ensayos pueden llevarse a cabo con una forma mutante de LRP6 que se una al miembro de la vía Wnt con una avidéz mayor (Lagacé *et al.*, 2006, *supra*).

Las moléculas de unión a LRP6 pueden ensayarse para su capacidad de aumentar o disminuir los niveles de miembros de la vía Wnt dentro de dichas células. Por ejemplo, las células se cultivan en medio empobrecido en colesterol (DMEM complementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de sulfato de estreptomycin, y 1 g/l de glucosa, suero deficiente en lipoproteína de ternero recién nacido (NCLPDS) al 5% (vol/vol), compactina sódica 10 µM, y mevalonato sódico 50 µM) durante 18 horas para inducir la expresión del miembro de la vía Wnt. Se añade al medio LRP6 purificada (5 µg/ml). Se determinan los niveles de miembro de la vía Wnt en las células recolectadas 0, 0,5, 1, 2 y 4 horas después de la adición de LRP6 (Lagacé *et al.*, 2006 J. Clin. Inv. 116(11):2995-3005). Los niveles de miembros de la vía Wnt pueden determinarse mediante citometría de flujo, FRET, inmunoblotting, u otros medios.

Las moléculas de unión a LRP6 pueden ensayarse para su capacidad de aumentar o disminuir la fosforilación de LRP6 inducida por Wnt, y la estabilización de la β-catenina, expresión del gen indicador o del gen diana.

La unión de LRP6 a miembros de la vía Wnt puede detectarse por la producción de preparaciones de membrana celular que contienen LRP6 y ensayarse para su capacidad de unirse a dichas preparaciones en comparación con preparaciones de membrana celular que no contienen LRP6. O mediante análisis FACS de células con LRP6 endógena o células con LRP6 sobreexpresada.

Los anticuerpos anti-LRP6 pueden ensayarse por su capacidad para inhibir el crecimiento de tumores dependientes de Wnt en ratones. Por ejemplo, la inhibición del crecimiento tumoral de tumores WNT1-MMTV por los anticuerpos anti-LRP6. La inhibición del crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto de tumor (por ejemplo, modelos de xenoinjerto SCID, modelos de xenoinjerto ortotópico, etc.) es otro entorno en el que los anticuerpos anti-LRP6 pueden ensayarse por su capacidad para inhibir el crecimiento de tumores dependientes de Wnt.

Los anticuerpos anti-LRP6 pueden ensayarse por su capacidad para inhibir el crecimiento de tumores dependientes de Wnt *in vitro*, tal como la inhibición de la formación de colonias en agar blando.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene una o una combinación de moléculas de unión a LRP6 (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, o porción(es) de unión al antígeno de los mismos), de la presente invención, formulada junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir una o una combinación de (por ejemplo, dos o más) moléculas de unión diferentes. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos o agentes que se unen a diferentes epítopos en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en una terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, para un tratamiento contra el cáncer, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-LRP6 (por ejemplo, un anticuerpo antagonista de LRP6) combinado con al menos otro agente quimioterapéutico. Los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden utilizarse en una terapia de combinación se describen con mayor detalle más adelante en la sección sobre los usos de los agentes de la invención.

Tal como se utiliza en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. El vehículo debe ser adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo puede recubrirse con un material que proteja el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del precursor y que no produce ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., *et al.*, 1977

J. Pharm. Sci. 66:1-19). Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y similares. Las sales de adición de base incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio, y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína, y similares.

Una composición farmacéutica de la invención puede incluir también un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tal como oleato de etilo. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, utilizando materiales de recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones, y utilizando tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, humectantes, emulsionantes y dispersantes. Puede asegurarse evitar la presencia de microorganismos tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra*, como incluyendo diversos antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares. Además, puede lograrse una absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable incluyendo agentes que retardan la absorción tales como, monoestearato de aluminio y gelatina.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En la técnica se conoce el uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse en las composiciones compuestos activos complementarios.

Las composiciones terapéuticas deben ser por lo general estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una elevada concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, utilizando un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones, y utilizando tensioactivos. En muchos casos, pueden incluirse en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico. Puede lograrse una absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son el secado a vacío y criodesecación (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material transportador para producir una forma de dosificación unitaria variará en función del sujeto a tratar, y del modo de administración concreto. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material transportador para producir una forma de dosificación unitaria será generalmente aquella cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por cien, esta cantidad variará entre aproximadamente un 0,01 por ciento y aproximadamente un noventa y nueve por ciento de principio activo, entre aproximadamente un 0,1 por ciento y aproximadamente un 70 por ciento, o entre aproximadamente un 1 por ciento y aproximadamente un 30 por ciento de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las pautas posológicas se ajustan para que proporcionen la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o puede reducirse o aumentarse proporcionalmente la dosis según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de dosis. "Forma de dosificación unitaria" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para que produzca el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. La especificación para las formas de dosificación unitarias de la invención vienen dictadas por y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico concreto a conseguir, y de las limitaciones inherentes a la técnica de preparación de un compuesto activo de este tipo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Para la administración del anticuerpo, la pauta varía entre aproximadamente 0,0001 mg/kg y 100 mg/kg, y más habitualmente entre 0,01 mg/kg y 5 mg/kg, de peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las pautas pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal ó 10 mg/kg de peso corporal o estar dentro del intervalo de 1 mg/kg-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar supone la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Las pautas posológicas para la molécula de unión a LRP6 de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, dándose el anticuerpo utilizando una de las siguientes pautas de dosificación: cada cuatro semanas durante seis dosificaciones, a continuación, cada tres meses; cada tres semanas; 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más moléculas de unión (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado está incluida en los intervalos indicados. La molécula de unión a LRP6 suele administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, trimestrales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares según lo indicado midiendo los niveles sanguíneos de la molécula de unión a LRP6 en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para conseguir una concentración en plasma de la molécula de unión a LRP6 de aproximadamente 1 µg/ml-1.000 µg/ml y en algunos métodos aproximadamente 25 µg/ml-300 µg/ml.

Como alternativa, puede administrarse una molécula de unión a LRP6 como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se necesita una administración menos frecuente. La dosis y frecuencia varían dependiendo de la semivida de la molécula de unión a LRP6 en el paciente. En general, los anticuerpos humanos presentan la semivida más larga, seguido de los anticuerpos humanizados, los anticuerpos híbridos y los anticuerpos no humanos. La dosis y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En las aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En las aplicaciones terapéuticas, se necesita a veces una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, o hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.

Los niveles de dosis reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse a fin de obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración concretos, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosis seleccionado estará en función de diversos factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones concretas de la presente invención empleadas, o el éster, la sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto concreto empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones concretas empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud general y el historial médico previo del paciente a tratar, y factores similares bien conocidos en medicina.

Una composición de la presente invención puede administrarse por una o más vías de administración utilizando uno o más de diversos métodos conocidos en la técnica. Como entenderá el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración para las moléculas de unión a LRP6 de la invención incluyen la vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales, por ejemplo mediante inyección o infusión. La expresión "administración parenteral" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Como alternativa, una molécula de unión a LRP6 de la invención puede administrarse por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

5 Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protejan al compuesto frente a la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes, parches transdérmicos, y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como etilvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

15 Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos mostrados en las patentes de EE.UU. nº 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824 ó 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: la patente de EE.UU. nº 4.487.603, que muestra una bomba de microinfusión implantable para dosificar la medicación a una velocidad controlada; la patente de EE.UU. nº 4.486.194, que muestra un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de EE.UU. nº 4.447.233, que muestra una bomba de infusión de medicación para administrar la medicación a una velocidad de infusión precisa; la patente de EE.UU. nº 4.447.224, que muestra un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; la patente de EE.UU. nº 4.439.196, que muestra un sistema osmótico de administración de fármaco que tiene compartimientos de cámaras múltiples; y la patente de EE.UU. nº 4.475.196, que muestra un sistema osmótico de administración de fármaco. Los expertos en la materia conocen muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos de este tipo.

25 En determinadas formas de realización, pueden formularse moléculas de unión a LRP6 de la invención para asegurar una distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente al interior de células u órganos específicos, potenciando así la administración dirigida del fármaco (véase, por ejemplo, V.V. Ranade, 1989 J. Cline Pharmacol. 29:685). Los restos de direccionamiento ejemplares incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.416.016 de Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, 1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.*, 1995 FEBS Lett. 357:140; M. Owais *et al.*, 1995 Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor de la proteína surfactante A (Briscoe *et al.*, 1995 Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier *et al.*, 1994 J. Biol. Chem. 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen, 1.994 FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273.

40 Usos de la invención

45 Las moléculas de unión a LRP6 descritas en el presente documento tienen utilidades diagnósticas y terapéuticas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, o a un sujeto, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir o diagnosticar diversos trastornos. Las moléculas de unión a LRP6 son particularmente adecuadas para el tratamiento de pacientes humanos que padecen "trastornos relacionados con la señalización de Wnt", es decir, aquellas enfermedades y afecciones asociadas con la señalización aberrante de Wnt. La regulación positiva aberrante de la señalización de Wnt está asociada con el cáncer, la osteoartritis y la enfermedad renal poliquística, afecciones que serían particularmente susceptibles de tratamiento mediante la administración de moléculas antagonistas de unión a LRP6.

55 Las moléculas antagonistas de unión a LRP6 pueden utilizarse para diagnosticar, mejorar los síntomas de, proteger frente a, y tratar trastornos de la señalización de Wnt asociados con niveles anormalmente altos de la vía Wnt uniéndolas, de una manera específica de Wnt1, a la primera hélice de LRP6.

60 Los "cánceres relacionados con la señalización de Wnt" que son susceptibles de tratamiento mediante la administración de las moléculas de unión a LRP6 de la invención incluyen pero no se limitan a cánceres de colon (por ejemplo, carcinomas colorrectales (CRC)), melanoma, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer pulmonar, cáncer gástrico, meduloblastoma maligno y otros tumores neuroectodérmicos primarios malignos del SNC, rabdomiosarcoma, tumores derivados del intestino (incluidos pero no limitados al cáncer de esófago, estómago, páncreas y sistema de conductos biliares), y cánceres de próstata y vejiga.

65 De manera relacionada, las moléculas antagonistas de unión a LRP6 de la invención son capaces de inhibir el crecimiento de una célula tumoral, o de inducir la apoptosis en, o inhibir la angiogénesis de, una célula tumoral. A modo de ejemplo, puede ponerse en contacto una célula tumoral con una molécula antagonista de unión a LRP6 (por ejemplo, una molécula de unión a LRP6 que incluya una porción de unión al antígeno de un anticuerpo que se

une específicamente a una LRP6), evitando así la transducción de señales de la vía Wnt dentro de la célula tumoral, al estabilizar el complejo de destrucción de β -catenina y suscitar la fosforilación y la degradación de la β -catenina.

5 Cuando las moléculas de unión a LRP6 se administran junto con otro agente, los dos pueden administrarse secuencialmente en cualquier orden o simultáneamente. En algunas formas de realización, se administra una molécula de unión a LRP6 a un sujeto que también está recibiendo tratamiento con un segundo agente. Dicho segundo agente puede ser un agente quimioterapéutico, en el caso de los cánceres. Un régimen de terapia de combinación puede ser aditivo, o puede producir resultados sinérgicos (por ejemplo, aumento de la densidad mineral ósea, o de la secreción de insulina, o de la apoptosis de las células cancerosas mayores de lo esperado para el uso combinado de los dos agentes).

15 Las moléculas de unión de la invención pueden utilizarse para detectar los niveles de LRP6. Esto puede conseguirse, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra (tal como una muestra *in vitro*) y una muestra de control con la molécula de unión a LRP6 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre la molécula de unión y LRP6. Se detecta cualquier complejo formado entre la molécula y LRP6 y se compara en la muestra y el control. Por ejemplo, pueden realizarse métodos de detección convencionales, bien conocidos en la técnica, tales como ensayos ELISA y de citometría de flujo, utilizando las composiciones de la invención.

20 También se describen kits que consisten en las composiciones de la invención y en instrucciones de uso. El kit puede contener adicionalmente al menos un reactivo adicional, o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo con una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno diana distinto del primer anticuerpo). Los kits incluyen por lo general una etiqueta que indique el uso previsto del contenido del kit. El término "etiqueta" incluye cualquier escrito o material grabado suministrado sobre o dentro del kit, o que acompaña de otra manera al kit.

25 La invención que se ha descrito completamente, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y reivindicaciones, que son ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Los expertos en la materia reconocerán o serán capaces de determinar, no utilizando más que la experimentación de rutina, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en el presente documento.

30

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación de anticuerpos antagonistas anti-LRP6 específicos de Wnt

35 Se descubrió que los Fab antagonistas anti-LRP6 inhibían de manera preferente la señalización de Wnt inducida por Wnt1 o Wnt3a. Se transfectaron de manera transitoria células 293T con plásmidos de expresión de Wnt1 o Wnt3a junto con los indicadores SuperTopflash y SV40-Renilla. Se representó gráficamente la relación de señal luciferasa entre las células tratadas con los Fab anti-LRP6 y las células tratadas con el Fab control anti-lisozima (FabControl).

40

Las proteínas de la vía de señalización de Wnt que son capaces de señalización de Wnt canónica pueden dividirse en dos clases. Se bloquearon Wnt3 y Wnt3a mediante anticuerpos antagonistas de LRP6 específicos de Wnt3a. Se bloquearon otras proteínas Wnt (Wnt1, 2, 6, 7A, 7B, 9, 10A, 10B) mediante anticuerpos antagonistas de LRP6 específicos de Wnt1.

45

Los experimentos se realizaron mediante transfección transitoria de células 293T con diferentes constructos Wnt y *frizzled* junto con SuperTopflash y SV40-Renilla, y tratamiento con un panel de Fab antagonistas de LRP6. En la Tabla II se muestra la relación de señal luciferasa entre las células tratadas con los Fab anti-LRP6 y las células tratadas con el Fab control anti-lisozima (FabControl):

50

55

60

65

TABLA II

	Wnt3	Wnt3A	Wnt1	Wnt2 +Fzd8	Wnt6 +Fzd8	Wnt7A +Fzd8	Wnt7B +Fzd8	Wnt9A +Fzd10	Wnt10A +Fzd5	Wnt10B +Fzd8
Fab003	2%	3%	64%	76%	66%	89%	79%	49%	87%	84%
Fab004	1%	3%	87%	102%	89%	95%	96%	73%	120%	85%
Fab023	9%	23%	62%	79%	76%	96%	75%	81%	130%	72%
Fab015	83%	77%	1%	1%	2%	14%	34%	8%	23%	23%
Fab016	73%	76%	1%	0%	2%	13%	30%	5%	10%	19%
Fab019	66%	70%	1%	1%	2%	13%	29%	13%	16%	23%
Fab020	68%	69%	1%	1%	2%	13%	29%	17%	19%	18%
FabControl	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Ejemplo 2: Identificación de anticuerpos anti-LRP6 específicos de Wnt

5 Se identificaron Fab agonistas anti-LRP6. Se trataron células 293T-STF con los anticuerpos indicados (1 ug/ml), y medio acondicionado para Wnt3a al 0% ó al 5% durante la noche, y se midió la actividad luciferasa. Se representó gráficamente la relación de señal luciferasa entre las células tratadas con Fab anti-LRP6 y las células tratadas con el Fab control anti-lisozima (FabControl) a la concentración de Wnt3a indicada.

Ejemplo 3: Mapeo del dominio de LRP6 y determinación de epítomos

10 El mapeo del dominio de los mutantes por delección de LRP6 utilizando análisis FACS revela que los anticuerpos antagonistas de LRP6 específicos de Wnt1 se unen a la hélice 1, y que los anticuerpos antagonistas de LRP6 específicos de Wnt3a y los anticuerpos agonistas de LRP6 se unen a la hélice 3. Se transfectaron de manera transitoria células 293T con constructos de expresión de LRP6 mutante o de tipo silvestre marcados con Flag en el extremo N-terminal junto con MESD. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-Flag y los Fab indicados y se analizaron mediante FACS. Fab025 y Fab026 representan dos anticuerpos agonistas de LRP6. Fab010 y Fab021 representan dos anticuerpos antagonistas de LRP6 específicos de Wnt1. Fab002 y Fab004 representan dos anticuerpos antagonistas de LRP6 específicos de Wnt3a. Fab005 representa un anticuerpo antagonista de LRP6 que inhibe la señalización inducida tanto por Wnt3a como por Wnt1. La Tabla III muestra la capacidad de unión relativa entre los Fab anti-LRP6 y los mutantes por truncamiento de LRP6 (estos datos tabulares corresponden a los análisis FACS). El símbolo "-" Indica que no hay actividad, y el símbolo "+" indica actividad (más símbolos para más actividad).

TABLA III

	Agonista	Antagonista de Wnt1	Antagonista de Wnt3A	Antagonista de Wnt1 parcial, de Wnt3A
25 LRP6 longitud completa	+++	+++	+++	+++
LRP6 del I	+++	--	+++	+++
30 LRP6 del II	+++	+++	+++	+++
LRP6 del III	--	+++	--	++
LRP6 del I-II	+++	--	+++	+++
LRP6 del I-III	--	--	--	--

35 Tal como se describe a lo largo de toda la solicitud, los Fab capaces de unirse a la hélice 1 de LRP6 actúan con especificidad para Wnt1 (entre ellos, los Fab específicos de Wnt1 Fab010 y Fab021), mientras que los Fab que se unen a la hélice 3 de LRP6 actúan con especificidad para Wnt3A (entre ellos, los Fab específicos de Wnt3A Fab002 y Fab004). Como se ha demostrado en el presente documento, la actividad de señalización específica de Wnt3 y Wnt3a puede ser inhibida con mayor eficacia por una molécula antagonista de unión a LRP6 específica de Wnt3a; y la actividad de señalización específica de Wnt1, Wnt2, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b y Wnt10 puede ser inhibida con mayor eficacia por una molécula antagonista de unión a LRP6 específica de Wnt1. Se cree que las moléculas agonistas de unión a LRP6 (por ejemplo, Fab025 y Fab026) no son específicas de Wnt, y que se unen a la tercera hélice de LRP6 (es decir, pierden la capacidad de unirse a LRP6 sólo cuando se deleciona la hélice 3 (representada en LRP6 del III)).

Ejemplo 4: La oligomerización de LRP6 potencia la señalización de Wnt

50 Los anticuerpos antagonistas de LRP6 muestran actividad agonista cuando se convierten en IgG. Se transfectaron células 293T con Wnt1 o Wnt3a junto con el indicador SuperTopflash, y se trataron con anticuerpos antagonistas de LRP6. La actividad luciferasa se normalizó frente al control anti-lisozima (FabControl). Una vez convertidos en IgG, los anticuerpos antagonistas específicos de Wnt1 muestran actividad agonista en el ensayo de Wnt3a, mientras que los anticuerpos antagonistas específicos de Wnt3a muestran actividad agonista en el ensayo de Wnt1. Estas observaciones son coherentes con la observación de que Wnt1 y Wnt3a se unen a diferentes regiones de LRP6 para la señalización, y que la oligomerización de LRP6 potencia la señalización de Wnt. Por ejemplo, las IgG antagonistas específicas de Wnt1 inhiben la señalización de Wnt1 bloqueando la interacción física entre Wnt1 y LRP6. Sin embargo, los anticuerpos específicos de Wnt1 no bloquean la interacción Wnt3a-LRP6, y en cambio, inducen la oligomerización de LRP6. Esto conduce a una respuesta potenciada contra el ligando Wnt3a. Estos datos sugieren que la oligomerización de la LRP6 endógena aumenta la señalización de Wnt.

Ejemplo 5: Inhibición de la fosforilación de LRP6 y acumulación de β-catenina libre

65 Las células PA-1 son células de teratocarcinoma ovárico. Estas se trataron con una estimulación de seis horas de duración con una combinación de Fab004, Fab004 y Fab012. Las muestras de fosfo-LRP6 (pLRP6) y LRP6 se prepararon utilizando un tampón Triton-X de lisis de células enteras. Las muestras de IB de β-catenina se prepararon por fraccionamiento celular mediante múltiples congelaciones-descongelaciones en solución hipotónica.

ES 2 560 532 T3

Las células NCI-H929 son células de mieloma múltiple. Se utilizaron 4×10^6 células. Estas se preincubaron con proteína durante 30 minutos, seguido de una estimulación con Wnt3a de cuatro horas de duración (medio acondicionado al 50%). El fraccionamiento celular se realizó mediante congelación-descongelación múltiple en solución hipotónica, y la fracción de membrana se resuspendió en tampón Triton-X.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Molécula de unión al polipéptido proteína 6 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP6) que comprende una porción de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la primera hélice de LRP6, en la que la porción de unión al antígeno se une a un epítipo dentro de la hélice 1 de la LRP6 humana dentro de o solapando los aminoácidos 20-326 de

MGAVLRSLACSFVLLRAAPLLLYANRRDLRLVDATNGKENATIVVGGLEDA
 AAVDFVFSHGLIYWSDVSEEAIKRTEFNKTESVQNVVVSGLLSPDGLACDWLGE
 KLYWTDSETNRIEVSNDGSLRKVLFWQELDQPRAIALDPSSGFMYWTDWGEV
 PKIERAGMDGSSRFIIINSEIYWPNGLTLDYEEQKLYWADAKLNFIHKSNDLGTN
 RQAVVKGSLPHPFALTLFEDILYWDWSTHSILACNKYTGEGLREIHSDIFSPMDI
 HAFSQQRQPNATNPCGIDNGGCSHLCLMSPVKPFYQCACPTGVKLENGKTCK
 DGATELLLLARRTDLRRISLDTPDFTDIVLQLEDIRHAIADYDPVEGYIYWTDDE
 VRAIRRSFIDGSGSQFVVTQAIAHPDGIADVWVARNLYWTDGTGTDRIEVRTLNG
 TMRKILISEDLEEPRAIVLDPVMVGYMYWTDWGEIPKIERAALDGS DRVVLVNTS
 LGWPNGLALDYDEGKIYWGDAKTDKIEVMNTDGTGRRVVLVEDKIPHIFGFTLL
 GDYVYWTDWQRRSIEVHKRSAEREVIIDQLPDLMGLKATNVHRVIGSNPCE
 ENGGCSHLCLYRPQGLRCACPIGFELISDMKTCIVPEAFLLFSRRADIRRISETNN
 NNVAIPLTGVKEASALDFDVTDNRIYWTDISLKTISR AFMNGSALEHVVEFLD
 YPEGMAVDWLGNLYWADTGTNRIEVSKLDGQHRQVLVWKDLDSPRALALD
 PAEGFMYWTEWGGKPKIDRAAMDGsertTLVpNVGRANGLTIDYAKRRLYWT
 DLDTNLISSNMLGLNREVIADDLPHPFGLTQYQDYIYWTDWSRRSIERANKTS
 GQNRTHIQHLDYVMDILVFHSSRQSGWNECASSNGHCSHLCLAVPVGGFVCGC
 PAHYSLNADNRTCsAPTFLFSQKSAINRMVIDEQSPDIIPIHSLRNVRaidY
 DPLDKQLYWIDSRQNMIRKAQEDGSQGFVTVVSSVPSQNLEIQPYDLSIDIYSRY
 IYWTCEATNVINVTRLDGRSVGVVLKGEQDRPRAVVVNPEKGYMYFTNLQERS
 PKIERAALDGTEREVLFFSGLSKPIALALDSRLGKLFWADSDLRRIESSDLSGANR
 IVLEDSNILQPVGLTVFENWLYWIDKQQQMIEKIDMTGREGRTKVQARIAQLSDI
 HAVKELNLQEYRQHPCAQDNGGCSHICLVKGDGTTTRCSCPMHLVLLQDELSCG
 EPPTCSPQQFTCFTEIDCIPVAWRCDGFTECEDHSDELNCPVCSSESQFQCASGQ
 CIDGALRCNGDANCQDKSDEKNCEVLCLIDQFRCANGQCIGKHKKCDHNVDCS
 DKSDELDCYPTTEEPAPQATNTVGSVIGVITIFVSGTVYFICQRMCLPRMKGDGE
 TMTNDLVVHGPASVPLGYVPHPSLSGSLPGMSRGSMSISLSIMGGSSGPPYDR
 AHVTGASSSSSSSTKGYTFPAILNPPSPATERSHYTMEFGYSSNSPSTHRSYSYR
 PYSYRHFAPPTTPCSTDVCDSDYAPSRMTSVATAKGYTSDLNYDSEPVPPTP
 RSOYLSAEENYESCPPSPYTERSYSHH LYPPPPSPCTDSS;

y en la que la porción de unión al antígeno es capaz de actuar como antagonista de la vía de señalización inducida por Wnt1.

2. Molécula de unión a LRP6 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la molécula de unión a LRP6 comprende un fragmento Fab, un fragmento Fab', un F(ab')₂, o un fragmento Fv del anticuerpo.

3. Molécula antagonista de unión a LRP6 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la porción de unión al antígeno es capaz de unirse a e inhibir la LRP6 fosforilada (fosfo-LRP6).

4. Molécula de unión a LRP6 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la porción de unión al antígeno se deriva de un anticuerpo de uno de los siguientes isotipos: IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

5. Composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a LRP6 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

6. Molécula de unión a LRP6 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-5, para su uso en el tratamiento del cáncer.