

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 278**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2011 PCT/US2011/020994**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2011 WO11088123**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2011 E 11733316 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2523678**

54 Título: **Antagonistas de wnt y métodos de tratamiento**

30 Prioridad:

17.12.2010 US 424408 P

12.01.2010 US 294270 P

15.10.2010 US 393675 P

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

19.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SATYAL, SANJEEV, H.;
MITRA, SATYAJIT, SUJIT, KUMAR y
GURNEY, AUSTIN, L.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 638 278 T3

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

DESCRIPCIÓN

Antagonistas de wnt y métodos de tratamiento

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona composiciones novedosas y métodos para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades o trastornos asociados con Wnt, así como métodos de análisis novedosos para identificar agentes terapéuticos novedosos adicionales. En particular, la presente invención proporciona antagonistas de Wnt con
10 inclusión de proteínas de receptor soluble útiles para el tratamiento de tumores sólidos y otras enfermedades y afecciones asociadas a Wnt.

Antecedentes de la invención

15 El cáncer es una de las causas principales de muerte en el mundo desarrollado, con más de un millón de personas diagnosticadas con cáncer y 500,000 muertes al año solamente en los Estados Unidos. En total, se estima que más de 1 cada 3 personas desarrollarán algún tipo de cáncer durante su vida. Hay más de 200 tipos de cáncer diferentes, cuatro de los cuales - mama, pulmón, colorrectal y próstata, representan más de la mitad de todos los casos nuevos (Jemal et al., 2009, *Cancer J. Clin.*, 58:225-249).

20 La vía de señalización de Wnt se ha identificado como un blanco potencial para la terapia de cáncer. La vía de señalización de Wnt es uno de los varios reguladores críticos de la formación del patrón embrionario, mantenimiento de tejido post embrionario y biología de células madre. Más específicamente, la señalización de Wnt tiene un papel importante en la generación de la polaridad de células y especificación de destino celular con inclusión de la autorrenovación mediante las poblaciones de células madre. La activación desregulada de la vía Wnt está asociada con numerosos cánceres humanos donde puede alterar el destino de desarrollo de las células tumorales para
25 mantenerlas en un estado no diferenciado y proliferativo. Por lo tanto, la carcinogénesis puede proceder mediante la usurpación de mecanismos homeostáticos que controlan el desarrollo normal y la reparación de tejido mediante células madre (revisado en Reya & Clevers, 2005, *Nature*, 434:843-50; Beachy et al., 2004, *Nature*, 432:324-31).

30 La vía de señalización de Wnt fue dilucidada primero en *wingless* (wg, sin alas) mutante del desarrollo de *Drosophila* y del proto-oncogen murino int-1, ahora Wnt1 (Nusse & Varmus, 1982, *Cell*, 31:99-109; Van Ooyen & Nusse, 1984, *Cell*, 39:233-40; Cabrera et al., 1987, *Cell*, 50:659-63; Rijsewijk et al., 1987, *Cell*, 50:649-57). Los genes Wnt codifican glicoproteínas segregadas modificadas por lípidos de las cuales 19 se han identificado en mamíferos. Estos ligandos segregados activan un complejo receptor que consiste de un miembro de la familia del receptor Frizzled (FZD) y proteína 5 o 6 (LRP5/6) relacionada con receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL). Los receptores FZD son siete proteínas de dominio de transmembrana de la superfamilia del receptor acoplado a proteína G (GPCR) y contienen un gran dominio de unión a ligando del extremo N extracelular con 10 cisteínas conservadas, conocidas como un dominio rico en cisteína (CRD) o dominio Fri. Hay diez receptores FZD humanos, FZD1, FZD2,
35 FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9 y FZD10. Diferentes CRD de FZD tienen diferentes afinidades de unión para Wnt específicas (Wu & Nusse, 2002, *J. Biol. Chem.*, 277:41762-9) y receptores FZD se han agrupado en aquellos que activan la vía β -catenina canónica y aquellos que activan las vías no canónicas descritas a continuación (Miller et al., 1999, *Oncogene*, 18:7860-72). A los fines de formar el complejo receptor que une los ligandos de FZD, los receptores FZD interactúan con proteínas transmembrana de una sola vía LRP5/6 con cuatro dominios de tipo EGF extracelulares separados por seis repeticiones de aminoácidos YWTD (Johnson et al., 2004, *J. Bone Mineral Res.*, 19:1749).

40 La vía de señalización de Wnt canónica activada al momento de la unión del receptor se media mediante la proteína citoplasmática Dishevelled (Dsh) que interactúa directamente con el receptor FZD y resulta en la estabilización citoplasmática y acumulación de β -catenina. En ausencia de una señal de Wnt, la β -catenina se localiza a un complejo de destrucción citoplasmática que incluye las proteínas supresoras de tumores poliposis cólica adenomatosa (APC) y Axina. Estas proteínas funcionan como andamiajes críticos para permitir que la glicógeno sintasa quinasa-3 β (GSK3 β) unirse a β -catenina de fosforilato, lo que lo marca para su degradación a través de la vía ubiquitina/proteasoma. La activación de Dsh da por resultado la fosforilación de GSK3 β y la disociación del
45 complejo de destrucción. La β -catenina citoplasmática acumulada luego se transporta hacia el núcleo donde interactúa con las proteínas de unión de ADN de la familia TCF/LEF para activar la transcripción.

Además de la vía de señalización canónica, los ligandos de Wnt también activan las vías independientes de β -catenina (Veeman et al., 2003, *Dev. Cell*, 5:367-77). La señalización de Wnt no canónica ha estado implicada en
50 numerosos procesos, pero en forma más convincente en los movimientos de gastrulación a través de un mecanismo similar a la vía de polaridad celular plana (PCP) de *Drosophila*. Otros mecanismos potenciales de señalización de Wnt no canónica incluyen flujo de calcio, JNK y ambas proteínas G heterotriméricas y pequeñas. El antagonismo generalmente se observa entre las vías canónicas y no canónicas y algunas pruebas indican la señalización no canónica puede suprimir la formación de cáncer (Olson & Gibo, 1998, *Exp. Cell Res.*, 241:134; Topol et al., 2003, *J. Cell Biol.*, 162:899-908). Por lo tanto en determinados contextos, los receptores FZD actúan como reguladores negativos de la vía de señalización de Wnt canónica. Por ejemplo, FZD6 reprime la señalización canónica inducida
65

por Wnt3a cuando se coexpresa con FZD1 a través de la vía TAK1-NLK (Golan et al., 2004, *JBC*, 279:14879-88). En forma similar, se mostró que FZD2 antagoniza la señalización de Wnt canónica en la presencia de Wnt5a a través de la cascada TAK1-NLK MAPK (Ishitani et al., 2003, *Mol. Cell. Biol.*, 23:131-39).

5 La vía de señalización de Wnt canónica también tiene un papel central en el mantenimiento de las poblaciones de las células madres en el intestino delgado y el colon y la activación inadecuada de esta vía tiene un papel prominente en cánceres colorrectales (Reya & Clevers, 2005, *Nature*, 434:843). El epitelio absorbente de los intestinos se dispone en vellosidades y criptas. Las células madres residen en las criptas y lentamente se dividen para producir rápidamente células proliferantes que generan todas las poblaciones de células diferenciadas que salen de las criptas para ocupar las vellosidades intestinales. La cascada de señalización de Wnt tiene un papel dominante en el control de los destinos celulares junto con el eje cripta-vellosidad y es esencial para el mantenimiento de la población de células madre. La alteración de la señalización de Wnt, ya sea por la pérdida genética de TCF7/2 por la recombinación homóloga (Korinek et al., 1998, *Nat. Genet.*, 19:379) o sobreexpresión de Dickkopf-1 (Dkk1), un antagonista de Wnt segregado potente (Pinto et al., 2003, *Genes Dev.*, 17:1709-13; Kuhnert et al., 2004, *PNAS*, 101:266-71), da por resultado el agotamiento de las poblaciones de células madre intestinales.

Un papel de la señalización de Wnt en cáncer fue primero revelado con la identificación de Wnt1 (originalmente int1) como un oncogén en los tumores mamarios transformados por la inserción cercana de un virus murino (Nusse & Varmus, 1982, *Cell*, 31:99-109). La evidencia adicional para el papel de la señalización de Wnt en el cáncer de mama se ha acumulado desde entonces. Por ejemplo, la sobreexpresión transgénica de β -catenina en las glándulas mamarias da por resultado hiperplasias y adenocarcinomas (Imbert et al., 2001, *J. Cell Biol.*, 153:555-68; Michaelson & Leder, 2001, *Oncogene*, 20:5093-9) mientras que la pérdida de señalización de Wnt altera el desarrollo normal de la glándula mamaria (Tepera et al., 2003, *J. Cell Sci.*, 116:1137-49; Hatsell et al., 2003, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 8:145-58). Más recientemente, se ha demostrado que las células madres mamarias se activan mediante la señalización de Wnt (Liu et al., 2004, *PNAS*, 101:4158-4163). En el cáncer de mama humano, la acumulación de β -catenina implica la señalización de Wnt activada en más del 50 % de los carcinomas y a pesar de que no se han identificados mutaciones específicas, se ha observado la regulación por aumento de la expresión del receptor Frizzled (Brennan & Brown, 2004, *J. Mammary Gland Neoplasia*, 9:119-31; Malovanovic et al., 2004, *Int. J. Oncol.*, 25:1337-42).

El cáncer colorrectal comúnmente se inicia por las mutaciones de activación en la cascada de señalización de Wnt. Aproximadamente 5-10 % de los cánceres colorrectales son hereditarios y una de las formas principales es la poliposis adenomatosa familiar (FAP), una enfermedad dominante autosomal en la que aproximadamente 80 % de los individuos afectados contiene una mutación de la línea germinal en el gen de poliposis cólica adenomatosa (APC). También se han identificado mutaciones en otros componentes de la vía de Wnt incluyendo Axina y β -catenina. Los adenomas individuales son extensiones clonales de células epiteliales que contienen un segundo alelo inactivado y el gran número de adenomas de FAP inevitablemente dar por resultado el desarrollo de adenocarcinomas a través de mutaciones adicionales en oncogenes y/o genes supresores de tumores. Asimismo, la activación de la vía de señalización de Wnt, con inclusión de las mutaciones de ganancia de función en APC y β -catenina, puede inducir el desarrollo hiperplásico y el crecimiento de tumor en modelos de ratones (Oshima et al., 1997, *Cancer Res.*, 57:1644-9; Harada et al., 1999, *EMBO J.*, 18:5931-42). El documento WO2008031009 describe un antagonista de Wnt que comprende un componente de dominio Frizzled de una proteína Frizzled, un conector y un dominio Fc y un método para tratar cáncer usando dicho antagonista de Wnt.

45 **Breve síntesis de la invención**

La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes. De esta manera la invención proporciona un polipéptido que comprende: (i) un agente de unión a Wnt que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; y (ii) una secuencia señal seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73 y SEQ ID NO:74. La invención proporciona además un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica dicho polipéptido y una célula que produce dicho polipéptido o que comprende dicho polinucleótido. Además, la invención proporciona una composición que comprende un agente de unión a Wnt que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, en la que al menos el 80 % de dicho agente de unión a Wnt tiene una secuencia de aminoácidos N-terminal Ala Ser Ala (ASA); cuya composición puede ser una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona también dicha composición para su uso en el tratamiento de cáncer o para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a la activación canónica de la señalización de Wnt. La invención también proporciona un método *in vitro* para producir una composición tal, comprendiendo dicho método expresar en una célula un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 53 y una secuencia señal seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73 y SEQ ID NO:74, en la que al menos el 80 % del agente de unión a Wnt producido por la célula tiene la secuencia de aminoácidos N-terminal Ala Ser Ala (ASA). También se proporciona por la invención un método *in vitro* para producir un policonector peptídico a Wnt que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, comprendiendo el método: (i) expresar en una célula hospedadora un polipéptido que comprende un agente de unión a Wnt que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; y una secuencia señal seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73 y SEQ ID NO:74, en condiciones donde la secuencia señal se escinde por la célula hospedadora; y

purificar el policonector peptídico a Wnt de SEQ ID NO: 53 y producido por dicho método. La presente divulgación proporciona varios agentes que se unen a una o más proteínas de Wnt humanas incluyendo, de modo no taxativo, a receptores FZD solubles y otros agentes que comprenden un dominio Fri y métodos novedosos de usar dichos agentes. La invención además proporciona métodos de utilizar los agentes en el tratamiento del cáncer mediante la

5 administración de los agentes a un sujeto que lo necesite. En algunas realizaciones, los métodos comprenden inhibir el crecimiento de las células cancerosas. En ciertas realizaciones, el agente de unión a Wnt es un antagonista de Wnt. También se proporcionan métodos novedosos de análisis de dichos agentes de unión a Wnt. Del mismo modo, los polinucleótidos que codifican los agentes, los métodos de preparación de los agentes y varias composiciones que comprenden los agentes también se proporcionan.

10 Por lo tanto, en un aspecto la divulgación proporciona un método para inhibir el crecimiento de un tumor. En ciertos aspectos, el método comprende poner en contacto al tumor con una cantidad eficaz de un agente que se une a una o más proteínas Wnt (por ejemplo, proteínas de Wnt humanas). El método puede ser *in vivo* o *in vitro*. En ciertos aspectos, el tumor se encuentra en un sujeto y el contacto del tumor con el agente comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de unión a Wnt al sujeto.

15 En otro aspecto, la invención divulga un método para reducir la frecuencia de células madre de cáncer en un tumor que comprende células madre de cáncer. Por consiguiente, la divulgación también proporciona métodos para reducir la tumorigenicidad de tumores. En algunos aspectos, los métodos comprenden poner en contacto al tumor con una cantidad eficaz de un agente que se une a una o más proteínas Wnt (por ejemplo, proteínas Wnt humanas). El método puede ser *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, el contacto puede comprender la administración de una cantidad eficaz del agente de unión a Wnt a un ser humano que tiene el tumor.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para inducir las células en un tumor para diferenciar o inducir la expresión de marcadores de diferenciación en un tumor. En ciertos aspectos, el método comprende poner en contacto al tumor con una cantidad eficaz de un agente que une a una o más proteínas de Wnt (por ejemplo, proteínas de Wnt humanas). El método puede ser *in vivo* o *in vitro*.

25 En aun otro aspecto, la divulgación proporciona un método de tratamiento de cáncer en un sujeto, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de unión a Wnt al sujeto.

30 En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método para tratar de una enfermedad en un sujeto en donde la enfermedad está asociada con la activación de la señalización de Wnt, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de unión a Wnt al sujeto.

35 En aun otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar un trastorno en un sujeto, en donde el trastorno está caracterizado por un mayor nivel de células madre y/o células progenitoras, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de unión a Wnt al sujeto.

40 El agente de unión a Wnt es un polipéptido. El agente es un receptor soluble.

En los aspectos anteriormente mencionados, así como otros aspectos proporcionados en el presente documento, el agente comprende un dominio Fri de un receptor FZD o un fragmento de un dominio Fri de FZD que une a una o más proteínas Wnt. En ciertos aspectos, los receptores FZD son receptores FZD humanos. Por ejemplo, el dominio Fri puede ser de FZD4 humano o FZD5 humano. En ciertos aspectos alternativos, el agente puede comprender un dominio Fri de un receptor FZD8 humano o un fragmento de aquel dominio Fri que une a una o más proteínas Wnt. En ciertos aspectos, el agente de unión a Wnt es un receptor FZD soluble. En aspectos alternativos, el agente de unión a Wnt no comprende un dominio Fri de un receptor FZD.

45 El agente de unión a Wnt (antes de la escisión de la secuencia señal) comprende la SEQ ID NO:53 y una secuencia señal seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73 Y SEQ ID NO:74. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt (antes de la escisión de la secuencia señal) comprende SEQ ID NO:53 y SEQ ID NO:71.

50 En ciertos aspectos de cada uno de los aspectos anteriormente mencionados, así como otros aspectos proporcionados en el presente documento, el agente de unión a Wnt se une a una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más proteínas Wnt humanas seleccionadas del grupo que consta de Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10a y Wnt10b. En determinadas realizaciones, el agente se une a Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a y Wnt7b.

55 El agente es un antagonista de Wnt. En determinadas realizaciones, el agente inhibe la señalización de Wnt. En determinadas realizaciones, el agente inhibe la señalización de Wnt canónica de Wnt.

60 En determinadas realizaciones de cada uno de los aspectos anteriormente mencionados, así como otros aspectos mencionados en el presente documento, el tumor o cáncer es un tumor/cáncer seleccionado del grupo que consiste en tumor/cáncer colorrectal, tumor/cáncer pancreático, tumor/cáncer de pulmón, tumor/cáncer de ovarios,

65

tumor/cáncer de hígado, tumor/cáncer de mama, tumor/cáncer de riñón, tumor/cáncer de próstata, tumor/cáncer gastrointestinal, melanoma, tumor/cáncer cervical, tumor/cáncer de vejiga, glioblastoma y tumor/cáncer de cabeza y cuello.

- 5 En determinadas realizaciones de cada uno de los aspectos anteriormente mencionados, así como otros aspectos proporcionados en el presente documento, los métodos además comprenden poner en contacto el tumor con un segundo agente terapéutico o administrar un segundo agente terapéutico al sujeto. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico. En determinadas realizaciones, el segundo agente quimioterapéutico es una antimetabolito (por ejemplo, gemcitabina) o un agente antimetabólico (por ejemplo, un taxano, tal como paclitaxel).

Breve descripción de los dibujos/ figuras

15 Figura 1. Farmacocinética de FZD8-Fc (54F03) en la rata. La administración de una sola dosis (10 mg/kg) de FZD8-Fc fue seguida por la evaluación de las propiedades farmacocinéticas de FZD8-Fc. Las concentraciones de suero de FZD8-Fc se determinaron a 1, 24, 48, 72, 96, 168, 240 y 336 horas después de la administración.

Figura 2. Inhibición de crecimiento de tumor de páncreas PN4 por el tratamiento de FZD8-Fc (54F03). Las células de tumor de páncreas PN4 se inyectaron en forma subcutánea en los ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con FZD8-Fc (-▲-), gemcitabina (-■-), una combinación de FZD8-Fc y gemcitabina (-△-) o un anticuerpo de control (-●-). Los datos se muestran como volumen de tumor (mm³), durante los días después del tratamiento.

20 Figura 3. Reducción de población celular CD44^{hi} en tumores PN4 tratados con FZD8-Fc (54F03). Se llevó a cabo a tinción de la superficie celular para ESA y CD44 en células de tumor tratadas con anticuerpo de control, FZD8-Fc, gemcitabina o una combinación de FZD8-Fc y gemcitabina. Para cada grupo de tratamiento, las suspensiones de células solas de cinco tumores se agruparon con anterioridad a la tinción.

Figura 4. Ensayo de dilución limitante *in vivo* de tumores pancreáticos PN4 tratados con FZD8-Fc (54F03).

Figura 5. Mayor diferenciación celular de tumores pancreáticos PN4 tratados con FZD8-Fc (54F03). Secciones incrustadas en parafina de tumores PN4 tratados con anticuerpo de control, FZD8-Fc, gemcitabina o una combinación de FZD8-Fc y gemcitabina se tiñeron con azul alcian para detectar las células que expresan mucina.

30 Figura 6. Mayor diferenciación celular de tumores pancreáticos PN8 tratados con FZD8-Fc (54F03). Secciones incrustadas en parafina de tumores PN8 tratados con anticuerpo de control, FZD8-Fc, gemcitabina o una combinación de FZD8-Fc y gemcitabina se tiñeron con azul alcian para detectar las células que expresan mucina.

Figura 7. Mayor diferenciación celular y proliferación reducida en tumores pancreáticos PN13 luego del tratamiento con FZD8-Fc (54F03). Las secciones incrustadas en parafina de tumores PN13 tratadas con anticuerpo de control o FZD8-Fc fueron teñidas con azul alcian para detectar las células que expresan mucina. Asimismo, las secciones se tiñeron para detectar Ki67, un marcador de células activamente proliferantes.

Figura 8. Mayor tinción Muc16 en tumores pancreáticos PN13 luego del tratamiento con FZD8-Fc (54F03). Las secciones incrustadas en parafina de tumores PN13 tratados con anticuerpo de control o FZD8-Fc se tiñeron para detectar la proteína Muc 16.

Figura 9. Mayor tinción de CK20 en tumores pancreáticos PN13 luego del tratamiento con FZD8-Fc (54F03). Las secciones incrustadas en parafina de tumores PN13 tratados con un anticuerpo de control o FZD8-Fc se tiñeron para detectar la proteína CK20.

Figura 10. Inhibición de crecimiento de tumor de mama PE13 luego del tratamiento con FZD8-Fc (54F03) en combinación con paclitaxel. Las células de tumor de mama PE13 se inyectaron en forma subcutánea en los ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con un anticuerpo de control (-●-), FZD8-Fc (□), paclitaxel (-▲-) o una combinación de FZD8-Fc y paclitaxel (-○-). Los datos se muestran como volumen de tumor (mm³) durante los días después del tratamiento.

Figura 11. Inhibición dependiente de dosis de crecimiento de tumor de colon C28 con FZD8-Fc (54F03). Las células de tumor de colon C28 se inyectaron en forma subcutánea en los ratones NOD/SCID. Los ratones tratados con FZD8-Fc 1.5mg/kg dos veces a la semana (-▲-), 5mg/kg una vez a la semana (-▼-), 5mg/kg dos veces a la semana (-○-), 15mg/kg una vez a la semana (-□-) o 15mg/kg dos veces a la semana (-△-) o anticuerpo de control (-■-). Los datos se muestran como volumen de tumor (mm³) durante los días después del tratamiento (Fig. 11A). La inhibición del crecimiento del tumor de colon con FZD8-Fc en combinación con irinotecano. Los ratones se trataron con FZD8-Fc (-▲-), irinotecano (-▼-), una combinación de FZD8-Fc e irinotecano (-●-) o un anticuerpo de control (-■-). Los datos se muestran como volumen de tumor (mm³) durante los días después del tratamiento (Fig. 11B).

Figura 12. Mayor tinción de CK20 en tumores C28 luego del tratamiento con FZD8-Fc (54F03). Las secciones incrustadas en parafina de tumores C28 tratados con anticuerpo de control o FZD8-Fc se tiñeron para detectar la proteína CK20.

Figura 13. Inhibición de crecimiento de tumor pancreático PN21 y disminución en frecuencia de células madre cancerosas por el tratamiento de FZD8-Fc (54F03). Las células de tumor de pancreático PN21 se inyectaron en forma subcutánea en los ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con FZD8-Fc (-▼-), gemcitabina (-▲-), una combinación de FZD8-Fc y gemcitabina (-■-) o un anticuerpo de control (-●-). Los datos se muestran como volumen de tumor (mm³), durante los días después del tratamiento (Fig. 13A). Ensayo de dilución limitante *in vivo* de tumores pancreáticos PN21 tratados con FZD8-Fc (Fig. 13B).

Figura 14. Mayor diferenciación celular de tumores pancreáticos PN21 luego del tratamiento con FZD8-Fc (54F03). Las secciones incrustadas en parafina de tumores PN21 tratados con anticuerpo de control o FZD8-Fc fueron teñidas con azul alcian para detectar mucinas.

Figura 15. Mayor diferenciación celular y proliferación reducida en tumores pancreáticos PN21 luego del tratamiento con FZD8-Fc (54F03). Secciones incrustadas en parafina de tumores PN21 tratados con anticuerpo de control, FZD8-Fc, gemcitabina o una combinación de FZD8-Fc y gemcitabina se tiñeron con azul alcian para detectar las mucinas. Asimismo, las secciones se tiñeron para detectar Ki67, un marcador de células activamente proliferantes.

Figura 16. Farmacocinética de las variantes de FZD8-Fc en monos. La administración de una sola dosis (30 mg/kg) de las variantes de FZD8-Fc 54F15 y 54F16 fue seguida por la evaluación de las propiedades farmacocinéticas de las variantes. Las concentraciones de suero de 54F15 (-○-) y 54F16 (-◆-) se determinaron a 1, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 240 y 336 horas después de la administración.

Figura 17. Inhibición de crecimiento de tumor de colon C28 luego del tratamiento con las variantes de FZD8-Fc. Las células de tumor de colon C28 se inyectaron de forma subcutánea en los ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con un anticuerpo de control (-X-), 54F03 (-□-), 54F09 (-▲-), 54F12 (-▼-), 54F13 (-◆-), 54F15 (-○-) o 54F16 (-△-). Los datos se muestran como volumen de tumor (mm³) durante los días después del tratamiento.

Figura 18. Inhibición de crecimiento de tumor de pancreático PN4 luego del tratamiento con las variantes de FZD8-Fc. Las células de tumor de colon PN4 se inyectaron de forma subcutánea en los ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con un anticuerpo de control (-●-), 54F03 (-■-), 54F09 (-▼-), 54F12 (-○-), 54F13 (-▲-), 54F15 (-□-) o 54F16 (-◆-). Los datos se muestran como volumen de tumor (mm³) durante los días después del tratamiento.

Figura 19. Reducción de células CD44^{hi} y CD44⁺CD201⁺ en tumores PN4 tratados con las variantes de FZD8-Fc 54F03 y 54F16. Tinción de la superficie celular para ESA, CD44 y CD201 en células tumorales tratadas con anticuerpo de control, variante de FZD8-Fc 54F03 o variante 54F16 se llevó a cabo y se analizó mediante FACS.

Figura 20. Caracterización del extremo N de proteínas FZD8-Fc. Las variantes de FZD8-Fc se analizaron mediante espectrometría de masa y se muestran los resultados para 54F16 (Fig. 20A), 54F26 (Fig. 20B), 54F28 (Fig. 20C), 54F30 (Fig. 20D) y 54F32 (Fig. 20E).

Figura 21. Inhibición de crecimiento de tumor de colon C28 luego del tratamiento con las variantes de FZD8-Fc. Las células de tumor de colon C28 se inyectaron de forma subcutánea en los ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con un anticuerpo de control (-■-), 54F03 (-△-), 54F23 (-▼-) o 54F26 (-○-). Los datos se muestran como volumen de tumor (mm³) durante los días después del tratamiento.

Descripción detallada de la invención

La invención es en su sentido más amplio como se define en las reivindicaciones independientes.

La presente divulgación proporciona agentes novedosos, incluyendo, de modo no taxativo, polipéptidos que comprende el dominio Fri de receptores Frizzled (FZD) humanos, las proteínas relacionadas con Frizzled segregadas humanas (SFRP) o proteínas Ror que se unen a una o más Wnt humanas. También se proporcionan polinucleótidos y polipéptidos relacionados, composiciones que comprenden agentes de unión a Wnt y métodos de preparar los agentes de unión a Wnt. Se proporcionan adicionalmente métodos de uso de los agentes de unión a Wnt, tal como métodos para inhibir el crecimiento tumoral, tratar el cáncer, diferenciar y reducir de tumorigenicidad. También se proporcionan métodos de análisis de agentes para identificar agentes de unión a Wnt novedosos con actividad anti-tumor y/o actividad de células madre anti-cancerosa.

Un agente de unión Wnt que comprende el dominio Fri de FZD8 humano y un dominio Fc se produjo y se denomina en el presente documento como FZD8-Fc o FZD8-Fc (54F03) (Ejemplo 1). Se generaron una cantidad de variantes de proteína FZD8-Fc (Ejemplo 10). Se produjeron proteínas FZD8-Fc que demostraron ser aproximadamente 95 % o más homogéneas en el extremo N (Ejemplo 16). Los estudios farmacocinéticos utilizando varias de las variantes de FZD8-Fc se realizaron en ratas que mostraron que la semivida de variantes de FZD8-Fc fue de al menos 100 horas (Ejemplos 2 y 12, Figura 1 y Tabla 4). Un estudio farmacocinético se llevó a cabo en monos con las variantes de FZD8-Fc 54F15 y 54F16, que demostró que estas proteínas tenían una semivida de al menos 100 horas (Ejemplo 13 y Tabla 5). Se demostró que el tratamiento con FZD8-Fc (54F03), ya sea solo o en combinación con un agente quimioterapéutico reduce el crecimiento de tumores pancreáticos, tumores de mama y tumores de colon (Ejemplos 3, 5, 6 y 8 y Figuras 2, 10, 11B y 13A). Asimismo, se demostró que el tratamiento disminuye el porcentaje de células CD44⁺ y reduce la frecuencia de células madre cancerosas en el modelo pancreático (Ejemplos 3 y 8 y Figuras 3, 4 y 13B). Se demostró que el tratamiento con FZD8-Fc (54F03), ya sea solo o en combinación con un agente quimioterapéutico aumenta la diferenciación celular de células de tumores pancreáticos y células de tumores de colon (Ejemplos 4, 7 y 9 y Figuras 5-9, 12, 14 y 15). El tratamiento con variantes de FZD8-Fc demostró la inhibición del crecimiento del tumor en el colon y en los tumores pancreáticos, con la extensión de la inhibición dependiente de la variante (Ejemplos 14, 15 y 17 y Figuras 17, 18 y 21). Se demostró que el tratamiento con las variantes de FZD8-Fc 54F03 y 54F16 disminuye el porcentaje de células CD44^{hi}, así como células CD44⁺CD202⁺ en tumores pancreáticos (Ejemplo 15 y Figura 19).

I. Definiciones

El término “antagonista” se utiliza en el presente documento para incluir cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza completa o parcialmente la expresión de o la actividad biológica de una proteína (por ejemplo, un marcador de célula madre cancerosa). El bloqueo, inhibición, y/o neutralización de la actividad biológica incluye, de modo no taxativo, la inhibición del crecimiento tumoral. El término “antagonista” incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza en forma parcial o completa una actividad biológica de la vía Wnt. Las moléculas de antagonista adecuadas incluyen, de modo no taxativo, fragmentos y variantes de secuencias de aminoácidos de proteínas de receptor FZD naturales, incluyendo receptores FZD solubles, así como derivados de SFRP y derivados de proteínas Ror.

Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está “aislado” es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que se encuentran en una forma que no se encuentra en la naturaleza. Los polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células o composiciones incluyen aquellos que se han purificado a un grado que ya no están en la forma en la que se encuentran en la naturaleza. En algunas realizaciones, un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está aislado es sustancialmente puro.

Como se utiliza en el presente documento, “sustancialmente puro” se refiere al material que es al menos 50 % puro (es decir, libre de contaminantes), más preferentemente al menos 90 % puro, más preferentemente al menos 95 % puro, más preferentemente al menos 98 % puro, más preferentemente al menos 99 % puro.

Como se utiliza en el presente documento el término “receptor soluble” se refiere a un fragmento extracelular del extremo N de una proteína receptora que precede el primer dominio transmembrana del receptor que puede segregarse de una célula en forma soluble. En algunas realizaciones, la proteína receptora es un receptor FZD. En algunas realizaciones, la proteína receptora es un receptor Ror.

Como se utiliza en el presente documento, el término “receptor soluble FZD” se refiere a un fragmento extracelular del extremo N de una proteína receptora FZD humana que precede el primer dominio transmembrana del receptor que puede segregarse de una célula en forma soluble. Ambos receptores solubles FZD que comprenden el dominio extracelular del extremo N completo (ECD) (denominado en el presente documento como “FZD ECD”) así como fragmentos más pequeños están abarcados. También se describen los receptores solubles FZD que comprenden el dominio Fri (denominado en el presente documento como “Fri de FZD”). Los receptores solubles FZD Fri pueden demostrar actividad biológica alterada (por ejemplo mayor semivida de proteína) en comparación con los receptores solubles que comprenden el FZD ECD completo. La semivida de proteína puede además aumentarse mediante la modificación covalente con polietilenglicol (PEG) u óxido de polietileno (PEO). Los receptores solubles FZD incluyen FZD ECD o dominios Fri unidos dentro del marco a otras proteínas funcionales y estructurales incluyendo, de modo no taxativo, una región Fc humana (por ejemplo, Fc humana derivada de inmunoglobulinas IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE o IgM); etiquetas de proteína (por ejemplo, myc, FLAG, GST); otras proteínas endógenas o fragmentos de proteína; o cualquier otra secuencia de proteína útil incluyendo cualquier región de unión entre un FZD ECD o dominio Fri y una proteína unida. En determinadas realizaciones, el dominio Fri de un receptor FZD está unido directamente a una región Fc humana. En determinadas realizaciones, el dominio Fri de un receptor FZD está unido a una Fc de IgG1 humana (a la que se hace referencia en el presente documento como “FZD Fri.Fc”). En algunas realizaciones, el dominio Fri de un receptor FZD está unido a una región Fc humana con un conector peptídico. Los receptores solubles FZD también incluyen proteínas variantes que comprenden inserciones, supresiones, sustituciones, y/o sustituciones conservadoras de aminoácidos.

Como se utiliza en el presente documento, el término “unión” o “región de unión” se refiere a una unión insertada entre un primer polipéptido (por ejemplo, un componente FZD) y un segundo polipéptido (por ejemplo, una región Fc). En algunas realizaciones, la unión es un conector peptídico. Las uniones no deben afectar de manera adversa la expresión, secreción o bioactividad de los polipéptidos. Preferentemente, las uniones no son antigénicas y no proporcionan una respuesta inmunitaria.

Como se utiliza en el presente documento, los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos en los que una población de células se caracteriza por un crecimiento celular desregulado. Se entiende que el término cáncer abarca cánceres dependientes de Wnt. Los ejemplos de cánceres incluyen, de modo no taxativo, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de piel, melanoma, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Los términos “trastorno proliferativo” y “enfermedad proliferativa” se refieren a trastornos asociados con la proliferación anormal de células, tal como el cáncer.

“Tumor” y “neoplasma” como se utilizan en el presente documento se refieren a cualquier masa de tejido que resulta del crecimiento celular excesivo o proliferación, ya sea benigno (no canceroso) o maligno (canceroso) incluyendo lesiones precancerosas. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor epitelial. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor dependiente de Wnt.

5 Como se utiliza en el presente documento, el término “sujeto” se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero) incluyendo, de modo no taxativo, seres humanos, primates no humanos, caninos, felinos, roedores y similares, que será receptor de un tratamiento particular. Generalmente, los términos “sujeto” y “paciente” se utilizan en forma indistinta en el presente documento para hacer referencia a un sujeto humano.

10 Los términos “células madre cancerosa” y “CSC” y “células madre de tumor” y “células madre de tumor sólido” se utilizan indistintamente para hacer referencia a una población de células de un tumor sólido que: (1) tienen una capacidad proliferativa extensa; (2) son capaces de la división celular asimétrica para generar uno o más tipos de progenie diferenciada con potencial de desarrollo o proliferativo reducido; y (3) son capaces de divisiones celulares simétricas para la autorrenovación o automantenimiento. Estas propiedades de “células madre cancerosas”, “CSC,” “células madre de tumor o “células madre de tumor sólido” confiere en las células madre cancerosas la capacidad de formar tumores palpables al momento de un trasplante en serie en un hospedador inmunodeprimido (por ejemplo, un ratón) en comparación con la mayoría de las células tumorales que no logran formar tumores. Las células madre cancerosas atraviesan la autorrenovación frente a la diferenciación en un manera caótica para formar tumores con tipos de células anormales que pueden cambiar en el tiempo a medida que ocurren las mutaciones.

20 Los términos “célula cancerosa” y “célula tumoral” y equivalentes gramaticales se refieren a la población total de células derivadas de un tumor con inclusión de células no tumorigénicas, que comprenden el granel de las población de tumor de célula y células madres tumorigénicas, también denominadas en el presente documento como células madre cancerosas.

30 El término “tumorigénico” se refiere a las características funcionales de una célula madre de tumor sólido incluyendo propiedades de autorrenovación (lo que origina células madre cancerosas tumorigénicas adicionales) y proliferación para generar toda otra célula tumoral (lo que origina células de tumor diferenciadas y, por lo tanto, no tumorigénicas) que permiten a las células madre de tumor sólido formar un tumor. Estas propiedades de autorrenovación y proliferación para generar todas las otras células de tumor confieren a las células madre cancerosas la capacidad de formar tumores palpables al momento de la trasplatación en serie en un hospedador inmunodeprimido (por ejemplo, un ratón) en comparación con las células de tumor no tumorigénicas, que no pueden formar tumores al momento de la trasplatación en serie. Se ha observado que las células de tumor no tumorigénicas pueden formar un tumor al momento de la trasplatación primaria en un hospedador inmunodeprimido (por ejemplo, un ratón) luego de obtener células de tumor de un tumor sólido, pero aquellas células de tumor no tumorigénicas no originan un tumor al momento de una trasplatación en serie.

40 Como se utiliza en el presente documento un “portador farmacéutico aceptable” o “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquier material, que cuando se combina con un ingrediente activo de una composición farmacéutica, tal como un polipéptido terapéutico, permite que el polipéptido terapéutico, por ejemplo, retenga su actividad biológica. Asimismo, un “portador farmacéutico aceptable” no provoca una respuesta inmunitaria en un sujeto receptor. En algunas realizaciones, el término “vehículo farmacéutico” se utiliza en forma indistinta con “portador farmacéutico”. Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo, cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar, tal como solución salina tamponada con fosfato, agua y varias emulsiones de aceite/agua. Los ejemplos de diluyentes para administración por aerosol o parenteral son solución salina tamponada con fosfato o solución salina normal (0.9 %).

50 El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un agente (por ejemplo, un receptor soluble u otra droga) eficaz para “tratar” una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, las cantidad terapéuticamente eficaz del agente (por ejemplo, un receptor soluble) puede reducir la cantidad de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; reducir la frecuencia de las células madres cancerosas; inhibir y/o detener la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir y/o detener la metástasis de tumor; inhibir y/o detener el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer.

55 En la medida en que el agente (por ejemplo, un receptor soluble) previene el crecimiento y/o destruye células cancerosas existentes, puede hacerse referencia al mismo como citostático o citotóxico.

60 Como se utiliza en el presente documento, el término “inhibir el crecimiento tumoral” se refiere a cualquier mecanismo mediante el cual el crecimiento tumoral puede inhibirse. En determinadas realizaciones, el crecimiento de la célula tumoral se inhibe mediante la ralentización de la proliferación de las células tumorales. En determinadas realizaciones, el crecimiento de la célula tumoral se inhibe mediante la detención de la proliferación de las células tumorales. En determinadas realizaciones, el crecimiento de la célula tumoral se inhibe mediante la destrucción de las células tumorales. En determinadas realizaciones, el crecimiento de la célula tumoral se inhibe mediante la inducción de apoptosis de las células tumorales. En determinadas realizaciones, el crecimiento de la célula tumoral se inhibe mediante la inducción de diferenciación de las células tumorales. En determinadas realizaciones, el crecimiento de la célula tumoral se inhibe mediante la privación a las células tumorales de nutrientes. En

determinadas realizaciones, el crecimiento de la célula tumoral se inhibe mediante el impedimento de la migración de las células tumorales. En determinadas realizaciones, el crecimiento de la célula tumoral se inhibe mediante el impedimento de la invasión de las células tumorales.

5 Los términos, como “tratar” y “tratamiento” y “para tratar” y “mejorar” y “para mejorar” se refieren a 1) medidas terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen los síntomas y/o detienen el avance de una afección o trastorno patológico diagnosticado y 2) medidas profilácticas o preventivas que previenen o retrasan el desarrollo de una afección o trastorno patológico diana. Por lo tanto, aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos en los que el trastorno se va a prevenir. En
10 determinadas realizaciones, un sujeto es “tratado” en forma satisfactoria por cáncer de acuerdo con los métodos de la presente invención si el paciente muestra uno o más de los siguientes: una reducción en la cantidad o completa ausencia de, cáncer o células tumorales; una reducción en el tamaño tumoral; inhibición de o una ausencia de, cáncer o infiltración de células tumorales en los órganos periféricos incluyendo, por ejemplo, la diseminación del cáncer en el tejido blando y óseo; inhibición o una ausencia de, metástasis de tumor; inhibición o una ausencia de, tumor o crecimiento de cáncer; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; mortalidad y morbilidad reducida; mejora en la calidad de vida; reducción en la tumorigenicidad, frecuencia tumorigénica o capacidad tumorigénica de un tumor; reducción en la cantidad o frecuencia de las células madre cancerosas en el tumor; diferenciación de células tumorigénicas a un estado no tumorigénico; o alguna combinación de estos efectos.

20 Como se utiliza en el presente documento, los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se refieren a un polímero compuesto de una multiplicidad de unidades de nucleótido (ribonucleótido o desoxirribonucleótido o variantes estructurales relacionadas) unidas a través de enlaces fosfodiéster, incluyendo, de modo no taxativo, ADN o ARN. El término abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos base conocidos de ADN o ARN, incluyendo, de modo no taxativo, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-
25 (carboxihidroxil-metil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudo-uracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetil-guanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metil-citosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxi-amino-metil-2-tiouracilo, beta D-manosilqueosina, 5'-metoxycarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, metiléster del
30 ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente luego de la polimerización, tal como mediante la conjugación con un componente de marcado. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo,
35 “casquetes”; sustitución de uno o más de los nucleótidos que se encuentran en estado natural con un análogo; modificaciones de internucleótido, como uniones sin carga (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y uniones con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.); porciones pendientes, tal como proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-lisina, etc.); intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.); quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, borón, metales oxidativos, etc.); alquilantes; uniones modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.); así como formas no modificadas del o los polinucleótidos. Asimismo, cualquiera de los grupos hidroxilo que generalmente están presentes en las azúcares pueden reemplazarse, por ejemplo, con grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos mediante grupos protectores estándar o activados para preparar uniones adicionales a nucleótidos adicionales o pueden conjugarse con soportes sólidos. El OH del extremo 5' y 3' puede fosforilarse o
45 sustituirse con aminas o porciones de grupos de casquetes orgánicos de desde 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivar en grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que generalmente son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metilo-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carboxílicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos, como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosas, azúcares furanosas, heptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósido abásico, como metil ribosida. Una o más uniones fosfodiéster pueden reemplazarse con grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen, de modo no taxativo, realizaciones en donde el fosfato se reemplaza con P(O)S (“tioato”), P(S)S (“ditioato”), (O)NR₂ (“amidato”), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ (“formacetal”), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que opcionalmente contiene una unión éter (--O--), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todas las uniones en un polinucleótido necesitan ser idénticas.

Como se utiliza en el presente documento, el término “vector” se utiliza en referencia a moléculas de ácido nucleico que transfieren segmento o segmentos de ADN de una célula a otra. El término “vector” significa una construcción, que es capaz de administrar y preferentemente expresar, uno o más genes o secuencias de interés a una célula hospedadora. Los ejemplos de vectores incluyen, de modo no taxativo, vectores virales, vectores de expresión de
60 ARN o ADN desnudo, plásmido, fagemido, cosmido o vectores fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes condensantes catiónicos y vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas.

65 Los términos “polipéptido” y “péptido” y “proteína” y “fragmento de proteína” se utilizan de forma indistinta en el presente documento para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácido de cualquier longitud. Los

términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos en el polímero en una mímica química artificial de un aminoácido correspondiente que se encuentra en forma natural, así como a polímeros de aminoácido que se encuentran en estado natural y polímeros de aminoácido que no se encuentra en forma natural. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que ha sido modificado naturalmente o mediante intervención, por ejemplo, formación de enlace disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, como conjugación con un componente de marcado. También incluidos dentro de la definición se encuentran, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los polipéptidos de la presente invención se basan, al menos en parte, en anticuerpos, en determinadas realizaciones, los polipéptidos pueden ocurrir como cadenas solas o cadenas asociadas.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos que se encuentran en estado natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y mímicas de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos que se encuentran en forma natural. Los aminoácidos que se encuentran en estado natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos ácidos que son posteriormente modificados, por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuesto que tienen la misma estructura química básica como un aminoácido que se encuentra en forma natural, por ejemplo, un alfa carbono que se une a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metilsulfonio. Dichos análogos puede tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueleto de péptidos modificado, pero retienen la misma estructura química básica como un aminoácido que se encuentra en forma natural. La mímica de aminoácido se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido que se encuentra en forma natural.

Que un polipéptido u otro agente "se une específicamente" a una proteína significa que el polipéptido u otro agente reacciona o se asocia de manera más frecuente, más rápida, con mayor duración, con mayor afinidad o con alguna combinación de las anteriores, a la proteína que con sustancias alternativas, incluyendo proteínas no relacionadas. En determinadas realizaciones, "se une específicamente" significa, por ejemplo, que un agente se une a una proteína con un K_D de aproximadamente 0.1 mM o menos, pero más comúnmente menos de aproximadamente 1 μ M. En determinadas realizaciones, "se une específicamente" se refiere a que un agente se une a una proteína en momentos con un K_D de al menos aproximadamente 0.1 μ M o menos, al menos aproximadamente 0.01 μ M o menos y en otros momentos al menos aproximadamente 1 nM o menos. Debido a que la identidad de secuencia entre las proteínas homólogas en especies diferentes, la unión específica puede incluir un agente que reconoce una proteína particular, tal como una proteína Wnt en más de una especie. Del mismo modo, debido a la homología entre diferentes proteínas Wnt en determinadas regiones de las secuencias de las Wnt, una unión específica puede incluir un polipéptido (u otro agente) que reconoce más de una proteína Wnt. Se entiende que un agente que se une específicamente a una primera diana puede unirse específicamente o no a una segunda diana. Como tal, "unión específica" no requiere necesariamente (a pesar de que puede incluir) unión exclusiva, es decir, unión a una sola diana. Por lo tanto, un agente puede, en determinadas realizaciones, unirse específicamente a más de una diana (por ejemplo, Wnt humanas diferentes múltiples). Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa unión específica.

Los términos "idéntico/a" o "porcentaje de identidad" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (con la introducción de espacios, si es necesario) para la máxima correspondencia, sin considerar sustituciones de aminoácido conservadoras como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad puede medirse utilizando el software de comparación de secuencias o algoritmos o mediante la inspección visual. Varios algoritmos y software que pueden utilizarse para obtener las alineaciones de las secuencias de aminoácidos o nucleótidos son conocidos en la técnica. Un ejemplo no taxativo de un algoritmo de alineación de secuencia es el algoritmo descrito en Karlin et al, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268, según la modificación en Karlin et al., 1993, *PNAS*, 90:5873-5877, e incorporado en los programas NBLAST y XBLAST (Altschul et al., 1991, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402). Los programas de software disponibles al público adicionales que pueden utilizarse para alinear secuencias incluyen, de modo no taxativo, Gapped BLAST, BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul et al., 1996, *Methods in Enzymology*, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California), Megalign (DNASTAR) y el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711).

En algunas realizaciones, dos ácidos nucleicos o polipéptidos de la invención son sustancialmente idénticos, lo que significa que tienen al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % y en algunas realizaciones al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de nucleótido o residuo de aminoácido, cuando se comparan y alinean para una máxima correspondencia, como se mide utilizando un algoritmo de comparación de secuencia o mediante inspección visual. En algunas realizaciones, la identidad existe sobre una región de las secuencias que tienen al menos alrededor de 10, al menos alrededor de 20, al menos alrededor de 40-60, al menos

alrededor de 60-80 residuos de longitud o cualquier valor integral entre éstos. En algunas realizaciones, la identidad existe sobre una región más larga que 60-80 residuos, tal como al menos alrededor de 90-100 residuos. En algunas realizaciones, las secuencias son sustancialmente idénticas sobre la longitud total de las secuencias que se comparan, tal como la región codificante de una secuencia de nucleótidos.

5 Una "sustitución de aminoácido conservadora" es una en la que un residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tiene cadenas laterales similares se han definido en la técnica, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservadora. Preferentemente, las sustituciones conservadoras en las secuencias de los polipéptidos y otros agentes de la invención no anulan la unión del polipéptido que contiene la secuencia de aminoácido, a el o los dianas, es decir, la una o más Wnt a las que el polipéptido u otro agente se une. Los métodos para identificar sustituciones conservadoras de aminoácidos y nucleótidos que no eliminan la unión diana son muy conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Brummell et al., 1993, *Biochem.*, 32: 1180-87; Kobayashi et al., 1999, *Protein Eng.* 12:879-84; y Burks et al., 1997, *PNAS*, 94:412-17).

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

25 Como se utiliza en la presente descripción y reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen las formas plurales salvo que el contexto claramente indique lo contrario.

Se entiende que cuando las realizaciones se describan en el presente documento con el lenguaje "que comprende" otras realizaciones análogas descritas en términos de "que consta de" y/o "que consta esencialmente de" también se proporcionan.

30 El término "y/o" como se utilizan en una frase como "A y/o B" en el presente documento intenta incluir tanto A y B; A o B; A (solo) y B (solo). Del mismo modo, el término "y/o" como se utiliza en una frase como "A, B y/o C" intenta abarcar cada una de las siguiente realizaciones: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

35 II. Agentes de unión a Wnt

La presente invención proporciona agentes que unen (por ejemplo, unen específicamente) una o más proteínas Wnt humanas (Wnt). Estos agentes se denominan en el presente documento como "agente o agentes de unión a Wnt". En determinadas realizaciones, los agentes específicamente se unen a uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más proteínas Wnt. A modo de ejemplo no taxativo, el agente de unión a Wnt puede unir Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10a, y/o Wnt10b. En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt se une Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a y Wnt7b.

45 En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt es un antagonista de Wnt. En determinadas realizaciones, el agente inhibe la señalización de Wnt. En algunas realizaciones, el agente inhibe la señalización de Wnt canónica.

En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt es un polipéptido. En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt es un receptor soluble.

50 En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende un dominio extracelular de un receptor FZD. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende un dominio Fri de un receptor FZD. En determinadas realizaciones, el receptor FZD es un receptor FZD humano. En determinadas realizaciones, el receptor FZD humano es FZD, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9 o FZD10. En algunas realizaciones alternativas, el agente de unión a Wnt comprende una porción de una SFRP. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende un dominio Fri de una SFRP. En determinadas realizaciones, la SFRP es una SFRP humana. En algunas realizaciones, la SFRP humana es SFRP1, SFRP2, SFRP3, SFRP4 o SFRP5. En otras realizaciones alternativas, el agente de unión a Wnt comprende el dominio extracelular de una proteína Ror. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende un dominio Fri de una proteína Ror. En determinadas realizaciones, la Ror es una Ror humana. En algunas realizaciones, la Ror humana es Ror1 o Ror2.

60 En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt es un receptor soluble. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt es una proteína soluble. En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt es un receptor FZD soluble. Los ejemplos no taxativos de receptores FZD solubles pueden encontrarse en la Patente de los Estados Unidos Nº 7.723.477. En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt es una SFRP soluble o un receptor Ror soluble.

El dominio Fri de FZD1 incluye aproximadamente los aminoácidos 87-237 de la SEQ ID NO:27. El dominio Fri de FZD2 incluye aproximadamente los aminoácidos 24-159 de la SEQ ID NO:28. El dominio Fri de FZD3 incluye aproximadamente los aminoácidos 23-143 de la SEQ ID NO:29. El dominio Fri de FZD4 incluye aproximadamente los aminoácidos 40-170 de la SEQ ID NO:22. El dominio Fri de FZD5 incluye aproximadamente los aminoácidos 27-157 de la SEQ ID NO:23. El dominio Fri de FZD6 incluye aproximadamente los aminoácidos 19-146 de la SEQ ID NO:24. El dominio Fri de FZD7 incluye aproximadamente los aminoácidos 33-170 de la SEQ ID NO:25. El dominio Fri de FZD8 incluye aproximadamente los aminoácidos 28-158 de la SEQ ID NO:30. El dominio Fri de FZD9 incluye aproximadamente los aminoácidos 23-159 de las SEQ ID NO:31. El dominio Fri de FZD10 incluye aproximadamente los aminoácidos 21-154 de la SEQ ID NO:26. Los dominios Fri predichos correspondientes para cada uno de los receptores FZD humanos se proporcionan como SEQ ID NO:32-41. Las secuencias de dominio Fri núcleo mínimas para cada uno de los receptores FZD humanos (FZD1-10) se proporcionan como las SEQ ID NO:3-12. Las secuencias de dominio Fri núcleo mínimas para cada una de las SFRP humanas (SFRP1-5) se proporcionan como las SEQ ID NP:13-17. Las secuencias de dominio Fri núcleo mínimas de Ror1 y Ror2 humanas se proporcionan como las SEQ ID NO:58 y SEQ ID NO:59. Aquellos con experiencia en la técnica pueden diferir en la compresión de los aminoácidos exactos correspondientes a los varios dominios Fri. Por lo tanto, el extremo N o el extremo C de los dominios descritos anteriormente y en el presente documento puede extenderse o acortarse en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10 aminoácidos.

En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende un dominio Fri de un receptor FZD humano o un fragmento o variante del dominio Fri que se une a una o más proteínas Wnt. En determinadas realizaciones, el receptor FZD humano es FZD, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9 o FZD10. En determinadas realizaciones, el receptor FZD humanos es FZD4. En determinadas realizaciones alternativas, el receptor FZD humano es FZD5. En determinadas realizaciones alternativas adicionales, el receptor FZD humano es FZD8. En determinadas realizaciones, el FZD es FZD4 y el agente de unión a Wnt comprende la SEQ ID NO:6 o comprende aproximadamente los aminoácidos 40 a 170 de la SEQ ID NO:19. En determinadas realizaciones, el FZD es FZD5 y el agente de unión a Wnt comprende la SEQ ID NO:7 o comprende aproximadamente los aminoácidos 27-157 de la SEQ ID NO:20. En determinadas realizaciones, el FZD es FZD7 y el agente de unión a Wnt comprende la SEQ ID NO:9 o comprende aproximadamente los aminoácidos 33 a 170 de la SEQ ID NO:25. En determinadas realizaciones, el FZD es FZD8 y el agente de unión a Wnt comprende la SEQ ID NO:10 o comprende aproximadamente los aminoácidos 28-158 de la SEQ ID NO:21. En determinadas realizaciones, el FZD es FZD10 y el agente de unión a Wnt comprende la SEQ ID NO:12 o comprende aproximadamente los aminoácidos 21-154 de la SEQ ID NO:26.

En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende una secuencia de dominio Fri mínima seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID NO:3-12. En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende una secuencia de dominio Fri mínima seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID NO:13-17. En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende una secuencia de dominio Fri mínima seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID NO:58 y SEQ ID NO:59.

En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende una variante de cualquiera de las secuencias de dominio Fri de FZD anteriormente mencionadas que comprende una o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc.) sustituciones conservadoras y es capaz de unir Wnt.

En determinadas realizaciones alternativas, el agente de unión a Wnt comprende un dominio Fri de una SFRP humana o un fragmento o variante de dicho dominio Fri que se une a una o más proteínas Wnt humanas. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el agente comprende una secuencia de dominio Fri de SFRP mínima seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID NO:13-17. En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende una variante de cualquiera de las secuencias de dominio Fri de SFRP anteriormente mencionadas que comprende una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc.) sustituciones conservadoras y mantiene la capacidad de unir Wnt.

En determinadas realizaciones alternativas, el agente de unión a Wnt comprende un dominio Fri de una proteína Ror humana o un fragmento o variante de dicho dominio Fri que se une a una o más proteínas Wnt humanas. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el agente comprende una secuencia de dominio Fri de Ror mínima seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID NO:58 y SEQ ID NO:59. En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende una variante de cualquiera de las secuencias de dominio Fri de Ror anteriormente mencionadas que comprende una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc.) sustituciones conservadoras y mantiene la capacidad de unir Wnt.

En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt, tal como un agente que comprende un dominio Fri mínimo de un receptor FZD humano u otro receptor FZD soluble, además comprende una región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1 humana). La región Fc puede obtenerse de cualquiera de las clases de inmunoglobulina, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la región Fc en una región Fc mutada. En algunas realizaciones, la región Fc está truncada en el extremo N por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, (por ejemplo, en el dominio bisagra). En algunas realizaciones, un aminoácido en el dominio bisagra se cambia para impedir la formación del enlace disulfuro

indeseado. En algunas realizaciones, una cisteína se reemplaza con una serina para impedir la formación del enlace disulfuro indeseado. En determinadas realizaciones, la región Fc comprende o consta de las SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:42 o SEQ ID NO:43.

5 En determinadas realizaciones, un agente de unión a Wnt es una proteína de fusión que comprende al menos un dominio Fri de un receptor FZD, una SFRP o proteína Ror y una región Fc. Como se utiliza en el presente documento, una “proteína de fusión” es una proteína híbrida expresada por una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótido de al menos dos genes. En algunas realizaciones, el extremo C del primer polipéptido está unido al extremo N de la región Fc de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el primer polipéptido (por ejemplo, un dominio Fri de FZD) está directamente unido a la región Fc (es decir, sin un conector peptídico interviniente). En algunas realizaciones, el primer polipéptido está unido a la región Fc a través de un conector peptídico.

15 Como se utiliza en el presente documento, el término “unión” se refiere a una unión insertada entre un primer polipéptido (por ejemplo, un componente FZD) y un segundo polipéptido (por ejemplo, una región Fc). En algunas realizaciones, la unión es un conector peptídico. Las uniones no deben afectar de manera adversa la expresión, secreción o bioactividad del polipéptido. Las uniones no deben ser antigénicas y no deben proporcionar una respuesta inmunitaria. Las uniones adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica y frecuentemente incluyen mezclas de residuos de glicina y serina y frecuentemente incluyen aminoácidos que no están estéricamente impedidos. Otros aminoácidos que pueden incorporarse en uniones útiles incluyen residuos treonina y alanina. Las uniones pueden variar en longitud, por ejemplos desde 1-50 aminoácidos de longitud, 1-22 aminoácidos de longitud, 1-10 aminoácidos de longitud, 1-5 aminoácidos de longitud o 1-3 aminoácidos de longitud. Las uniones pueden incluir, de modo no taxativo, SerGly, GGSG, GSGS, GGGS, S(GGS)_n donde n es 1-7, GRA, poli(Gly), poli(Ala), ESGGGGVT (SEQ ID NO:60), LESGGGGVT (SEQ ID NO:61), GRAQVT (SEQ ID NO:62), WRAQVT (SEQ ID NO:63) y ARGRAQVT (SEQ ID NO:64). Como se utiliza en el presente documento, una unión es una secuencia de péptidos interviniente que no incluye residuos de aminoácidos del extremo C del primer polipéptido (por ejemplo, un dominio Fri de FZD) o el extremo N del segundo polipéptido (por ejemplo, la región Fc).

30 Los receptores FZD, SFRP y proteínas Ror contienen una secuencia de señal que dirige el transporte de las proteínas. Las secuencias señal (también denominadas como péptidos señal o secuencias líderes) se ubican en los extremos N de los polipéptidos nacientes. Dirigen el polipéptido al retículo endoplasmático y las proteínas son dirigidas a sus destinos, por ejemplo, al espacio interior de un orgánulo, a una membrana interior, a la membrana exterior de la célula o al exterior de la célula a través de la secreción. La mayoría de las secuencias de señal se escinden de la proteína mediante una peptidasa de señal luego de que las proteínas se transportan al retículo endoplasmático. La escisión de la secuencia de señal del polipéptido generalmente ocurre en el sitio específico en la secuencia de aminoácidos y depende de los residuos de aminoácidos dentro de la secuencia de señal. A pesar de que generalmente hay un sitio de escisión específico, más de un sitio de escisión puede ser reconocido y/o utilizado por una peptidasa de señal que da por resultado un extremo N no homogéneo del polipéptido. Por ejemplo, el uso de sitios de escisión diferentes dentro de una secuencia de señal puede dar por resultado un polipéptido que se expresa con diferentes aminoácidos del extremo N. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los polipéptidos como se describen en el presente documento puede comprender una mezcla de polipéptidos con diferentes extremos N. En algunas realizaciones, los extremos N difieren en longitud por 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos. En algunas realizaciones, el polipéptido es sustancialmente homogéneo, es decir, los polipéptidos tienen el mismo extremo N. En algunas realizaciones, la secuencia de señal del polipéptido comprende una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc.) sustituciones y/o supresiones de aminoácidos. En algunas realizaciones, la secuencia de señal del polipéptido comprende las sustituciones y/o supresiones de aminoácidos que le permiten que un sitio de escisión sea dominante, de este modo, dando como resultado un polipéptido sustancialmente homogéneo con un extremo N. En algunas realizaciones, la secuencia de señal es la SEQ ID NO:67 (aminoácidos 1-27 de la SEQ ID NO:30). En algunas realizaciones los aminoácidos 25 y/o 26 de la SEQ ID NO:67 están sustituidos con diferentes aminoácidos. En algunas realizaciones los aminoácidos 17, 18, 19, 23, 24, 25 y/o 26 de la SEQ ID NO:67 están sustituidos con diferentes aminoácidos. En algunas realizaciones, los aminoácidos 17, 23, 24, 25 y 26 de la SEQ ID NO:67 están sustituidos con diferentes aminoácidos. En algunas realizaciones, el aminoácido 17 de la SEQ ID NO:67 está sustituido con una fenilalanina o una leucina. En algunas realizaciones, el aminoácido 23 de la SEQ ID NO:67 está sustituido con una prolina. En algunas realizaciones, el aminoácido 24 de la SEQ ID NO:67 está sustituido con una isoleucina o una fenilalanina. En algunas realizaciones, el aminoácido 25 de la SEQ ID NO:67 está sustituido con una valina, una isoleucina o una alanina. En algunas realizaciones, el aminoácido 26 de la SEQ ID NO:67 está sustituido con una histidina, tirosina o una histidina. En algunas realizaciones, el aminoácido 25 de la SEQ ID NO:67 está sustituido con una valina. En algunas realizaciones, el aminoácido 26 de la SEQ ID NO:67 está sustituido con una leucina. En algunas realizaciones, la secuencia de señal del polipéptido comprende o consta de una secuencia seleccionada del grupo enumerado en la Tabla 1.

Tabla 1

MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGAAA	SEQ ID NO:67
MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGALA	SEQ ID NO:68

ES 2 638 278 T3

MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGVLA	SEQ ID NO:69
MEWGYLLEVTSLLAALLLQRSPIVHA	SEQ ID NO:70
MEWGYLLEVTSLLAALFLLQRSPIVHA	SEQ ID NO:71
MEWGYLLEVTSLLAALLLQRSPFVHA	SEQ ID NO:72
MEWGYLLEVTSLLAALLLQRSPIIYA	SEQ ID NO:73
MEWGYLLEVTSLLAALLLQRSPIAHA	SEQ ID NO:74

5 En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende un primer polipéptido que comprende un componente de dominio de FZD y una región Fc. En algunas realizaciones, el componente de dominio de FZD es desde FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9 o FZD10. En algunas realizaciones, la región Fc es desde una inmunoglobulina IgG1. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende:

10 (a) un primer polipéptido que consta esencialmente de aminoácidos seleccionados del grupo que consta de: X1 a Y1 de la SEQ ID NO:27, X2 a Y2 de la SEQ ID NO:28, X3 a Y3 de la SEQ ID NO:29, X4 a Y4 de la SEQ ID NO:22, X5 a Y5 de la SEQ ID NO:23, X6 a Y6 de la SEQ ID NO:24, X7 a Y7 de la SEQ ID NO:25, X8 a Y8 de la SEQ ID NO:30, X9 a Y9 de la SEQ ID NO:31 y X10 a Y10 de la SEQ ID NO:26; y (b) un segundo polipéptido que consta esencialmente de aminoácidos A a B de SEQ ID NO:43; en donde

15 X1 = aminoácido 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 o 76
 Y1 = aminoácido 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242 o 243
 X2 = aminoácido 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28
 Y2 = aminoácido 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171 o 172
 X3 = aminoácido 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25
 Y3 = aminoácido 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148 o 149
 X4 = aminoácido 38, 39, 40, 41 o 42
 20 Y4 = aminoácido 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 o 176
 X5 = aminoácido 25, 26, 27, 28 o 29
 Y5 = aminoácido 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163 o 164
 X6 = aminoácido 19, 20, 21, 22, 23 o 24
 Y6 = aminoácido 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151 o 152
 25 X7 = aminoácido 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34
 Y7 = aminoácido 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185 o 186
 X8 = aminoácido 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31
 Y8 = aminoácido 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163 o 164
 X9 = aminoácido 21, 22, 23 o 24
 30 Y9 = aminoácido 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145 o 146
 X10 = aminoácido 20, 21, 22, 23, 24 o 25
 Y10 = aminoácido 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159 o 160
 A = aminoácido 1, 2, 3, 4, 5 o 6
 B = aminoácido 231 o 232.

35 En algunas realizaciones, el primer polipéptido está directamente unido al segundo polipéptido. En algunas realizaciones, el primer polipéptido está unido al segundo polipéptido a través de un conector peptídico. En algunas realizaciones, el primer polipéptido está unido al segundo polipéptido a través del conector peptídico GRA. Un polipéptido (por ejemplo, un primer o segundo polipéptido) que "consta esencialmente de" determinadas aminoácidos o "que consta esencialmente de" determinadas aminoácidos puede, en algunas realizaciones, incluir uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o más) aminoácidos adicionales en uno o ambos extremos, en la medida que los aminoácidos adicionales no afecten materialmente la función del agente de unión a Wnt.

45 En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende: (a) un primer polipéptido que consta esencialmente de aminoácidos X a Y de la SEQ ID NO:30; y (b) un segundo polipéptido que consta esencialmente de aminoácidos A a B de la SEQ ID NO:43; en donde el primer polipéptido está directamente unido al segundo polipéptido y en la que
 X = aminoácido 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31

50 Y = aminoácido 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163 o 164
 A = aminoácido 1, 2, 3, 4, 5 o 6
 B = aminoácido 231 o 232.

55 En algunas realizaciones, el primer polipéptido consta esencialmente de aminoácidos 25-158 de la SEQ ID NO:30. En otras realizaciones, el primer polipéptido consta de aminoácidos 25-158 de la SEQ ID NO:30. En algunas realizaciones, el primer polipéptido consta esencialmente de aminoácidos 28-158 de la SEQ ID NO:30. En otras realizaciones, el primer polipéptido consta de aminoácidos 28-158 de la SEQ ID NO:30. En algunas realizaciones, el

Aminoácidos 26-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 3-231 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 26-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 4-232 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 26-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 4-231 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 26-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 5-232 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 26-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 5-231 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 26-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 6-232 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 26-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 6-231 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 27-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 1-232 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 27-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 1-231 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 27-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 2-232 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 27-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 2-231 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 27-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 3-232 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 27-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 3-231 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 27-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 4-232 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 27-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 4-231 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 27-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 5-232 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 27-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 5-231 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 27-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 6-232 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 27-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 6-231 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 28-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 1-232 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 28-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 1-231 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 28-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 2-232 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 28-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 2-231 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 28-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 3-232 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 28-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 3-231 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 28-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 4-232 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 28-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 4-231 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 28-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 5-232 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 28-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 5-231 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 28-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 6-232 de SEQ ID NO:43
Aminoácidos 28-164 de SEQ ID NO:30	Aminoácidos 6-231 de SEQ ID NO:43

En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:65 y SEQ ID NO:66.

5 En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende la secuencia SEQ ID NO:1. En determinadas realizaciones alternativas, el agente comprende la secuencia de la SEQ ID NO:1., que comprende una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc.) sustituciones conservadoras. En determinadas realizaciones, el agente comprende una secuencia que tiene al menos alrededor de 90 %, alrededor de 95 % o alrededor de 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1. En determinadas realizaciones, las variantes de la SEQ ID NO:1 mantienen la capacidad de unirse a una o más Wnt humanas.

15 En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende la secuencia de la SEQ ID NO:46. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt es la SEQ ID NO:46. En determinadas realizaciones alternativas, el agente comprende la secuencia de la SEQ ID NO:46, que comprende una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc.) sustituciones conservadoras. En determinadas realizaciones, el agente comprende una secuencia que tiene al menos alrededor de 90 %, alrededor de 95 % o alrededor de 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:46. En determinadas realizaciones, las variantes de la SEQ ID NO:46 mantienen la capacidad de unirse a una o más Wnt humanas.

20 En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende la secuencia de la SEQ ID NO:48. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt es la SEQ ID NO:48. En determinadas realizaciones alternativas, el agente comprende la secuencia de la SEQ ID NO:48, que comprende una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc.) sustituciones conservadoras. En determinadas realizaciones, el agente comprende una secuencia que tiene al menos alrededor de 90 %, alrededor de 95 % o alrededor de 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:48. En determinadas realizaciones, las variantes de la SEQ ID NO:48 mantienen la capacidad de unirse a una o más Wnt humanas.

30 En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende la secuencia de la SEQ ID NO:50. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt es la SEQ ID NO:50. En determinadas realizaciones alternativas, el agente comprende la secuencia de la SEQ ID NO:50, que comprende una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc.) sustituciones conservadoras. En determinadas realizaciones, el agente comprende una secuencia que tiene al menos alrededor de 90 %, alrededor de 95 % o alrededor de 98 % de

identidad de secuencia con la SEQ ID NO:50. En determinadas realizaciones, las variantes de la SEQ ID NO:50 mantienen la capacidad de unirse a una o más Wnt humanas.

5 En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende la secuencia la SEQ ID NO:53. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt es la SEQ ID NO:53. En determinadas realizaciones alternativas, el agente comprende la secuencia de la SEQ ID NO:53, que comprende una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc.) sustituciones conservadoras. En determinadas realizaciones, el agente comprende una secuencia que tiene al menos alrededor de 90 %, alrededor de 95 % o alrededor de 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:53. En determinadas realizaciones, las variantes de la SEQ ID NO:53
10 mantienen la capacidad de unir una o más Wnt humanas.

En algunas realizaciones, los agentes de unión a Wnt como se describe en el presente documento inhiben el crecimiento de un tumor o células tumorales. En algunas realizaciones, los agentes de unión a Wnt inducen la diferenciación celular en un tumor. En algunas realizaciones, los agentes de unión a Wnt inducen la expresión de marcadores de diferenciación en un tumor o células tumorales. En determinadas realizaciones, los agentes de unión a Wnt reducen la frecuencia de las células madre cancerosas en un tumor. En algunas realizaciones, un agente de unión a Wnt que comprende la SEQ ID NO:46 inhibe el crecimiento de un tumor en una mayor medida que un agente de unión a Wnt que comprende la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, un agente de unión a Wnt que comprende la SEQ ID NO:48 inhibe el crecimiento de un tumor en una mayor medida que un agente de unión a Wnt que comprende la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, un agente de unión que comprende la SEQ ID NO:50 inhibe el crecimiento de un tumor en una mayor medida que un agente de unión a Wnt que comprende la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, un agente de unión a Wnt que comprende la SEQ ID NO:53 inhibe el crecimiento de un tumor en una mayor medida que un agente de unión a Wnt que comprende la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, un agente de unión a Wnt como se describe en el presente documento inhibe el crecimiento de un tumor en una mayor medida que un agente de unión a Wnt que comprende un componente de dominio de FZD, un dominio Fc y un componente de unión que conecta el componente de dominio FZD y el dominio Fc. En algunas realizaciones, el componente de unión es un conector peptídico interviniente.
15
20
25

En determinadas realizaciones, los agentes de unión a Wnt, como se describe en el presente documento, inhiben el crecimiento de un tumor dependiente de Wnt. En algunas realizaciones, el tumor es un tumor seleccionado del grupo que consiste de tumor colorrectal, tumor de colon, tumor pancreático, tumor de pulmón, tumor de ovarios, tumor de hígado, tumor de mama, tumor de riñón, tumor de próstata, tumor gastrointestinal, melanoma, tumor del cuello uterino, tumor de vejiga, glioblastoma y tumor de cabeza y cuello. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor colorrectal. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor pancreático. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor de mama.
30
35

En determinadas realizaciones, se proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:65 y SEQ ID NO:66. En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50 y SEQ ID NO:53. En algunas realizaciones, un polipéptido consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50 y SEQ ID NO:53. En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:50. En algunas realizaciones, el polipéptido es la SEQ ID NO:50. En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:53. En algunas realizaciones, el polipéptido es la SEQ ID NO:53.
40
45

En determinadas realizaciones, el polipéptido (antes de la escisión de la secuencia de señal) comprende la SEQ ID NO:50 y una secuencia de señal seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73 y SEQ ID NO:74. En determinadas realizaciones, el polipéptido (antes de la escisión de la secuencia de señal) comprende la SEQ ID NO:50 y una secuencia de señal seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73 y SEQ ID NO:74. En algunas realizaciones, el polipéptido (antes de la escisión de la secuencia de señal) comprende la SEQ ID NO:53 y una secuencia de señal seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73 y SEQ ID NO:74. En algunas realizaciones, el polipéptido (antes de la escisión de la secuencia de señal) comprende la SEQ ID NO:53 y una secuencia de señal seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73 y SEQ ID NO:74. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende las SEQ ID NO:71 y SEQ ID NO:50. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende las SEQ ID NO:71 y SEQ ID NO:53. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende la SEQ ID NO:75. En algunas realizaciones, el polipéptido consiste esencialmente de la SEQ ID NO:75.
50
55
60

En algunas realizaciones, el polipéptido es un polipéptido sustancialmente purificado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50 y SEQ ID NO:53. En determinadas realizaciones, el polipéptido sustancialmente purificado consiste de al menos 90 % de un polipéptido que tiene una secuencia del extremo N de ASA. En algunas realizaciones, el
65

polipéptido naciente comprende una secuencia de señal seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO:67-74. En algunas realizaciones, el polipéptido naciente comprende una secuencia de señal de la SEQ ID NO:71. En algunas realizaciones, el polipéptido naciente comprende una secuencia de señal que da por resultado un producto de polipéptido sustancialmente homogéneo con una secuencia del extremo N.

5 En determinadas realizaciones alternativas, el agente no comprende un dominio Fri de un receptor FZD.

En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a una o más proteínas Wnt).

10 En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende una región Fc de una inmunoglobulina. Los expertos en técnica apreciarán que los agentes de unión de la presente invención comprenderán proteínas de fusión en las que al menos una porción de la región Fc ha sido suprimida o, de otro modo, alterada a los fines de proporcionar las características bioquímicas deseadas, como una mayor localización de células cancerosas, mayor penetración de tumor, semivida de suero reducida o mayor semivida de suero, cuando se compara con una proteína de fusión de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante natural o inalterada. Las modificaciones a la región Fc pueden incluir agregados, supresiones o sustituciones de uno o más de los aminoácidos en uno o más dominios. Las proteínas de fusión modificadas descritas en el presente documento pueden comprender alteraciones o modificaciones a uno o más de los dos dominios constantes de cadena pesada (CH2 o CH3) o a la región bisagra. En otras realizaciones, el dominio CH2 entero es eliminado (construcciones Δ CH2). En algunas realizaciones, el dominio constante omitido es reemplazado con un espaciador de aminoácido corto (por ejemplo, 10 residuos aa) que proporciona algo de la flexibilidad molecular que generalmente proporciona el dominio de región constante ausente.

25 En algunas realizaciones, las proteínas de fusión modificadas se diseñan para unirse al dominio CH3 directamente a la región bisagra del anticuerpo. En otras realizaciones, se inserta un espaciador de péptidos entre la región bisagra y los dominios modificados CH2 y/o CH3. Por ejemplo, las construcciones pueden expresarse en donde el dominio CH2 se ha eliminado y el dominio CH3 restante (modificado o no modificado) se une a la región bisagra con un espaciador de aminoácidos 5-20. Dicho espaciador puede agregarse a fin de garantizar que los elementos reguladores del dominio constante permanezcan libres y accesibles o que la región bisagra permanezca flexible. Sin embargo, debe observarse que los espaciadores de aminoácidos pueden ser, en algunos casos, inmunogénicos y eliminar una respuesta inmunitaria no deseada contra la construcción. En consecuencia, en determinadas realizaciones, todo espaciador que se agregue a la construcción será relativamente no inmunogénico a fin de mantener las cualidades biológicas deseadas de los anticuerpos modificados.

35 En algunas realizaciones, las proteínas de fusión modificadas pueden tener solo una supresión parcial de un dominio constante o sustitución de pocos o incluso un solo aminoácido. Por ejemplo, la mutación de un solo aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir en forma sustancial la unión de Fc y de ese modo incrementar la localización de células cancerosas y/o penetración del tumor. En forma similar, puede ser conveniente simplemente eliminar esa parte de uno o más dominios de región constantes que controlan una función efectora específica (por ejemplo, la unión del complemento C1q) a ser modulada. Esas supresiones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (por ejemplo, la semivida del suero) mientras que se deja intactas otras funciones deseadas asociadas a la región constante del sujeto. Además, tal como se mencionó con anterioridad, las regiones constantes de las proteínas de función reveladas pueden modificarse a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que mejoran el perfil de la construcción resultante. En este sentido, puede ser posible interrumpir la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión de Fc) mientras que se mantiene en forma sustancial la configuración y perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. En determinadas realizaciones, las proteínas de fusión modificadas comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante a fin de mejorar las características deseadas como el aumento o la disminución de la función efectora o proporcionar más unión de citotoxina o carbohidratos.

55 Se sabe en la técnica que la región constante funciona como mediadora de varias funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a la región Fc de los anticuerpos IgG o IgM (unidos al antígeno) activa el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de los patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede involucrarse en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Además, la región Fc de un anticuerpo puede unirse a una célula que expresa un receptor Fc (FcR). Existe una cantidad de receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, con la inclusión de IgG (receptores gamma), IgE (receptores epsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies de la célula provoca una cantidad importante y diversa de respuestas biológicas, incluyendo la absorción y destrucción de partículas cubiertas por el anticuerpo, depuración de complejos inmunitarios, lisis de células diana cubiertas por el anticuerpo por parte de los linfocitos citolíticos (citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulina.

65 En algunas realizaciones, los agentes de unión a Wnt proveen las funciones efectoras alteradas que, a su vez,

afectan el perfil biológico del agente administrado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la supresión o inactivación (a través de mutaciones de punto u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión del receptor Fc del agente modificado circulante (por ejemplo, el agente de unión a Wnt) y de ese modo se incrementa la localización de células cancerosas y/o penetración del tumor. En otras realizaciones, las modificaciones de la
 5 región constante aumentan o reducen la semivida del suero del agente. En algunas realizaciones, la región constante se modifica para eliminar los enlaces de disulfuro o porciones de oligosacáridos.

En determinadas realizaciones, un agente de unión a Wnt no posee una o más funciones efectoras normalmente asociadas a la región Fc. En algunas realizaciones, el agente no posee actividad ADCC y/o actividad de citotoxicidad dependiente de los complementos (CDC). En determinadas realizaciones, el agente no se une al receptor Fc y/o factores del complemento. En determinadas realizaciones, el agente no posee función efectora.
 10

En algunas realizaciones, los agentes de unión a Wnt que se describen en el presente documento se modifican para reducir la inmunogenicidad. En general, las respuestas inmunitarias contra proteínas humanas completamente normales son raras cuando estas proteínas se utilizan como agentes terapéuticos. Sin embargo, a pesar de que muchas proteínas de fusión comprenden secuencias de polipéptidos que son las mismas que las secuencias que se encuentran en la naturaleza, se ha mostrado que varias proteínas de fusión terapéuticas son inmunogénicas en mamíferos. En algunos estudios, se ha encontrado que una proteína de fusión que comprende una unión es más inmunogénica que una proteína de fusión que no contiene una unión. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los polipéptidos de la invención se analizan mediante métodos de cómputo para predecir la inmunogenicidad. En algunas realizaciones, los polipéptidos se analizan para comprobar la presencia de epítomos de células T y/o células B. Si se identifica y/o predice alguno de los epítomos de células T o células B, pueden realizarse modificaciones a esas regiones (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos) a fin de alterar o destruir los epítomos. En la técnica se conocen varios algoritmos y software que pueden utilizarse para predecir epítomos de células T y/o células B. Por ejemplo, los programas de software SYFPEITHI, HLA Bind, PEPVAC, RANKPEP, DiscoTope, ElliPro y Antibody Epitope Prediction se encuentran todos disponibles al público.
 15
 20
 25

En algunas realizaciones, se suministra una célula que produce cualquiera de los polipéptidos o agentes de unión a Wnt descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, se suministra una composición que comprende cualquiera de los agentes de unión a Wnt o polipéptidos que se describen en el presente. En algunas realizaciones, la composición comprende un polipéptido en donde al menos 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % del polipéptido posee una secuencia del extremo N de ASA. En algunas realizaciones, la composición comprende un polipéptido en donde 100 % del polipéptido posee una secuencia del extremo N de ASA. En algunas realizaciones, la composición comprende un polipéptido en donde al menos 80 % del polipéptido posee una secuencia del extremo N de ASA. En algunas realizaciones, la composición comprende un polipéptido en donde al menos 90 % del polipéptido posee una secuencia del extremo N de ASA. En algunas realizaciones, la composición comprende un polipéptido en donde al menos 95 % del polipéptido posee una secuencia del extremo N de ASA.
 30
 35

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales o polipéptidos sintéticos. Se reconocerá en la técnica que algunas secuencias de aminoácidos de la invención pueden variarse sin un efecto significativo en la estructura o función de la proteína. Si se contemplan dichas diferencias en la secuencia, debe recordarse que habrá áreas importantes en la proteína que determinan la actividad. Por lo tanto, la invención además incluye variaciones que muestran actividad sustancial o que incluye regiones de proteínas FZD, proteínas SFRP o proteínas Ror como las porciones de proteína que se tratan en el presente documento. Dichos mutantes incluyen supresiones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones de tipo. Tal como se indica a continuación, puede encontrarse una guía acerca de qué cambios de aminoácidos son propensos a ser fenotípicamente silenciosos en Bowie, et al., 1990, *Science*, 247:1306-10.
 40
 45

Por supuesto, la cantidad de sustituciones de aminoácidos que un experto realizaría depende de muchos factores, incluyendo aquellos que se describieron con anterioridad. En determinadas realizaciones, la cantidad de sustituciones para un polipéptido de receptor soluble dado no será mayor a 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5 o 3.
 50

Pueden emplearse fragmentos o porciones de polipéptidos de la presente invención para producir el polipéptido de longitud completa correspondiente mediante la síntesis del polipéptido; por lo tanto, los fragmentos pueden emplearse como productos intermedios para producir los polipéptidos de longitud completa. También puede hacerse referencia a estos fragmentos o porción de los polipéptidos como "fragmentos de proteína" o "fragmentos del polipéptido".
 55

Un fragmento de proteína de la presente invención es una porción o todas, de una proteína que es capaz de unirse a una o más proteínas Wnt humanas (por ejemplo, un receptor FZD humano, una SFRP humano o una proteína Ror). En algunas realizaciones, el fragmento posee una alta afinidad para una o más proteínas Wnt humanas. Algunos fragmentos de las proteínas de fusión que se describen en el presente documento son fragmentos de proteína que comprenden al menos parte de la porción extracelular de un receptor FZD, una SFRP o la porción extracelular de una proteína Ror que contiene un dominio de unión que se une a al menos parte de una región constante de una inmunoglobulina (por ejemplo, un región Fc). La afinidad de unión del fragmento de proteína puede encontrarse en el rango de aproximadamente 10^{-11} a 10^{-12} M, a pesar de que la afinidad puede variar en forma considerable con
 60
 65

fragmentos de diferentes tamaños, que varían desde 10^{-7} a 10^{-13} M. En algunas realizaciones, el fragmento es de aproximadamente 100 a 200 aminoácidos de longitud y comprende un dominio de unión que se une a al menos parte de una región constante de una inmunoglobulina.

- 5 Los agentes de unión a Wnt de la presente invención pueden analizarse para detectar la unión específica mediante cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que se pueden utilizar incluyen, de modo no taxativo, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos que emplean técnicas como el análisis BIAcore, análisis FACS, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, transferencia de Western, radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitación, reacciones de difusión de precipitina
- 10 en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complementos, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Dichos ensayos son de rutina y conocidos en la técnica (véase, por ej., Ausubel et al, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Tomo I, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).
- 15 Por ejemplo, la unión específica de un polipéptido a una Wnt humana puede determinarse usando ELISA. Un ensayo ELISA comprende preparar antígenos, recubrir pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con antígenos, agregar el polipéptido (por ej., un agente de unión a Wnt) conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ej., peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) al pocillo, incubar durante un período de tiempo y detectar la presencia del agente. En algunas realizaciones, el polipéptido (por ej., el agente de
- 20 unión a Wnt) no se conjuga con un compuesto detectable, sino que se agrega al pocillo un segundo anticuerpo conjugado que reconoce el polipéptido. En algunas realizaciones, en vez de recubrir el pocillo con el antígeno, el polipéptido (por ej., el agente de unión a Wnt) puede recubrir el pocillo y un segundo anticuerpo conjugado con un compuesto detectable puede agregarse luego de la adición del antígeno al pocillo recubierto. Un experto en la técnica sabrá qué parámetros pueden modificarse para aumentar la señal detectada así como otras variaciones de
- 25 ELISA conocidas en la técnica (véase, por ej., Ausubel et al, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Tomo I, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 11.2.1).

La afinidad de unión de un agente a una Wnt y la tasa de disociación de una interacción de antígeno-agente de unión puede determinarse mediante ensayos de unión competitivos. Un ejemplo de un ensayo de unión competitivo

30 es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de un antígeno marcado (por ej., ^3H o ^{125}I) o un fragmento o variante del mismo, con el agente de unión de interés en presencia de cantidades en aumento de antígeno no marcado seguido por la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del agente de unión frente a una Wnt y las tasas de disociación de unión pueden determinarse a partir de los datos obtenidos mediante el análisis de la gráfica de Scatchard. En algunas realizaciones el análisis cinético BIAcore se usa para determinar las tasas de

35 asociación y disociación de unión de agentes que se unen a una o más Wnt humanas. El análisis cinético BIAcore comprende analizar la unión y disociación de anticuerpos a partir de chips con antígenos de Wnt inmovilizados en su superficie.

En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt se une a al menos una Wnt con una constante de disociación (K_D) de alrededor de 1 μM o menor, alrededor de 100 nM o menor, alrededor de 40 nM o menor, alrededor de 20 nM o menor o alrededor de 10 nM o menor.

En determinadas realizaciones, al agente de unión a Wnt (por ej., un FZD8-Fc) es un antagonista de al menos una Wnt (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 Wnt) que se une por el agente. En determinadas realizaciones, el agente

45 inhibe al menos alrededor de 10 %, al menos alrededor del 20 %, al menos alrededor del 30 %, al menos alrededor del 50 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor del 90 % o alrededor del 100 % de una o más actividades de las Wnt humanas unidas.

Se conocen en la técnica ensayos in vivo e in Vitro para determinar si un agente de unión a Wnt (o un agente de unión a Wnt candidato) inhibe la señalización de Wnt. Por ejemplo, pueden usarse ensayos indicadores de luciferasa basados en células que utilizan un vector indicador TCF/Luc que contiene múltiples copias del dominio de unión a TCF hacia arriba de un gen indicador de luciferasa de luciérnaga para medir los niveles de señalización de Wnt canónicos *in vitro* (Gazit et al., 1999, *Oncogene* 18; 5959-66). El nivel de señalización de Wnt en presencia de una o

50 más Wnt (por ej., Wnt expresadas mediante células transfectadas o proporcionadas por medio condicionado por Wnt) con el agente de unión a Wnt presente se compara con el nivel de señalización sin el agente de unión a Wnt presente. Además del ensayo indicador TCF/Luc, el efecto de un agente de unión a Wnt (o agente candidato) en la señalización de Wnt canónica puede medirse in vitro o in vivo midiendo el efecto del agente en el nivel de expresión de genes regulados por β -catenina, tal como c-myc (He et al., *Science*, 281:1509-12 (1998)), ciclina D1 (Tetsu et al., *Nature*, 398:422-6 (1999)) y/o fibronectina (Gradl et al. *Mol. Cell Biol.*, 19:5576-87 (1999)). En determinadas

60 realizaciones, el efecto de un agente en la señalización de Wnt también puede evaluarse midiendo el efecto del agente en el estado de fosforilación de Dishevelled-1, Dishevelled-2, Dishevelled-3, LRP5, LRP6 y/o β -catenina.

Los polipéptidos que se describen en el presente documento pueden producirse mediante todo método idóneo conocido en la técnica. Dichos métodos varían desde métodos de síntesis directa de proteínas a la construcción de secuencias de ADN que codifican secuencias de polipéptidos y la expresión de dichas secuencias en un hospedador idóneo. En algunas realizaciones, se construye una secuencia de ADN mediante la utilización de tecnología

recombinante a través del aislamiento o la síntesis de una secuencia de ADN que codifica una proteína de tipo salvaje de interés. En forma opcional, la secuencia puede mutagenizarse mediante mutagénesis de sitio específico a fin de suministrar análogos funcionales de la misma. Véase, por ejemplo, Zoeller et al., 1984, *PNAS*, 81:5662-66 y Patente de los Estados Unidos N° 4.588.585. En algunas realizaciones, se construye una secuencia de ADN mediante tecnología recombinante por medio del aislamiento de más de una secuencia ADN que codifica dos polipéptidos de interés y la unión de estas secuencias de ADN para generar una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la fusión de dos polipéptidos agrega aminoácidos adicionales a la unión entre los dos polipéptidos (es decir, el sitio de unión para las secuencias de ADN). Estos aminoácidos adicionales se consideran un enlace. En algunas realizaciones, se introduce un enlace peptídico entre los dos polipéptidos de la proteína de fusión.

En algunas realizaciones, puede construirse una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés mediante síntesis química por medio de un sintetizador de oligonucleótidos. Dichos oligonucleótidos pueden diseñarse basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos se diseñan para seleccionar codones que se favorecen en la célula hospedadora en la cual se producirá el polipéptido recombinante de interés. Pueden aplicarse métodos estándar para sintetizar una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de interés. Por ejemplo, puede utilizarse una secuencia completa de aminoácidos para construir un gen de traducción inversa. Además, puede sintetizarse un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido específico. Por ejemplo, pueden sintetizarse varios oligonucleótidos pequeños que codifican porciones del polipéptido deseado y luego unirlos. Los oligonucleótidos individuales contienen normalmente salientes de 5' o 3' para el ensamblaje complementario. En algunas realizaciones, se sintetiza una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión deseada de manera que dos polipéptidos se unen directamente sin la intervención del enlace peptídico.

Una vez ensambladas (mediante síntesis, mutagénesis dirigida al sitio, tecnología recombinante u otro método), las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido específico de interés pueden introducirse en un vector de expresión y unirse operativamente a una secuencia de control de expresión apropiada para la expresión del polipéptido en un hospedador deseado. El ensamblaje correcto puede confirmarse mediante la secuenciación de nucleótidos, mapeo de restricción y/o expresión de un polipéptido biológicamente activo en un hospedador adecuado. Como se conoce muy bien en la técnica, a fin de obtener altos niveles de expresión de un gen transfectedo en un hospedador, el gen debe unirse operativamente a secuencias de control de expresión de transcripción y traducción que son funcionales en el hospedador de expresión seleccionado.

En determinadas realizaciones, se utilizan vectores de expresión recombinantes para amplificar y expresar ADN que codifica agentes de unión a Wnt y polipéptidos que se describen en el presente documento. Por ejemplo, los vectores de expresión recombinantes pueden ser construcciones de ADN replicables que poseen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifican una proteína de fusión que comprende un dominio Fri de FZD y una región Fc, unidos operativamente a elementos reguladores de transcripción o traducción adecuados que derivan de genes de mamíferos, microbios, virus o insectos. Una unidad de transcripción comprende generalmente un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que cumplen una función reguladora en la expresión de genes, por ejemplo, promotores y/o potenciadores de transcripción, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína y (3) secuencias apropiadas de inicio y finalización de transcripción y traducción. Los elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. En forma adicional, puede incorporarse la habilidad de replicar en un hospedador, usualmente conferida por un origen de replicación y una selección del gen para facilitar el reconocimiento de transformantes. Las regiones de ADN se encuentran "unidas operativamente" cuando se relacionan en forma funcional. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (líder secretor) se encuentra unido operativamente al ADN para un polipéptido si está expresado como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión de ribosoma se encuentra unido operativamente a una secuencia codificante si se encuentra posicionado de manera que permita la traducción. En general, unido operativamente significa contiguo y, en el caso de los líderes secretores, significa contiguo y en un marco de lectura. En algunas realizaciones, los elementos estructurales que se pretende utilizar en los sistemas de expresión de levadura pueden incluir una secuencia líder que permita la secreción extracelular de la proteína traducida mediante una célula hospedadora. En algunas realizaciones, en donde se expresa la proteína recombinante sin un líder o secuencia de transporte, puede incluir un residuo de metionina del extremo N. En forma opcional, este residuo puede luego escindirse de la proteína recombinante expresada a fin de proporcionar el producto final.

La selección de una secuencia de control de expresión y un vector de expresión depende de la elección del hospedador. Puede emplearse una amplia variedad de combinaciones de hospedadores/vectores de expresión. Los vectores de expresión útiles para hospedadores eucariotas incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión de SV40, virus de papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para hospedadores bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, como plásmidos de *E. coli*, con la inclusión de pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados y vectores de rango de hospedador más amplios, como M13 y otros fagos de ADN de cadena única filamentosos.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de un agente de unión a Wnt incluyen células procariotas,

de levadura, insectos o células eucariotas mayores bajo el control de los promotores apropiados. Las procariontes incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo *E. coli* o Bacilli. Las células eucarióticas mayores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero tal como se describe a continuación. Pueden emplearse también sistemas de traducción sin células. Los vectores de clonación y expresión apropiados para su utilización con hospedadores celulares bacterianos, micóticos, mamíferos y de levadura son descritos por Pouwels et al., 1985, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y.

Se utilizan varios sistemas de cultivo de células de mamíferos e insectos para expresar polipéptidos recombinantes. En algunas realizaciones, la expresión de proteínas recombinantes en células de mamíferos se prefiere debido a que generalmente dichas proteínas se pliegan en forma correcta, se modifican en forma apropiada y son completamente funcionales. Los ejemplos de líneas celulares hospedador idóneas incluyen las líneas celulares COS-7 (derivadas de riñón de mono), L-929 (derivadas de fibroblastos murinos), C127 (derivadas de tumores mamarios murinos), 3T3 (derivadas de fibroblastos murinos), CHO (derivadas de ovario de hámster chino), HeLa (derivadas de cáncer de cuello de útero humano) y BHK (derivadas de fibroblastos de riñón de hámster). Los vectores de expresión mamíferos pueden comprender elementos no transcritos como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuado unido al gen a expresar y otras secuencias flanqueantes no transcritas de 5' o 3' y secuencias no traducidas de 5' o 3', como sitios de unión de ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptantes de empalme y secuencias de finalización de transcripción. Los expertos en la técnica conocen los sistemas baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos y los resume Luckow y Summers, 1988, *Bio/Technology*, 6:47.

Las proteínas producidas por un hospedador transformado pueden purificarse por medio de cualquier método idóneo. Dichos métodos estándar incluyen la cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio de iones, de afinidad y de columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por medio de toda otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Las etiquetas de afinidad como la hexahistidina, el dominio de unión de maltosa, la secuencia de cubierta de influenza y la glutatona-S-transferasa pueden unirse a la proteína a fin de permitir la purificación fácil por medio del pasaje por una columna de afinidad apropiada. Las proteínas aisladas pueden también caracterizarse en forma física mediante técnicas como la proteólisis, espectrometría de masas (MS), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), resonancia magnética nuclear (NMR) y cristalografía de rayos x.

En algunas realizaciones, los sobrenadantes de los sistemas de expresión que segregan proteína recombinante en el medio de cultivo pueden concentrarse en primer lugar mediante la utilización de un filtro de concentración de proteínas disponible en los comercios, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Luego de la etapa de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación idónea. En algunas realizaciones, puede emplearse una resina de intercambio de aniones, por ejemplo, una matriz o sustrato que contiene grupos de dietilaminoetilo (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos que se emplean habitualmente en la purificación de proteínas. En algunas realizaciones, puede emplearse una etapa de intercambio de cationes. Los intercambiadores de cationes idóneos incluyen varias matrices no solubles que comprenden grupos de sulfopropilo o carboximetilo. En algunas realizaciones, puede emplearse un medio de hidroxapatita (CHT), incluyendo, de modo no taxativo, hidroxapatita cerámica. En algunas realizaciones, puede emplearse una o más etapas de HPLC de fase reversa con la utilización de medio RP-HPLC hidrofóbico, por ejemplo, gel de sílice que posee grupos colgantes de metilo u otros grupos alifáticos, para purificar en forma adicional una proteína de fusión. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en varias combinaciones, pueden emplearse también para suministrar una proteína recombinante homogénea.

En algunas realizaciones, la proteína recombinante producida en un cultivo bacteriano puede aislarse, por ejemplo, mediante la extracción inicial de gránulos celulares, seguido de una o más etapas de concentración, extracción de sales, intercambio de iones acuoso, y/o cromatografía por exclusión de tamaño. La HPLC puede emplearse en las etapas de purificación finales. Las células microbianas que se utilizan en la expresión de una proteína recombinante pueden desestabilizarse mediante cualquier método conveniente, incluyendo el ciclo de congelamiento-descongelamiento, sometimiento a ultrasonido, alteración mecánica o la utilización de agentes de lisado de células.

Los métodos conocidos en la técnica para purificar anticuerpos y otras proteínas también incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2008/0312425; 2008/0177048 y 2009/0187005.

Los polipéptidos que se describen en el presente pueden modificarse en forma adicional para contener restos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la proteína. Esas porciones derivatizadas pueden mejorar la solubilidad, la vida biológica promedio o la absorción de la proteína. Los restos también pueden reducir o eliminar todo efecto secundario no deseado de las proteínas y similares. Puede encontrarse un resumen para esos restos en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª Edición, Universidad de Ciencias, Filadelfia, 2005.

Los restos químicos más apropiados para la derivatización incluyen polímeros solubles en agua. Un polímero soluble en agua es conveniente debido a que la proteína a la que se une no se precipita en un entorno acuoso, como en un entorno fisiológico. En algunas realizaciones, el polímero será farmacéuticamente aceptable para la preparación de un producto o composición terapéuticos. Un experto en la técnica será capaz de seleccionar el polímero deseado

basándose en consideraciones como si el conjugado polímero/proteína se utilizará terapéuticamente y de ser así, la dosis deseada, el tiempo de circulación, resistencia a la proteólisis y otras consideraciones. La efectividad de la derivatización puede determinarse mediante la administración del derivado, en la forma deseada (es decir, mediante bomba osmótica o mediante inyección o infusión o formulado en forma adicional para su administración oral, pulmonar u otras vías de administración) y la determinación de su efectividad. Los polímeros solubles en agua idóneos incluyen, entre otros, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/ propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, pirrolidona de polivinilo, poli-1,3,6-trioxano, copolímero anhídrido maleico/ etileno, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros al azar), dextrano, poli(n-vinil pirrolidón)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, co-polímeros de óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y sus mezclas. El propionaldehído de polietilenglicol puede presentar ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua.

La cantidad de moléculas de polímero unidas de ese modo puede variar y un experto en el área podrá determinar el efecto en la función. Se puede mono-derivatizar o proveer una combinación di-, tri-, tetra- u otra combinación de derivatización, con los mismos o diferentes restos químicos (por ejemplo, polímeros, como pesos diferentes de polietilenglicoles). La proporción de moléculas de polímero por moléculas de proteína (o péptido) variará, como también lo hará sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la relación óptima (en términos de eficacia de reacción en el hecho de que no existe proteína o polímero sin reaccionar en exceso) se determinará por medio de factores como el grado deseado de derivatización (por ejemplo, mono-, di-, tri-, etc.), el peso molecular del polímero seleccionado, sea el polímero ramificado o no ramificado y las condiciones de la reacción.

Las moléculas de polietilenglicol (u otras porciones químicas) deberían unirse a la proteína con consideración de los efectos en los dominios funcionales o antigénicos de la proteína. Existe una cantidad de métodos de unión disponibles para aquellos expertos en la técnica. Véase por ejemplo, EP 0401384 (acoplamiento de PEG a G-CSF), véase también Malik et al., 1992, *Exp. Hematol.*, 20:1028-35 (pegilación indicadora de GM-CSF mediante cloruro de tresilo). Por ejemplo, el polietilenglicol puede unirse en forma covalente a través de residuos de aminoácidos por medio de un grupo reactivo, como un grupo de aminas libre o carboxilos. Los grupos reactivos son aquellos a los cuales puede unirse una molécula de polietilenglicol activado. Los residuos de aminoácidos que poseen un grupo de aminas libre pueden incluir residuos de lisina y el residuo de aminoácido del extremo N. Aquellos que poseen un grupo de carboxilos libre pueden incluir residuos de ácido aspártico, residuos de ácido glutámico y el residuo de aminoácido del extremo C. Los grupos de sulfhidrilo pueden utilizarse también como un grupo reactivo para unir las moléculas de polietilenglicol. Para fines terapéuticos, puede llevarse a cabo la unión en un grupo amino, como la unión en el grupo del extremo N o de lisina. La unión en los residuos, importante para la unión de receptores, debe evitarse si se desea la unión de receptores.

Se puede diseñar en forma específica una proteína químicamente modificada en un terminal amino. Mediante la utilización de polietilenglicoles a modo de ejemplo de las presentes composiciones, se puede seleccionar de varias moléculas de polietilenglicol (por peso molecular, ramificación, etc.), la proporción de moléculas de polietilenglicol por moléculas de proteína (o péptido) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de pegilación a realizarse y el método para obtener la proteína pegilada en el extremo N seleccionado. El método de obtención de la preparación pegilada en el extremo N (es decir, la separación de este resto de otros restos monopegiladas si es necesario) puede realizarse mediante la purificación del material pegilado en el extremo N de una población de moléculas de proteínas pegiladas. La modificación química selectiva del extremo N puede alcanzarse mediante la alquilación reductiva la cual explota la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina frente al extremo N) disponibles para la derivatización en una proteína en particular. Bajo las condiciones de reacción apropiadas, se obtiene la derivatización sustancialmente selectiva de una proteína en el extremo N con un grupo carbonilo que contiene un polímero. Por ejemplo, se puede pegar en forma selectiva la proteína en el extremo N mediante la realización de la reacción a un pH que permite aprovechar las diferencias de pKa entre el grupo amino epsilon de los residuos de lisina y el del grupo amino alfa del residuo de del extremo N de la proteína. Mediante dicha derivatización selectiva, se controla la unión de un polímero soluble en agua a una proteína, por ejemplo, la conjugación con el polímero sucede en forma predominante en el extremo N de la proteína y no ocurre una modificación significativa de otros grupos reactivos, como los grupos amino de cadena lateral de lisina. Mediante la utilización de la alquilación reductiva, el polímero soluble en agua puede ser del tipo descrito con anterioridad y debe tener un aldehído reactivo único para unirse a la proteína. Puede utilizarse propionaldehído de glicol de polietileno con un aldehído reactivo único.

La pegilación puede llevarse a cabo mediante cualquiera de las reacciones de pegilación conocidas en el área. Véase, por ejemplo, *Focus on Growth Factors*, 1992, 3: 4-10; EP 0154316, EP 0401384; y las otras publicaciones que se citan en el presente que se refieren a la pegilación. La pegilación puede llevarse a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula reactiva de polietilenglicol (o un polímero análogo reactivo soluble en agua).

Por lo tanto, se contempla, que los polipéptidos de receptor solubles a utilizarse de conformidad con la presente invención, pueden incluir proteínas o variantes de receptores solubles pegiladas, en donde el o los grupos PEG se unen mediante grupos acilo o alquilo. Dichos productos puede ser mono-pegilados o poli-pegilados. En general, los grupos PEG se unen a la proteína en los grupos amino α o ϵ de aminoácidos, pero también se contempla que los

grupos PEG podrían unirse a cualquier grupo amino unido a la proteína, el cual es suficientemente reactivo como para unirse al grupo PEG bajo condiciones de reacción apropiadas.

Las moléculas de polímeros utilizadas en los enfoques de acilación y alquilación pueden seleccionarse entre los polímeros solubles en agua que se describieron con anterioridad. El polímero seleccionado debería ser modificado para tener un grupo reactivo único, como un éster activo para la acilación o un aldehído para la alquilación, de modo que el grado de polimerización pueda controlarse tal como se asegura en los presentes métodos. Un aldehído PEG reactivo a modo de ejemplo es el propionaldehído de glicol de polietileno, el cual es estable en agua o mono alcoxi C1-C10 o derivados de ariloxi del mismo (véase Patente de los Estados Unidos N° 5,252,714). El polímero puede ser ramificado o no ramificado. Para las reacciones de acilación, el o los polímeros seleccionados deberían tener un grupo éster reactivo único. Para la alquilación reductiva presente, el o los polímeros seleccionados deberían tener un grupo aldehído reactivo único. En general, el polímero soluble en agua no se seleccionará de residuos de glicosilo que ocurren en forma natural ya que estos se realizan habitualmente y en forma más conveniente mediante sistemas de expresión recombinante de mamíferos. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. Un polímero soluble en agua para su utilización en el presente documento es el polietilenglicol. Tal como se utiliza en el presente documento, el polietilenglicol está destinado a abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivatizar otras proteínas, como mono alcoxi (C1-C10) - o ariloxi-polietilenglicol.

Otros parámetros de reacción, como solvente, tiempos de reacción, temperaturas, etc. y medios de purificación de productos, pueden determinarse caso por caso basándose en la información publicada en relación a la derivatización de proteínas con polímeros solubles en agua (véase las publicaciones que se citan en el presente documento). En ciertas realizaciones, el agente de unión a Wnt es un polipéptido que no deriva de un FZD o SFRP humana. Se conoce en la técnica varios métodos para identificar y producir polipéptidos que se unen con una alta afinidad a una proteína diana. Véase, por ejemplo, Skerra, 2007, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18:295-304; Hosse et al., 2006, *Protein Science*, 15:14-27; Gill et al., 2006, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17:653-58; Nygren, 2008, *FEBS J.*, 275:2668-76; y Skerra, 2008, *FEBS J.*, 275:2677-83. En determinadas realizaciones, se ha utilizado tecnología de exhibición de fagos para identificar/producir el policonector peptídico a Wnt. En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende un andamiaje proteico de un tipo seleccionado del grupo que consiste en proteína A, una lipocalina, un dominio de fibronectina, un dominio de repetición de consenso de anquirina y tioredoxina.

En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt es una molécula no proteica. En determinadas realizaciones, el agente es una molécula pequeña. Los expertos en la técnica conocen bibliotecas de química combinatorial y técnicas útiles para la identificación de agentes de unión a Wnt no proteicos. Véase, por ejemplo, Kennedy et al., 2008, *J. Comb. Chem.*, 10:345-54; Dolle et al, 2007, *J. Comb. Chem.*, 9:855-902; y Bhattacharyya, 2001, *Curr. Med. Chem.*, 8:1383-404. En determinadas realizaciones adicionales, el agente es un carbohidrato, un glicosaminoglicano, una glicoproteína o un proteoglicano.

En determinadas realizaciones, el agente es un aptámero de ácido nucleico. Los aptámeros son moléculas de polinucleótidos que se seleccionan (por ejemplo, de agrupaciones al azar o mutagenizadas) basándose en su habilidad para unirse a otra molécula. En algunas realizaciones, el aptámero comprende un polinucleótido de ADN. En determinadas realizaciones alternativas, el aptámero comprende un polinucleótido de ARN. En determinadas realizaciones, el aptámero comprende uno o más residuos de ácido nucleico modificado. Los métodos para generar y analizar aptámeros de ácido nucleico para la unión a proteínas son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N° 5,270,163; 5,683,867; 5,763,595; 6,344,321; 7,368,236; 5,582,981; 5,756,291; 5,840,867; 7,312,325; y 7,329,742, Publicación de Patente Internacional N° WO 02/077262 y WO 03/070984, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2005/0239134; 2005/0124565; y 2008/0227735.

En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt tiene una semivida circulante en ratones, monos, cinomólogos o seres humanos de al menos alrededor de 5 horas, al menos alrededor de 10 horas, al menos alrededor de 24 horas, al menos alrededor de 3 días, al menos alrededor de 1 semana o al menos alrededor de 2 semanas. En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt es un anticuerpo IgG (por ej., IgG1 o IgG2) que tiene una semivida circulante en ratones, monos, cinomólogos o seres humanos de al menos alrededor de 10 horas, al menos alrededor de 24 horas, al menos alrededor de 3 días, al menos alrededor de 1 semana o al menos alrededor de 2 semanas. Los métodos para aumentar la semivida de agentes tales como polipéptidos y anticuerpos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los métodos conocidos para aumentar la semivida circulante de los anticuerpos IgG incluyen la introducción de mutaciones en la región Fc que aumentan la unión dependiente de pH al anticuerpo del receptor Fc neonatal (FcRn) en pH 6.0 (véase, por ej., las publicaciones de patentes estadounidenses N° 2005/0276799, 2007/0148164 y 2007/0122403). Los métodos conocidos para aumentar la semivida circulante de fragmentos de anticuerpos que no tienen la región Fc incluyen tales técnicas como la pegilación.

En determinadas realizaciones, los agentes de unión a Wnt y polipéptidos, tal como se describe en el presente documento, poseen una semivida de al menos alrededor de 50 horas en una rata cuando se administran por la vena de la cola a una dosis que va desde alrededor de 2mg/kg a alrededor de 10mg/kg. En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt o polipéptido posee una semivida de al menos alrededor de 50 horas en una rata cuando se

administra por la vena de la cola a una dosis de alrededor de 10mg/kg. En determinadas realizaciones, el agente o polipéptido posee una semivida de al menos alrededor de 100 horas en una rata cuando se administra por la vena de la cola a una dosis que va desde alrededor de 2mg/kg a alrededor de 10mg/kg. En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt o polipéptido posee una semivida de al menos alrededor de 100 horas en una rata cuando se administra por la vena de la cola a una dosis de alrededor de 10mg/kg. En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt posee una semivida de al menos alrededor de 120 horas en una rata cuando se administra por la vena de la cola a una dosis que va desde alrededor de 2mg/kg a alrededor de 10mg/kg. En ciertas realizaciones, el agente de unión a Wnt posee una semivida de al menos alrededor de 150 horas cuando se administra por la vena de la cola a una dosis que va desde alrededor de 2mg/kg a alrededor de 10mg/kg.

En determinadas realizaciones, el agente es un receptor FZD soluble que comprende un dominio Fri de un receptor FZD humano (o un fragmento o variante del dominio Fri que une una o más Wnt) y una región Fc humana y posee una semivida *in vivo* (por ejemplo, en un ratón o rata) que es más larga que un receptor FZD soluble que comprende el dominio extracelular del receptor FZD y una región Fc humana.

Se suministran las células que producen los agentes de unión a Wnt o polipéptidos que se describen en el presente. En algunas realizaciones, la célula produce un agente de unión a Wnt soluble que comprende un dominio Fri del FZD8 humano, en donde al menos alrededor del 80 % del agente de unión a Wnt posee una secuencia del extremo N de ASA. En algunas realizaciones, la célula produce un agente de unión a Wnt soluble que comprende un dominio Fri del FZD8 humano, en donde al menos alrededor del 85 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 95 % o al menos alrededor del 98 % del agente de unión a Wnt posee una secuencia del extremo N de ASA. En algunas realizaciones, la célula es una célula mamífera. En algunas realizaciones, la célula produce un agente de unión a Wnt que comprende una región Fc humana. En algunas realizaciones, la célula produce un agente de unión a Wnt que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48 y SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, la célula produce un agente de unión a Wnt que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53. En algunas realizaciones, la célula produce un agente de unión a Wnt que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50.

Se suministran los agentes de unión a Wnt producidos por las células que se describen en el presente documento.

También se suministran las composiciones que comprenden los agentes de unión a Wnt o polipéptidos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición comprende un agente de unión a Wnt soluble que comprende un dominio Fri del FZD8 humano, en donde al menos alrededor del 80 % del agente de unión a Wnt posee una secuencia del extremo N de ASA. En algunas realizaciones, la composición comprende un agente de unión a Wnt soluble que comprende un dominio Fri del FZD8 humano, en donde al menos alrededor del 85 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 95 % o al menos alrededor del 98 % del agente de unión a Wnt posee una secuencia del extremo N de ASA. En algunas realizaciones, la composición comprende un agente de unión a Wnt que comprende una región Fc humana. En algunas realizaciones, la composición comprende un agente de unión a Wnt que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48 y SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, la composición comprende un agente de unión a Wnt que comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:53. En algunas realizaciones, la composición comprende un agente de unión a Wnt que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50. En algunas realizaciones, las composiciones tal como se describen en el presente documento además comprenden un portador farmacéuticamente aceptable.

Se suministran también los métodos de utilización de las composiciones que comprenden los agentes de unión a Wnt o polipéptidos que se describen en el presente documento.

III. Polinucleótidos

En determinadas realizaciones, la invención abarca polinucleótidos que comprenden polinucleótidos que codifican un polipéptido que se une específicamente a una proteína Wnt humana o un fragmento de dicho polipéptido. Por ejemplo, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor FZD soluble o codifica un fragmento de dicho receptor soluble. En algunas realizaciones, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una SFRP soluble, una proteína Ror soluble o codifica un fragmento de dicha proteína soluble. En algunas realizaciones, los polinucleótidos comprenden polinucleótidos que codifican cualquiera de los agentes de unión a Wnt tal como se describe en el presente documento. Los polinucleótidos de la invención pueden encontrarse en la forma de ARN o en la forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético; y puede ser de cadena doble o cadena simple y si es de cadena simple, puede ser de cadena codificante o no codificante (anti sentido).

En determinadas realizaciones, los polinucleótidos se aíslan. En determinadas realizaciones, los polinucleótidos son sustancialmente puros.

La invención provee un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ

ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66 y SEQ ID NO:75. En algunas realizaciones, el polinucleótido además comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de señal de polipéptido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73 y SEQ ID NO:74. En algunas realizaciones, el polinucleótido además comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de señal de polipéptido seleccionada de un grupo que consta de SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73 y SEQ ID NO:74. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que posee la secuencia de SEQ ID NO:71 y SEQ ID NO:50. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que posee la secuencia de SEQ ID NO:71 y SEQ ID NO:53. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que posee la secuencia de SEQ ID NO:75. La invención además proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO:2.

La invención provee un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de señal seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73 y SEQ ID NO:74; un dominio Fri del FZD8 humano; y una región Fc humana. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de señal de SEQ ID NO:71; un dominio Fri del FZD8 humano; y una región Fc humana.

También se proporciona un polinucleótido que comprende un polinucleótido que hibridiza a un polinucleótido que posee la secuencia de SEQ ID NO:2 y/o a un polinucleótido que codifica un polipéptido que posee la secuencia de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66 y SEQ ID NO:75. En determinadas realizaciones, la hibridación se encuentra bajo condiciones de alto rigor.

En determinadas realizaciones, los polinucleótidos comprenden la secuencia codificante para el polipéptido maduro unido en el mismo marco de lectura a un polinucleótido que asiste, por ejemplo, en la expresión y la secreción de un polipéptido de una célula hospedadora (por ejemplo, una secuencia líder o secuencia de señal que funciona como una secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido desde la célula). El polipéptido que posee una secuencia líder es una preproteína y puede poseer la secuencia líder escindida por la célula hospedadora para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar para una proproteína que es la proteína madura más residuos de aminoácidos 5' adicionales. Una proteína madura que posee una prosequencia es una proproteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que la prosequencia se escinde, persiste una proteína madura.

En determinadas realizaciones, los polinucleótidos comprenden la secuencia codificante para el polipéptido maduro unido en el mismo marco de lectura a una secuencia marcadora que permite, por ejemplo, la purificación del polipéptido codificado. Por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hexahistidina suministrada por un vector pQE-9 para garantizar la purificación del polipéptido maduro unido al marcador en el caso de un hospedador bacteriano o la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) derivada de la proteína de hemaglutinina de influenza cuando se utiliza un hospedador mamífero (por ejemplo, células COS-7).

La presente invención además se refiere a variantes de los polinucleótidos codificantes a los que se hizo referencia con anterioridad en el presente, por ejemplo, fragmentos, análogos y derivados. Los fragmentos o porciones de los polinucleótidos de la presente invención pueden utilizarse para sintetizar los polinucleótidos de longitud completa de la presente invención.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona polinucleótidos aislados que comprenden polinucleótidos que poseen una secuencia de nucleótidos al menos un 80 % idéntica, al menos un 85 % idéntica, al menos un 90 % idéntica, al menos un 95 % idéntica y en algunas realizaciones, al menos un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % idéntica a un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un receptor FZD soluble u otro agente de unión a Wnt que se describe en el presente documento.

Por un polinucleótido que posee una secuencia al menos, por ejemplo, 95 % "idéntica" a una secuencia de nucleótido de referencia se entiende que la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones de punto por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que posee una secuencia de nucleótidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia puede eliminarse o sustituirse con otro nucleótido o una cantidad de nucleótidos hasta un 5 % del total de nucleótidos en la secuencia de referencia puede introducirse en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones del extremo amino o carboxi de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre aquellas posiciones del extremo, intercaladas en forma individual entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, las regiones no codificantes o ambas. En algunas realizaciones, las variantes de polinucleótidos contienen alteraciones que

producen sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos silenciosas, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunas realizaciones, las variantes de nucleótidos se producen mediante sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. En algunas realizaciones, las variantes de nucleótidos comprenden secuencias de nucleótidos que resultan en diferencias de expresión (por ejemplo, aumento o reducción de la expresión), a pesar de que la secuencia de aminoácido no cambia. Las variantes de polinucleótidos pueden producirse por varias razones, por ejemplo, para optimizar la expresión del codón para un hospedador en particular (cambiar codones en el ARNm humano a aquellos preferidos por un hospedador bacteriano como *E. coli*).

Los polinucleótidos que se describen en el presente documento pueden producirse mediante todo método adecuado conocido en la técnica. Tal como se describe en el presente documento, en algunas realizaciones, una secuencia de ADN se construye mediante la utilización de tecnología recombinante, por medio del aislamiento o síntesis de una secuencia de ADN que codifica una proteína de tipo salvaje de interés. En algunas realizaciones, se construye una secuencia de ADN mediante tecnología recombinante mediante el aislamiento de más de una secuencia de ADN que codifica dos polipéptidos de interés y la unión de estas secuencias de ADN para generar una proteína de fusión.

En algunas realizaciones, puede construirse una secuencia de ADN mediante síntesis química por medio de un sintetizador de oligonucleótidos. Dichos oligonucleótidos pueden diseñarse basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado. Pueden aplicarse métodos estándar para sintetizar una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de interés. Por ejemplo, puede utilizarse una secuencia completa de aminoácidos para construir un gen de traducción inversa. Además, puede sintetizarse un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en particular. Por ejemplo, puede sintetizarse varios oligonucleótidos pequeños que codifican porciones del polipéptido deseado y luego unirse. Los oligonucleótidos individuales contienen, normalmente, salientes de 5' o 3' para el ensamblaje complementario. En algunas realizaciones, se sintetiza una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión deseada de modo que dos polipéptidos se unen directamente sin la intervención del enlace peptídico.

Una vez ensambladas (mediante síntesis, mutagénesis dirigida al sitio, tecnología recombinante u otro método), las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido específico de interés pueden introducirse en un vector de expresión y unirse operativamente a una secuencia de control de expresión apropiada para la expresión del polipéptido en un hospedador deseado. El ensamblaje correcto puede confirmarse mediante la secuenciación de nucleótidos, mapeo de restricción y/o expresión de un polipéptido biológicamente activo en un hospedador idóneo. Como se conoce muy bien en la técnica, a fin de obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un hospedador, el gen debe unirse operativamente a secuencias de control de expresión de transcripción y traducción que son funcionales en el hospedador de expresión seleccionado.

Se suministran los vectores que comprenden los poligonucleótidos que se describen en el presente documento. También se proporcionan las células que comprenden los vectores o poligonucleótidos que se describen en el presente documento.

IV. Composiciones farmacéuticas

La presente invención además proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden agentes (por ejemplo, receptores FZD solubles) que unen una o más proteínas Wnt y/o son antagonistas Wnt. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden agentes de unión a Wnt y polipéptidos tal como se describe en el presente documento. Estas composiciones farmacéuticas encuentran su uso en la inhibición del crecimiento de células tumorales y el tratamiento del cáncer en pacientes humanos. En algunas realizaciones, los agentes de unión a Wnt, tal como se describe en el presente documento, encuentran su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Las formulaciones se preparan para el almacenamiento y utilización mediante la combinación de un agente purificado o antagonista de la presente invención con un portador, excipiente y/o estabilizador aceptable en términos farmacéuticos como un polvo liofilizado estéril, una solución acuosa, etc. (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición*, University of the Sciences, Filadelfia, 2005). Los portadores, excipientes o estabilizadores adecuados abarcan amortiguadores no tóxicos como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales como cloruro de sodio; antioxidantes con la inclusión de ácido ascórbico y metionina; conservantes (por ejemplo, cloruro de amonio de octadecildimetilbenzilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; alcohol de fenol, butilo o bencilo; parabenos de alquilo, como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (como menos de alrededor 10 residuos de aminoácidos); proteínas como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; carbohidratos como monosacandros, disacáridos, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra iones formadores de sal como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de proteína Zn); y/o surfactantes no iónicos como TWEEN o polietilenglicol (PEG).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse en cualquier cantidad de maneras

para el tratamiento local o sistémico. La administración puede ser tópica (como a las membranas mucosas con la inclusión de administración vaginal y rectal) como parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, genes, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos; pulmonar (por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluso mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica o transdérmica); oral; o parenteral incluyendo inyección o infusión intravenosa, intra arterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal (por ejemplo, intratecal o intraventricular).

La formulación terapéutica puede encontrarse en forma de dosis por unidad. Dichas formulaciones incluyen comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones en agua o medio no acuoso o supositorios para administración oral, parenteral o rectal o para administración por medio de la inhalación. En composiciones sólidas como los comprimidos, el ingrediente activo principal se mezcla con un portador farmacéutico. Los ingredientes de comprimidos convencionales incluyen maicena, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio o gomas y otros diluyentes (por ejemplo agua) para formar una composición de preformulación sólida con una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención o una sal no tóxica aceptable en términos farmacéuticos de la misma. La composición de preformulación sólida luego se subdivide en formas de dosis por unidad del tipo descrito con anterioridad. Los comprimidos, píldoras, etc., de la composición novedosa pueden cubrirse o componerse de otro modo para proveer una forma de dosis que proporcione la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender una composición interna cubierta por un componente externo. Además, los dos componentes pueden separarse por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración y permite al componente interno pasar intacto a través del estómago o para retrasarse en la liberación. Puede utilizarse varios materiales para dichas capas o coberturas entéricas, con la inclusión de una cantidad de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales como laca, alcohol de cetilo y acetato de celulosa.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen antagonistas (por ejemplo, agentes de unión a Wnt) de la presente invención que se combinan con liposomas (Epstein et al., 1985, *PNAS*, 82:3688; Hwang et al., 1980, *PNAS*, 77:4030; y Patente de los Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545). Los liposomas con tiempo de circulación mejorados se describen en la Patente de los Estados Unidos 5.013.556. Los liposomas pueden generarse por evaporación de fagos inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina (PEG-PE) derivada de PEG. Los liposomas se extrudan a través de filtros de tamaño de poro definido para proporcionar liposomas con el diámetro deseado.

El antagonista (por ejemplo un agente de unión a Wnt) también puede atraparse en microcápsulas. Dichas microcápsulas se preparan, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones tal como se describe en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª Edición, University of the Sciences, Filadelfia, 2005.

Además, pueden realizarse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos de preparaciones de liberación sostenida adecuadas incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el agente, cuyas matrices se encuentran en la forma de objetos con forma (por ejemplo, películas o micro cápsulas). Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles como poli(2-hidroxiethyl-metacrilato) o poli(vinilalcohol), polilactidas (Patente de los Estados Unidos N° 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, acetato de vinil etileno no degradable, copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico degradables como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido glicólico-ácido láctico y acetato de leuprolida), isobutirato de acetato de sacarosa y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

V. Métodos de uso

Los agentes de unión a Wnt (incluyendo receptores solubles) de la invención son útiles en varias aplicaciones incluyendo de modo no taxativo, métodos de tratamiento terapéutico, como el tratamiento del cáncer. En determinadas realizaciones, los agentes son útiles para inhibir la señalización Wnt (por ejemplo, la señalización Wnt canónica), inhibir el crecimiento tumoral, inducir la diferenciación, reducir el volumen tumoral, reducir la frecuencia de células madre cancerosas, y/o reducir la tumorigenicidad de un tumor. Los métodos de uso pueden ser métodos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt o polipéptido es un antagonista de una o más proteínas Wnt humanas a las cuales se une.

En determinadas realizaciones, los agentes de unión a Wnt o antagonistas se utilizan en el tratamiento de una enfermedad asociada a la activación de la señalización Wnt. En realizaciones específicas, la enfermedad es una enfermedad que depende de la señalización Wnt. En realizaciones específicas, la señalización Wnt es la señalización Wnt canónica. En determinadas realizaciones, los agentes de unión a Wnt o antagonistas se utilizan en el tratamiento de trastornos caracterizados por el aumento de niveles de células madre y/o células progenitoras.

En determinadas realizaciones, la enfermedad tratada con el agente de unión a Wnt o antagonista (por ejemplo, un receptor FZD soluble, una proteína derivada de SFRP o receptor Ror soluble) es cáncer. En determinadas

realizaciones, el cáncer se caracteriza por tumores dependientes de Wnt. En determinadas realizaciones, el cáncer se caracteriza por tumores que expresan una o más Wnt a las cuales se une el agente de unión a Wnt (por ejemplo, receptor soluble).

5 En determinadas realizaciones, la enfermedad tratada con el agente de unión a Wnt o antagonista no es cáncer. Por ejemplo, la enfermedad puede ser un trastorno metabólico como la obesidad o diabetes (por ejemplo, diabetes tipo II) (Jin T., 2008, *Diabetología*, 51:1771-80). En forma alternativa, la enfermedad puede ser un trastorno óseo como la osteoporosis, osteoartritis o artritis reumatoide (Corr M., 2008, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 4:550-6; Day et al., 2008, *Bone Joint Surg. Am.*, 90 Suppl 1:19-24). La enfermedad puede ser también un trastorno renal, como una enfermedad renal poliquística (Harris et al., 2009, *Ann. Rev. Med.*, 60:321-37; Schmidt-Ott et al., 2008, *Kidney Int.*, 74:1004-8; Benzing et al., 2007, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 18:1389-98). En forma alternativa, pueden tratarse trastornos de la vista, incluyendo de modo no taxativo, degeneración macular y vitreorretinopatía exudativa familiar (Lad et al., 2009, *Stem Cells Dev.*, 18:7-16). También pueden tratarse trastornos cardiovasculares, incluyendo infarto de miocardio, aterosclerosis y trastornos de válvulas (Al-Aly Z., 2008, *Transl. Res.*, 151:233-9; Kobayashi et al., 2009, *Nat. Cell Biol.*, 11:46-55; van Gijn et al., 2002, *Cardiovasc. Res.*, 55:16-24; Christman et al., 2008, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 294:H2864-70). En algunas realizaciones, la enfermedad es un trastorno pulmonar como hipertensión arterial pulmonar idiopática o fibrosis pulmonar (Laumanns et al., 2008, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2009, 40:683-91; Königshoff et al., 2008 *PLoS ONE*, 3:e2142). En algunas realizaciones, la enfermedad tratada con el agente de unión a Wnt es una enfermedad hepática, como la cirrosis o fibrosis hepática, (Cheng et al., 2008, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 294:G39-49).

La presente invención proporciona métodos para el tratamiento del cáncer que comprenden la administración de una cantidad eficaz en términos terapéutica de un agente de unión a Wnt a un sujeto (por ejemplo, un sujeto que necesita tratamiento). En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer seleccionado de un grupo que consta de cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, melanoma, cáncer de cuello de útero, cáncer de vejiga, glioblastoma y cáncer de cabeza y cuello. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer pancreático. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer colorrectal. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama. En determinadas realizaciones el sujeto es un ser humano.

La presente invención además proporciona métodos para la inhibición del crecimiento tumoral mediante la utilización de agentes de unión a Wnt que se describen en el presente. En determinadas realizaciones, el método para inhibir el crecimiento tumoral comprende el contacto del tumor o célula tumoral con un agente de unión a Wnt *in vitro*. Por ejemplo, se cultiva una línea celular inmortalizada o una línea celular cancerosa que expresa la o las Wnt diana en medio al cual se agrega el agente de unión a Wnt para inhibir el crecimiento de células de tumor. En algunas realizaciones, las células tumorales se aíslan de una muestra de un paciente como, por ejemplo, una biopsia de tejido, efusión pleural o muestra de sangre y cultivada en medio al cual se agrega un agente de unión a Wnt para inhibir el crecimiento de células tumorales.

En algunas realizaciones, el método de inhibición de células tumorales comprende el contacto con el tumor o las células tumorales con el agente de unión a Wnt (por ejemplo, un receptor FZD soluble) *in vivo*. En determinadas realizaciones, el contacto de un tumor o células tumorales con un agente de unión a Wnt se lleva a cabo en un modelo animal. Por ejemplo, los agentes de unión a Wnt pueden administrarse a xenoinjertos que expresan una o más Wnt que han crecido en ratones inmunodeprimidos (por ejemplo, ratones NOD/SCID) para inhibir el crecimiento tumoral. En determinadas realizaciones, las células madre cancerosas se aíslan de una muestra de paciente como, por ejemplo, una biopsia de tejido, efusión pleural o muestra de sangre y se inyecta en ratones inmunodeprimidos a los que luego se les administra una agente de unión a Wnt para inhibir el crecimiento de células tumorales. En algunas realizaciones, se administra un agente de unión a Wnt al mismo tiempo o poco después de la introducción de células tumorigénicas en el animal para prevenir el crecimiento tumoral. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt se administra como un producto terapéutico luego de que las células tumorigénicas han crecido hasta llegar a un tumor de un tamaño especificado.

En determinadas realizaciones, el método de inhibición de crecimiento de un tumor comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a Wnt. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En determinadas realizaciones, el sujeto posee un tumor o se le ha extraído un tumor.

La invención también proporciona métodos para la reducción de la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, que comprende células madre cancerosas. El método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a Wnt a un sujeto. Además, se suministran métodos para la inducción de la diferenciación de células tumorales en un sujeto, en donde el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a Wnt al sujeto. En algunas realizaciones, los métodos para inducir la expresión de marcadores de diferenciación en un tumor comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a Wnt a un sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor en el cual la señalización de Wnt se encuentra activa. En

- determinadas realizaciones, la señalización de Wnt que se encuentra activa es una señalización de Wnt canónica. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor que depende de Wnt. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tumor es sensible a la sobre expresión de axina. En determinadas realizaciones, el tumor no comprende una mutación inactivante (por ejemplo, una mutación truncante) en el gen supresor del tumor de poliposis cólica
- 5 adenomatosa (APC) o una mutación activante en el gen beta-catenina. En determinadas realizaciones, el tumor expresa uno o más genes en un distintivo del gen Wnt. En determinadas realizaciones, el cáncer por el cual se trata a un sujeto involucra a dicho tumor.
- En determinadas realizaciones, el tumor expresa una o más proteínas Wnt a las que se une el agente de unión. En
- 10 determinadas realizaciones, el tumor sobre expresa las Wnt humanas.
- En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor seleccionado del grupo que consta de tumor colorrectal, tumor pancreático, tumor pulmonar, tumor de ovarios, tumor de hígado, tumor de mama, tumor de riñón, tumor de próstata, tumor gastrointestinal, melanoma, tumor del cuello del útero, tumor de vejiga, glioblastoma y tumor de cabeza y
- 15 cuello. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor colorrectal. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor pancreático. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor de mama.
- La invención también proporciona un método para inhibir la señalización de Wnt en una célula que comprende el contacto con la célula con una cantidad eficaz del agente de unión a Wnt. En determinadas realizaciones, la célula
- 20 es una célula de tumor. En determinadas realizaciones, el método es un método *in vivo* en donde la etapa de poner en contacto la célula con el agente comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del agente a un sujeto. En algunas realizaciones alternativas, el método es un método *in vitro* o *ex vivo*. En determinadas realizaciones, la señalización de Wnt que se inhibe es una señalización de Wnt canónica. En determinadas realizaciones, la señalización de Wnt señala mediante Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, Wnt7b y/o Wnt10b. En
- 25 determinadas realizaciones, la señalización Wnt señala mediante Wnt1, Wnt3a, Wnt7b y/o Wnt10b.
- Además, la invención provee un método de reducción de la tumorigenicidad de un tumor en un sujeto, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a Wnt al sujeto. En determinadas realizaciones, el tumor comprende células madre cancerosas. En algunas realizaciones, la tumorigenicidad de un tumor se reduce al disminuir la frecuencia de células madre cancerosas en el tumor. En determinadas realizaciones, la frecuencia de las células madre cancerosas en el tumor se reduce mediante la administración de un agente de unión a Wnt. En determinadas realizaciones, el agente o anticuerpo es capaz de reducir la tumorigenicidad de un tumor que comprende células madre cancerosas en un modelo animal tal como un modelo de xenoinjerto de ratón. En determinadas realizaciones, la cantidad o frecuencia de células madre cancerosas en un tumor se reduce en al menos alrededor de dos veces, alrededor de tres veces, alrededor de cinco veces, alrededor de diez veces, alrededor de 50 veces, alrededor de 100 veces o alrededor de 1000 veces. En determinadas realizaciones, la reducción en la cantidad o frecuencia de células madre cancerosas se determina mediante un ensayo de dilución limitante usando un modelo animal. Pueden encontrarse ejemplos y orientación adicionales en cuanto al uso de ensayos de dilución limitantes para determinar una reducción en la cantidad o frecuencia de células madre cancerosas en un tumor en, por ejemplo, la Publicación Internacional N° WO 2008/042236, la publicación de solicitud de patente estadounidense N° 2008/0064049 y la publicación de solicitud de patente estadounidense N° 2008/0178305.
- 30 Por lo tanto, la invención también proporciona un método para reducir la frecuencia de las células madre cancerosas en un tumor que comprende células madre cancerosas. El método comprende poner el tumor en contacto con una cantidad eficaz de un agente de unión a Wnt (por ejemplo, un receptor FZD soluble, un receptor Ror soluble o una fusión SFRP-Fc).
- La invención además proporciona métodos para diferenciar células tumorigénicas en células no tumorigénicas que comprende poner las células tumorigénicas en contacto con un agente de unión a Wnt (por ejemplo, mediante la administración de un agente de unión a Wnt a un sujeto que tiene un tumor que comprende células tumorigénicas o al que se le ha extraído un tumor). En determinadas realizaciones, las células tumorigénicas son células tumorales pancreáticas. En determinadas realizaciones alternativas, las células tumorigénicas son células tumorales de colon.
- 50 También se proporciona el uso de los agentes de unión a Wnt que se describe en el presente documento para inducir la diferenciación de células, incluyendo de modo no taxativo, células tumorales. Por ejemplo, se conceptualizan los métodos para inducir la diferenciación de células comprenden poner las células en contacto con una cantidad eficaz de un agente de unión a Wnt (por ejemplo, un receptor FZD soluble, un receptor Ror soluble o una fusión SFRP-Fc) que se describen en el presente documento. También se proporcionan los métodos para inducir la diferenciación de células en un tumor en un sujeto comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a Wnt al sujeto. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor pancreático. En otras realizaciones determinadas, el tumor es un tumor de colon.
- 60 También se proporcionan los métodos para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto en donde la enfermedad o trastorno se asocia a la activación de la señalización de Wnt y/o se caracteriza por un aumento en el nivel de células madre y/o células progenitoras. En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento comprenden la
- 65

administración de una cantidad eficaz en términos terapéuticos del agente de unión a Wnt al sujeto. En determinadas realizaciones, la señalización Wnt es una señalización Wnt canónica.

5 Los agentes de unión a Wnt o antagonistas se administran como una composición farmacéutica apropiada a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos. Los métodos idóneos de administración incluyen de modo no taxativo, vías intravenosas (administración en bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo), intramusculares, intraperitoneales, intracerebroespinales, subcutáneas, intra-articulares, intrasinoviales, intratecales, orales, tópicos o por inhalación.

10 En determinadas realizaciones, además a la administración de un agente de unión a Wnt, el método o tratamiento además comprende la administración de un segundo agente terapéutico (por ejemplo, un agente anti-cáncer) en forma previa, al mismo tiempo y/o en forma posterior a la administración del agente de unión a Wnt. También se proporcionan las composiciones farmacéuticas que comprenden el agente de unión a Wnt y el segundo agente terapéutico.

15 Se observará que la combinación de un agente de unión a Wnt y un segundo agente terapéutico puede administrarse en cualquier orden o al mismo tiempo. En realizaciones seleccionadas, los agentes de unión a Wnt se administrarán a pacientes que se han tratado previamente con el segundo agente terapéutico. En otras realizaciones determinadas, el agente de unión a Wnt y el segundo agente terapéutico se administrarán sustancialmente en forma simultánea o concurrente. Por ejemplo, un sujeto puede recibir el agente de unión a Wnt mientras que se está tratando con el segundo agente terapéutico (por ejemplo, quimioterapia). En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt se administrará dentro de 1 año del tratamiento con el segundo agente terapéutico. En determinadas realizaciones alternativas, el agente de unión a Wnt se administrará dentro de los 10, 8, 6, 4 o 2 meses de todo tratamiento con el segundo agente terapéutico. En otras realizaciones determinadas, el agente de unión a Wnt se administrará dentro de las 4, 3, 2 o 1 semanas de todo tratamiento con un segundo agente terapéutico. En algunas realizaciones el agente de unión a Wnt se administrará dentro de los 5, 4, 3, 2 o 1 de todo tratamiento con el segundo agente terapéutico. Se observará además, que los dos agentes o tratamiento pueden administrarse al sujeto dentro de una cuestión de horas o minutos (es decir, sustancialmente en forma simultánea).

30 La terapia de combinación con al menos dos agentes terapéuticos generalmente utiliza agentes que trabajan por diferentes mecanismos de acción, a pesar de que esto no es necesario. La terapia de combinación que utiliza agentes con diferentes mecanismos de acción puede resultar en efectos aditivos o sinérgicos. La terapia de combinación puede permitir una dosis más baja de cada agente que aquella que se utiliza en la monoterapia, por lo tanto reduce los efectos secundarios tóxicos. La terapia de combinación puede reducir la probabilidad de desarrollo de células cancerosas resistentes. En algunas realizaciones, la terapia de combinación comprende un agente terapéutico que afecta (por ejemplo, inhibe o destruye) células no tumorigénicas y un agente terapéutico que afecta (por ejemplo, inhibe o destruye) CSC tumorigénicas.

40 Las clases útiles de agentes terapéuticos (por ejemplo, anticancerosos) incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas, uniones de fisuras menores de ADN, inhibidores de replicación de ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino como complejos de cis-platino, mono(platino), bis(platino) y platino tri-nuclear y carboplatino), antraciclina, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizador de quimioterapia, duocarmicinas, etoposidos, pirimidinas fluoradas, ionoforos, lexitropsinas, nitrosureas, platinoles, compuestos de realización, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores de radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasa, alcaloides de vinca o similares. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un antimetabolito, un antimetabólico, un inhibidor de topoisomerasa o un inhibidor de angiogénesis.

50 Los agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con los agentes de unión a Wnt incluyen agentes quimioterapéuticos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el método o tratamiento implica la administración combinada de un agente de unión a Wnt de la presente invención y un agente quimioterapéutico o cóctel de diferentes agentes quimioterapéuticos múltiples. El tratamiento con un agente de unión a Wnt puede ocurrir en forma previa, al mismo tiempo o en forma posterior a la administración de quimioterapias. Las quimioterapias que se contemplan en la invención incluyen sustancias químicas o fármacos conocidos en la técnica y disponibles en los comercios, como gemcitabina, irinotecano, doxorubicina, 5-fluorouracilo, citosina arabinosida ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, paclitaxel, metotrexato, cisplatino, melfalan, vinblastina y carboplatino. La administración combinada puede incluir la coadministración, en una formulación farmacéutica única o en formulaciones por separado o administración consecutiva en cualquier orden, pero generalmente dentro de un período de tiempo que permita que todos los agentes activos puedan emplear sus actividades biológicas en forma simultánea. Los cronogramas de preparación y dosis para dichos agentes quimioterapéuticos pueden utilizarse de acuerdo a las instrucciones del fabricante o tal como lo determine en forma empírica el experto. Los cronogramas de preparación y dosis para dicha quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992)*.

65 Los agentes quimioterapéuticos útiles en la presente invención también incluyen, de modo no taxativo, agentes alquilantes como tiotepa y ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas con la inclusión de

altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosfaoramida y trimetilolmelamina; mostazas de nitrógeno como clorambucilo, clornafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de óxido de mecloretamina, melfalan, novembichina, fensterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas como carmustina, clorozotocin, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, caminomicina, carzinofilin, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatin, zorubicina; anti-metabolitos como metotrexato y 5-fluorouracil (5-FU); análogos del ácido fólico como denopterin, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; análogos de la purina como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiampirina, tioguanina; análogos de la pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostanol, testolactona; anti-adrenales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicin; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK.; razoxano; sizofuran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; uretan; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL) y docetaxel (TAXOTERE), clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino como cisplatina y carboplatina; vinblastina; platino; etoposida (VP-16); ifosfamida; mitomicin C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposida; daunomicin; aminopterin; xeloda; ibandronato; CPT11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los antes mencionados farmacéuticamente aceptables. Los agentes quimioterapéuticos también incluyen agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en los tumores como anti-estrógenos con la inclusión de, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazolas que inhiben la aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelin; y derivados, ácidos o sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los antes mencionados.

En determinadas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de la topoisomerasa. Los inhibidores de la topoisomerasa son agentes de quimioterapia que interfieren con la acción de una enzima de topoisomerasa (por ejemplo, topoisomerasa I o II). Los inhibidores de la topoisomerasa incluyen de modo no taxativo, clorohidrato de doxorubicina, citrato de daunorubicina, clorohidrato de mitoxantrona, actinomicina D, etoposida, clorohidrato de topotecano, teniposida (VM-26) e irinotecano. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico es irinotecano. En determinadas realizaciones, el tumor a tratarse es un tumor colorrectal y el segundo agente terapéutico es un inhibidor de la topoisomerasa, como irinotecano. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende SEQ ID NO:53 y el segundo agente terapéutico es irinotecano. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende SEQ ID NO:75 y el segundo agente terapéutico es irinotecano.

En determinadas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un anti-metabolito. Un anti-metabolito es un químico con una estructura que es similar a un metabolito necesario para las reacciones bioquímicas normales, sin embargo es lo suficientemente diferente como para interferir con una o más funciones normales de las células, como la división celular. Los anti-metabolitos incluyen, de modo no taxativo, gemcitabina, fluorouracilo, capecitabina, sodio de metotrexato, raltitrexed, pemetrexed, tegafur, citosina arabinosida, tioguanina, 5-azacitidina, 6-mercaptapurina, azatioprina, 6-tioguanina, pentostatina, fosfato de fludarabina y cladribina, así como también sales, ácidos o derivados de cualquiera de estos, aceptables en términos farmacéuticos. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico es gemcitabina. En determinadas realizaciones, el tumor a tratarse es un tumor pancreático y el segundo agente terapéutico es un anti-metabolito (por ejemplo, gemcitabina). En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende SEQ ID NO:53 y el segundo agente terapéutico es gemcitabina. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende SEQ ID NO:75 y el segundo agente terapéutico es gemcitabina.

En determinadas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un agente antimetabólico, incluye, de modo no taxativo, agentes que unen tubulina. A modo de ejemplo ilustrativo, el agente comprende un taxano. En determinadas realizaciones, el agente comprende paclitaxel o docetaxel o una sal, ácido o derivado de paclitaxel o docetaxel aceptables en términos farmacéuticos. En determinadas realizaciones, el agente es paclitaxel (TAXOL), docetaxel (TAXOTERE), paclitaxel unido a albúmina (ABRAXANE), DHA-paclitaxel o PG-paclitaxel. En determinadas realizaciones alternativas, el agente antimetabólico comprende un alcaloide de vinca, como vincristina, vinblastina, vinorelbina o vindesina o derivados, ácidos o sales farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, el agente antimetabólico es un inhibidor de la quinesina Eg5 o un inhibidor de una quinasa mitótica como Aurora A o Plk1. En determinadas realizaciones en donde el agente quimioterapéutico administrado en combinación con el agente o policonector peptídico a Wnt comprende un agente antimetabólico, el cáncer o tumor que se trata es cáncer de mama o un tumor de mama. En determinadas realizaciones, el tumor a tratar es un tumor de mama y el segundo agente terapéutico es paclitaxel. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende SEQ ID NO:53 y el segundo agente terapéutico es paclitaxel. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende SEQ ID

NO:75 y el segundo agente terapéutico es paclitaxel.

En determinadas realizaciones, el tratamiento implica la administración combinada de un agente de unión a Wnt de la presente invención y terapia de radiación. El tratamiento con el agente de unión a Wnt puede ocurrir en forma
5 previa, al mismo tiempo o en forma posterior a la administración de la terapia de radiación. Puede utilizarse cualquier cronograma para dicha terapia de radiación, tal como lo determine el experto.

En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico comprende un anticuerpo. Por lo tanto, el tratamiento puede implicar la administración combinada de agentes de unión a Wnt de la presente invención con anticuerpos
10 contra antígenos asociados a tumores, incluyendo de modo no taxativo, anticuerpos que se unen a EGFR, ErbB2, HER2, DLL4, Notch y/o VEGF. Se describen anticuerpos anti-DLL4 ilustrativos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N° 7,750,124, que se incorpora en el presente documento a modo de referencia en su totalidad. Se describen anticuerpos anti-DLL4 adicionales en, por ejemplo la Publicación de la Patente Internacional N° WO
15 2008/091222 y WO 2008/0793326 y la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° US 2008/0014196, US 2008/0175847, US 2008/0181899 y US 2008/0107648, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento a modo de referencia en su totalidad. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que es un inhibidor de angiogénesis (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF). En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende SEQ ID NO:53 y el segundo agente terapéutico es un anticuerpo anti-VEGF. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende SEQ ID NO:75 y el segundo
20 agente terapéutico es un anticuerpo anti-VEGF. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de la señalización Notch. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo anti-Notch. Se describen anticuerpo anti-Notch ilustrativo, por ejemplo, en la Publicación de la Patente de los Estados Unidos N° US 2008/0131434, que se incorpora a el presente documento a modo de referencia en su totalidad. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico es bevacizumab (AVASTIN), trastuzumab (HERCEPTIN), panitumumab (VECTIBIX) o cetuximab (ERBITUX). La administración combinada puede incluir la
25 coadministración, en una formulación farmacéutica única o formulaciones por separado o la administración consecutiva en cualquier orden pero generalmente dentro de un período de tiempo que permita que todos los agentes activos puedan emplear sus actividades biológicas en forma simultánea.

30 Además, el tratamiento puede incluir la administración de una o más citocinas (por ejemplo, limfocinas, interleucinas, factores de necrosis tumoral, y/o factores de crecimiento) o puede estar acompañado por la extracción quirúrgica de las células tumorales o cancerosas u toda otra terapia que el médico que trata el caso considere necesaria.

Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un agente de la presente invención depende del tipo de
35 enfermedad a tratar, la gravedad y curso de la enfermedad, la receptividad de la enfermedad, ya sea que el agente se administre a fines terapéuticos o preventivos, terapia previa, historia clínica del paciente y demás en todo a criterio del médico que trata el caso. El agente puede administrarse una vez o a lo largo de una serie de tratamientos que duren de varios días a varios meses o hasta que se efectúe una cura o se obtenga una disminución del estado de la enfermedad (por ejemplo, una reducción en el tamaño del tumor). Pueden calcularse cronogramas de dosis
40 óptimos de las mediciones de la acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente y variará de acuerdo a la potencia relativa de un agente individual. El médico a cargo de la administración puede determinar fácilmente las dosis óptimas, las metodologías de dosis y la velocidad de las repeticiones. En ciertas realizaciones, la dosis es desde 0.01µg a 100mg por kg de peso corporal y puede administrarse una vez o más en forma diaria, semanal, mensual o anual. En determinadas realizaciones, la dosis del receptor soluble u otro agente de unión a Wnt va desde alrededor de 0.1mg a alrededor de 20 mg por kg de peso corporal. En determinadas realizaciones, el agente
45 de unión a Wnt se administra una vez por semana. En determinadas realizaciones, el agente de unión a Wnt se administra una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. El médico a cargo del tratamiento puede estimar las velocidades de repetición para la dosis basándose en tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en fluidos o tejidos corporales.

50 La presente invención además proporciona métodos para analizar agentes para determinar su eficacia en la inhibición de la señalización de Wnt, su actividad anti-tumoral, y/o su actividad contra células madre cancerosas. En determinadas realizaciones, el método comprende la comparación del nivel de uno o más marcadores de diferenciación y/o uno o más marcadores de diferenciación a nivel celular en un primer tumor sólido (por ejemplo, un
55 tumor sólido que comprende células madre cancerosas) que se ha expuesto al agente al nivel del o los marcadores de diferenciación en un segundo tumor sólido que no se ha expuesto al agente. En algunas realizaciones, el método comprende: (a) exposición de un primer tumor sólido, pero no un segundo tumor sólido, al agente; (b) evaluación del nivel de uno o más marcadores de diferenciación y/o uno o más marcadores de diferenciación a nivel celular en el primer y segundo tumores sólidos; y (c) comparación del nivel de uno o más marcadores de diferenciación en el
60 primer tumor y el nivel de uno o más marcadores de diferenciación en el segundo tumor sólido. En determinadas realizaciones, el (a) aumento de niveles de uno o más marcadores de diferenciación en el primer tumor sólido relativo a los niveles de uno o más marcadores de diferenciación en el segundo tumor sólido indica actividad anti-tumoral (o células madre anticancerosas); y (b) la reducción de los niveles de uno o más marcadores de diferenciación a nivel celular indica actividad anti-tumoral (o células madre anticancerosas). En determinadas
65 realizaciones, el agente une dos o más proteínas Wnt. En determinadas realizaciones, el agente es un receptor FZD soluble. En determinados métodos, el agente es un anticuerpo, como un anticuerpo anti-Wnt.

Los métodos adicionales para analizar agentes incluyen, de modo no taxativo, métodos que comprenden la comparación de los niveles de uno o más marcadores de diferenciación en un primer tumor sólido que se ha expuesto a un agente a los niveles de uno o más marcadores de diferenciación en un segundo tumor sólido que no se ha expuesto al agente. En determinadas realizaciones, los métodos incluyen (a) la exposición de un primer tumor sólido, pero no un segundo tumor sólido, al agente; (b) la evaluación de los niveles de los marcadores de diferenciación en el primer y segundo tumores sólidos; y (c) la comparación de los niveles de uno o más marcadores de diferenciación en el primer tumor con los niveles del uno o más marcadores de diferenciación en el segundo tumor sólido. En determinadas realizaciones, el agente es un agente de unión a Wnt. En determinadas realizaciones, el agente es un inhibidor de la vía de señalización de Wnt canónica. En determinadas realizaciones, el agente inhibe la unión de una o más proteínas Wnt humanas a uno o más receptores FZD humanos. En determinadas realizaciones, el aumento de los niveles de uno o más marcadores de diferenciación en el primer tumor sólido relativo a los niveles de uno o más marcadores de diferenciación en el segundo tumor sólido indica la eficacia contra las células madre del tumor sólido (CSC). En determinadas realizaciones alternativas, la reducción de los niveles de uno o más marcadores de diferenciación (es decir, marcadores negativos para la diferenciación) en el primer tumor sólido relativo a los niveles de uno o más marcadores de diferenciación en el segundo tumor sólido indica la eficacia contra las células madre del tumor sólido.

En determinadas realizaciones, el tumor sólido en el método de análisis es un tumor pancreático. En determinadas realizaciones, el tumor sólido es un tumor pancreático y uno o más marcadores de diferenciación pueden comprender una o más mucinas (por ejemplo, Muc16), una o más citoqueratinas (por ejemplo, CK20) y/o cromogranina A (CHGA).

En determinadas realizaciones alternativas, el tumor sólido en el método de análisis es un tumor de colon. En algunas realizaciones, el tumor sólido es un tumor de clon y uno o más marcadores de diferenciación pueden comprender una o más citoqueratinas (por ejemplo, citoqueratina 7 o CK20).

En determinadas realizaciones, uno o más marcadores de diferenciación a nivel celular utilizados en los métodos de análisis que se describen en el presente documento comprenden ALDH1A1, APC, AXIN2, BMI1, CD44, FGF1, GJB1, GJB2, HES1, JAG1, LGR5, LHX8, MYC, NANOG, NEUROD1, NEUROG2, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, PROCR, RARRES1, RARRES3, RBP2, SOX1, SOX2, ASCL2, TDGF1, OLFM4, MSI1, DASH1, EPHB3 y/o EPHB4. En determinadas realizaciones, dos o más marcadores de diferenciación a nivel celular, tres o más marcadores de diferenciación a nivel celular, cuatro o más marcadores de diferenciación a nivel celular, cinco o más marcadores de diferenciación a nivel celular, seis o más o diez o más marcadores de diferenciación a nivel celular, se seleccionan del grupo que consiste en ALDH1A1, APC, AXIN2, BMI1, CD44, FGF1, GJB1, GJB2, HES1, JAG1, LGR5, LHX8, MYC, NANOG, NEUROD1, NEUROG2, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, PROCR, RARRES1, RARRES3, RBP2, SOX1, SOX2, ASCL2, TDGF1, OLFM4, MSI1, DASH1, EPHB3 y EPHB4.

En determinadas realizaciones, uno o más marcadores de diferenciación utilizados en los métodos de análisis comprenden ALDOB, BMP2, BMP7, BMPR1B, CEACAM5, CEACAM6, CDX1, CDX2, CLCA2, COL1A2, COL6A1, CHGA, CSTA, CST4, CK20, DAB2, FABP4, GST1, KRT4, KRT7, KRT15, KRT17, KRT20, LAMA1, MUC3A, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, NDRG2, PIP, PLUNC, SPRR1A, REG4, VSIG1 y/o XAF1. En determinadas realizaciones, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más o diez o más marcadores de diferenciación utilizados en los métodos de análisis se seleccionan del grupo que consta de ALDOB, BMP2, BMP7, BMPR1B, CEACAM5, CEACAM6, CDX1, CDX2, CLCA2, COL1A2, COL6A1, CHGA, CSTA, CST4, CK20, DAB2, FABP4, GST1, KRT4, KRT7, KRT15, KRT17, KRT20, LAMA1, MUC3A, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, NDRG2, PIP, PLUNC, SPRR1A, REG4, VSIG1 y XAF1.

Otros marcadores de diferenciación potenciales para los tumores de páncreas y colon así como también otros tipos de tumores son conocidos para aquellos expertos en la técnica. Además, un experto en la técnica puede evaluar fácilmente la utilidad de los marcadores de diferenciación potenciales en un método de análisis mediante el tratamiento del tipo de tumor deseado con uno o más receptores FZD solubles que se describen en el presente documento tales como FZD8-Fc y luego la evaluación de los cambios en la expresión del marcador por el tumor tratado relativos al control. Pueden encontrarse, ejemplos no taxativos de dichos método, por ejemplo, en los Ejemplos específicos a continuación.

La presente invención además proporciona métodos para producir agentes de unión a Wnt solubles. En determinadas realizaciones, el método comprende la producción de un agente de unión a Wnt soluble que abarca un dominio Fri del FZD8 humano en una célula, en donde al menos 80 % del agente de unión a Wnt posee una secuencia del extremo N de ASA, el método comprende la utilización de una secuencia de señal seleccionada de un grupo que consta de: SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73 y SEQ ID NO:74 para la producción del agente de unión a Wnt. En algunas realizaciones del método, la secuencia de señal es SEQ ID NO:71. En algunas realizaciones, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 % o al menos alrededor de 98 % del agente de unión a Wnt posee una secuencia del extremo N de ASA. En algunas realizaciones, la célula es una célula de mamífero. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende una región Fc humana. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de: SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48 y SEQ ID NO:1. En algunas

realizaciones, el agente de unión a Wnt comprenden SEQ ID NO:53. En algunas realizaciones, el agente de unión a Wnt comprende SEQ ID NO:50. En algunas realizaciones, la célula abarca un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que posee una secuencia de SEQ ID NO:75.

5 EJEMPLOS

Se entiende que los ejemplos y realizaciones que se describen en el presente documento se incluyen solo a fines ilustrativos.

10 EJEMPLO 1

Producción de FZD8-Fc

15 El ADNc que codifica FZD8-Fc (54F03) se subclonó en un vector de expresión pEE14.4 (Lonza) digerido con HindIII y EcoRI. Luego de la clonación, se linealizó el ADN de pEE14.4-FZD8-Fc mediante la digestión con PvuI y luego se introdujo en células GS-CHOK1 por medio de electroporación mediante la utilización de procedimientos estándar. Se obtuvieron clones estables que expresan FZD8-Fc y se expandieron en medio libre de suero. Se purificó FZD8-Fc mediante la captura de afinidad con una resina conjugada con proteína A. El análisis SDS-PAGE reveló una pureza de más del 98 % y el nivel de endotoxinas fue menor a 1 EU/mg proteína.

20 La secuencia de aminoácidos de FZD8-Fc es SEQ ID NO:1 y la secuencia de polinucleótidos que codifica FZD8-Fc es SEQ ID NO:2.

25 EJEMPLO 2

Farmacocinética de FZD8-Fc en las ratas

30 La farmacocinética de FZD8-Fc (54F03) se evaluó en las ratas en un estudio de farmacocinética (PK) de dos semanas con dosis de 2mg/kg y 10mg/kg. Se aplicó a ratas Sprague Dawley, cinco machos en cada grupo, una dosis de FZD8-Fc por medio de la vena de la cola a 2mg/kg o 10mg/kg y se continuó durante dos semanas con muestras recogidas en los puntos de tiempo 1, 24, 48, 72, 96, 168, 240 y 336 horas. En cada punto de tiempo, se recogió 1ml de sangre en tubos de EDTA de potasio y se centrifugó. Los sobrenadantes de plasma se recogieron y congelaron hasta que se analizaron las muestras.

35 Se cuantificó el nivel de proteína de fusión FZD8-Fc presente en el plasma en cada punto de tiempo y se calculó la semivida de FZD8-Fc para las dos dosis. Tal como se muestra en la Figura 1, la semivida de FZD8-Fc se estimó en 163 horas a 2mg/kg y 157 horas a 10mg/kg.

40 EJEMPLO 3

Actividad anti-tumoral de FZD8-Fc en un modelo de tumor pancreático

45 *Inhibición del crecimiento tumoral mediante FZD8-Fc en un modelo de tumor pancreático.* Se evaluó la actividad anti-tumoral de FZD8-Fc (54F03) en el modelo de xenoinjerto de tumor pancreático PN4. Se inyectaron células OMP-PN4 disociadas (50,000 por animal) en forma subcutánea en ratones NOD/SCID macho de 6-8 semanas de edad. Se monitoreó el crecimiento tumoral en forma semanal y se iniciaron las mediciones del tumor una vez que los tumores fueron palpables. En el día 50, se distribuyeron en forma aleatoria los ratones con volúmenes promedio de tumor de 137mm³ en 4 grupos de 10 animales cada uno. Se inyectó a los animales con anticuerpo de control, FZD8-Fc (15 mg/kg), gemcitabina (2 mg/kg) o una combinación de FZD8-Fc y gemcitabina. La administración del FZD8-Fc y la gemcitabina se llevó a cabo mediante una inyección en la cavidad intra-peritoneal, una vez por semana (gemcitabina) o dos veces por semana (FZD8-Fc). Se midieron los tumores dos veces por semana y se determinó el volumen del tumor mediante la fórmula $\frac{1}{2}(a \times b^2)$; en donde a = longitud y b = amplitud. Los datos se expresan como promedio y el promedio \pm S.E.M. Los promedios de grupo se compararon mediante la prueba sin aparear, de dos colas de Student, prueba t sin aparear. Los valores de probabilidad (p) de < 0.05 se interpretaron como significativamente diferentes.

60 El tratamiento con FZD8-Fc resultó en una reducción del 66 % en el crecimiento del tumor, tal como se muestra en la Figura 2 (p < 0.001). Además, el tratamiento con FZD8-Fc y gemcitabina resultó en una reducción del 29 % del crecimiento tumoral en relación al tratamiento con FZD8-Fc solo (p = 0.04 frente a FZD8-Fc solo) (Figura 2). Por lo tanto, FZD8-Fc demostró actividad de crecimiento anti-tumoral en el modelo de tumor pancreático PN4 como un agente único así como también en combinación con gemcitabina.

65 *Reducción de la población CD44hi en tumores PN4 tratados con FZD8-Fc.* Al final del estudio (día 85) se extrajeron tumores de control y en tratamiento de estudio de xenoinjerto OMP-PN4 que se describió con anterioridad. Los tumores se procesaron y disociaron en células únicas. Se agruparon las suspensiones de células únicas que derivaron de 5 tumores de cada grupo de tratamiento y las muestras agrupadas luego se incubaron en hielo durante

30 minutos con anticuerpos que unen células de ratones en forma selectiva (α -ratón CD45-biotin 1:200 dilución y rata α -ratón H2Kd-biotin 1:100 dilución, BioLegend, San Diego, CA), seguido de la adición de gotas magnéticas marcadas con estreptavidina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se extrajeron las células de ratones con la ayuda de un imán. Para el análisis de los marcadores de superficie celular humana, la suspensión de célula del tumor única se

5 tiñeron con anticuerpos anti-ESA (Biomedica, Hayward, CA) y anti-CD44 (BD Biosciences, San Jose, CA) que se conjugaron directamente a fluorocromos. Se excluyeron las células muertas mediante la utilización del colorante de viabilidad DAPI. Se llevó a cabo la citometría de flujo mediante la utilización de un instrumento Aria FACS (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Se utilizaron los perfiles de dispersión lateral y dispersión hacia adelante para eliminar las aglomeraciones de células.

10 El análisis de los tumores tratados con anticuerpo de control reveló que el 12.7 % de la población de la mayoría del tumor expresó tanto ESA como CD44 a niveles altos. La población positiva doble no se vio afectada en forma significativa por el tratamiento con gemcitabina sola (13.9 %) tal como se muestra en la Figura 3, pero el tratamiento con FZD8-Fc o la combinación de FZD8-Fc con gemcitabina redujo la población positiva doble (1.9 % y 1.7 % respectivamente).

15 *Análisis de tumores PN4 tratados con FZD8-Fc mediante ensayo de dilución limitante.* Los ensayos de dilución limitantes (LDA) pueden utilizarse para evaluar el efecto de los agentes terapéuticos en las células madre cancerosas de tumores sólidos y en la tumorigenicidad de un tumor que comprende células madre cancerosas. Dichos ensayos pueden utilizarse para determinar la frecuencia de las células madre cancerosas en tumores de animales tratados con la proteína de fusión FZD8-Fc u otro agente y para comparar la frecuencia con la frecuencias de las células madre cancerosas en tumores de animales de control.

20 Los tumores de control y en tratamiento del estudio de xenoinjerto PN4 que se describen con anterioridad se extrajeron al final del estudio (día 85). Los tumores se procesaron y disociaron en células únicas. Se agruparon las suspensiones de células únicas que derivaron de 5 tumores de cada grupo de tratamiento y las muestras agrupadas luego se incubaron en hielo durante 30 minutos con anticuerpos que unen células de ratones en forma selectiva (α -ratón CD45-biotin 1:200 dilución y rata α -ratón H2Kd-biotin 1:100 dilución, BioLegend, San Diego, CA), seguido de la adición de gotas magnéticas marcadas con estreptavidina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se extrajeron las células de ratones con la ayuda de un imán. Las células humanas en la suspensión se extrajeron, contaron y tiñeron para los marcadores de superficie celular y se mezclaron dosis de células apropiadas (30, 90 y 270 células) en amortiguador FACS en una mezcla 1:1 con Matrigel y se inyectaron en forma subcutánea en ratones NOD/SCID (10 ratones por dosis de célula por grupo de tratamiento). Se dejó crecer a los tumores durante 4 meses.

25 En el punto de tiempo deseado, el porcentaje de ratones con tumores detectables se determinó en todos los grupos inyectados con células tumorales tratadas con FZD8-Fc y se comparó al porcentaje de ratones con tumores detectables en los controles. Por ejemplo, la cantidad de ratones inyectados con 125 células tumorales tratadas con anticuerpos de control que poseen tumores detectables se determina y compara a la cantidad de ratones inyectados con 125 células tumorales tratadas con FZD8-Fc que poseen tumores detectables.

30 En el día 75 luego de la inyección de las células, los índices de aceptación del tumor en los varios grupos fueron las siguientes: control - 7 ratones de 30; FZD8-Fc - 3 ratones de 30; gemcitabina - 7 ratones de 30; FZD8-Fc y gemcitabina - 0 ratones de 30 (Figura 4). La tasa de aceptación del tumor reducida en el FZD8-Fc y en los grupos tratados de combinación indicó que la frecuencia de las células madre cancerosas se redujo en los tumores pancreáticos PN4 mediante FZD8-Fc. La evidencia de la evaluación de ambos, la expresión de CD44 y el análisis de dilución de dosis limitante reveló que el tratamiento FZD8-Fc reduce la frecuencia de células madre cancerosas en los tumores pancreáticos PN4.

35 La frecuencia de células madre cancerosas (CSC) puede calcularse mediante la utilización del software L-Calc™ (StemCell Technologies Inc.; www.stemcell.com). En resumen, basándose en las estadísticas Poisson, existe exactamente una célula madre cancerosa entre la cantidad conocida de células inyectadas si el 37 % de los animales no desarrolla tumores. La frecuencia de CSC para el grupo tratado con anticuerpo de control fue 1:280, la frecuencia de CSC para el grupo tratado con gemcitabina fue 1:476, la frecuencia de CSC para el grupo tratado con FZD8-Fc fue 1:881 y se calculó que la frecuencia de CSC para el grupo tratado con una combinación de FZD8-Fc y gemcitabina fue menor a 1:3763. Este número no pudo determinarse en forma precisa ya que el índice de aceptación del tumor en este grupo fue cero, incluso con la dosis de células más alta.

EJEMPLO 4

40 Aumento de la diferenciación de células de tumores pancreáticos mediante FZD8-Fc

45 *Aumento de la diferenciación de células de tumores PN4 y PN8 con tratamiento FZD8-Fc.* Los tumores de control y en tratamiento del estudio de xenoinjerto OMP-PN4 que se describió con anterioridad (Ejemplo 3) se extrajeron al final del estudio (día 85). Los tumores se fijaron en formalina, se incrustaron en parafina y se cortaron secciones de tumor de 4 μ m de grosor. Luego de las desparafinación e hidratación, se trataron las secciones con ácido acético acuoso durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego las secciones se trataron con 1 % de azul de alcian en 3

% de ácido acético acuoso durante 30 minutos y se lavaron con agua. Las secciones se contra tiñeron en rojo rápido neutral, se deshidrataron y montaron. Mediante la utilización de este método, las sialomucinas en las muestras de tejido se tiñen de azul y el entorno aparece como rosa o rojo.

- 5 El tratamiento de los tumores PN4 con FZD8-Fc provocó un aumento en las células que expresan sialomucinas en comparación con tumores tratados con anticuerpo de control o gemcitabina (Fig. 5, en donde las sialomucinas aparecen como un gris oscuro). El tratamiento de combinación de FZD8-Fc y gemcitabina también aumentó la expresión de sialomucinas en tumores pancreáticos PN4. Por lo tanto, el tratamiento FZD8-Fc de los tumores PN4 aumentó la frecuencia de las células diferenciadas que expresan mucinas. Se observaron resultados similares en el modelo de xenoinjerto de tumor pancreático PN8 (Fig. 6).

Aumento de diferenciación de células de tumores PN13 con tratamiento FZD8-Fc. También se evaluó la capacidad de diferenciación de células de FZD8-Fc en el modelo de xenoinjerto de tumor pancreático OMP-PN13. Se inyectaron células disociadas OMP-PN13 (50,000 por animal) en forma subcutánea en ratones NOD/SCID macho de 6-8 semanas de edad. Se monitoreó el crecimiento tumoral en forma semanal y se iniciaron mediciones del tumor una vez que los tumores fueron palpables. En el día 40 los ratones con un volumen de tumor promedio de 114 mm³ se colocaron en forma aleatoria en 4 grupos de 10 animales cada uno. Se inyectó a los animales con anticuerpo de control o FZD8-Fc (15mg/kg). La administración del anticuerpo FZD8-Fc y del anticuerpo de control se llevó a cabo mediante una inyección en la cavidad intraperitoneal, dos veces por semana. Luego de 19 días de tratamiento, se eliminaron los tumores y se llevó a cabo el análisis de inmunohistoquímica mediante técnicas estándar. En resumen, los tumores se fijaron en formalina, se incrustaron en parafina y se cortaron secciones de tumor de 4µm de grosor. Luego de la desparafinación e hidratación, se sometió a las secciones de tumor a un proceso de recuperación de antígenos en amortiguador Tris (pH 9,5). Las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) durante 10 minutos para bloquear peroxidases endógenas. Se agregó anticuerpo anti-Ki67 (Dako, clone MIB-1) a una dilución de 1:200 en amortiguador bloqueador (NHS al 3 %, BSA al 1 %, Tween-20 al 0.1 %, en PBS) a cada sección y se incubó durante 1 hora. Se lavaron los portaobjetos 3 veces en PBST durante 5 minutos cada uno. Se agregó anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP (ImmPRESS™ anti-ratón, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) a los portaobjetos y se incubaron durante 30 minutos. Luego de múltiples lavados con PBST, se agregó sustrato Vector Nova Red (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) para la localización del antígeno Ki67. Las secciones se trataron con ácido acético acuoso durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se trataron las secciones con 1 % de azul de alcian en 3 % de ácido acético acuoso durante 30 minutos y se lavaron con agua. Las secciones se contra tiñeron en rojo rápido neutral, se deshidrataron y montaron. Mediante la utilización de este método, las sialomucinas en las muestras de tejido se tiñen de azul y las células proliferativas se marcan de rojo oscuro.

El tratamiento de los tumores PN13 con FZD8-Fc resultó en un aumento en las células que expresan sialomucinas en comparación con los tumores tratados con anticuerpo de control. El tratamiento de tumores PN13 con FZD8-Fc también resultó en una reducción de las células proliferativas tal como lo denota la expresión de Ki67. La Figura 7 muestra una clara reducción en la cantidad de células proliferativas (identificadas por puntos negros) en el tejido de los tumores tratados con FZD8-Fc. Por lo tanto, el tratamiento de los tumores PN13 con FZD8-Fc disminuyó la proliferación de células y aumentó la frecuencia de las células diferenciadas que expresan mucinas.

Aumento de tinción de Muc16 en tumores Pn13 con FZD8-Fc. Se obtuvieron secciones de tumores de los tumores PN13 tratados con anticuerpo de control o FZD8-Fc y se trataron tal como se describe con anterioridad. En este ejemplo, se agregó el anticuerpo anti-Muc16 (Abcam, Cambridge, MA) en amortiguador bloqueador a una dilución de 1:200 (NHS al 3 %, BSA al 1 %, Tween-20 al 0.1 %, en PBS) a cada sección y se incubó durante 1 hora. Se detectó al anticuerpo unido mediante la utilización del protocolo de inmunohistoquímica que se describió con anterioridad.

El tratamiento de los tumores PN13 con FZD8-Fc resultó en un aumento de las células que expresan Muc16 en comparación con los tumores tratados con anticuerpo de control (Figura 8, tinción oscura).

Aumento de tinción de CK20 en tumores Pn13 con FZD8-Fc. Se obtuvieron secciones de tumores y se trataron tal como se describió con anterioridad. En este ejemplo, se agregó anticuerpo anti-CK20 (clon Ks20.8, Dako, Carpintería, CA) en amortiguador bloqueador a una dilución de 1:200 (NHS al 3 %, BSA al 1 %, Tween-20 al 0.1 %, en PBS) a cada sección y se incubó durante 1 hora. Se detectó el anticuerpo unido mediante la utilización del protocolo de inmunohistoquímica que se describió con anterioridad.

El tratamiento de los tumores PN13 con FZD8-Fc resultó en un aumento de las células que expresan CK20 en comparación con los tumores tratados con anticuerpo de control (Figura 9, tinción oscura).

EJEMPLO 5

Inhibición del crecimiento del tumor de mama *in vivo* mediante FZD8-Fc

Se inyectaron células disociadas de tumor de mama PE13 (50,000 por animal) en forma subcutánea en la

almohadilla adiposa mamaria de los ratones NOD/SCID. Se monitoreó a los ratones en forma semanal y se dejó crecer a los tumores hasta que tuvieron aproximadamente 106mm³. En el día 27 luego de la inyección de células, se colocó a los ratones en forma aleatoria en cuatro grupos de tratamiento (n = 10 ratones/grupo) y se trataron con anticuerpo de control, FZD8-Fc (54F03), taxol o una combinación de FZD8-Fc y taxol. Se administró taxol en forma intraperitoneal a una dosis de 7.5mg/kg una vez por semana y se administró FZD8-Fc en forma intraperitoneal a una dosis de 5mg/kg dos veces por semana. Se midieron los tumores en los días indicados en la Figura 10.

Se observó que el tratamiento con FZD8-Fc redujo el crecimiento tumoral en un 20 % (p = 0.002) como un agente único en relación a grupo de anticuerpos de control. Además, el tratamiento con la combinación de FZD8-Fc y taxol redujo el crecimiento tumoral en un 55 % (p = 0.003) en comparación con el tratamiento con taxol solo (Figura 10).

EJEMPLO 6

Inhibición del crecimiento del tumor de colon *in vivo* mediante FZD8-Fc

Se analizó el efecto de dosis múltiples y el régimen de dosis de FZD8-Fc (54F03) en el crecimiento de los xenoinjertos del tumor de colon C28. Se inyectaron células disociadas C28 (10,000 por animal) en forma subcutánea en ratones NOD/SCID macho de 6-8 semanas de edad. En el día 2, se colocó a los ratones en forma aleatoria en 6 grupos de 10 animales cada uno. Los animales se inyectaron con anticuerpo de control o FZD8-Fc a dosis de 1.5mg/kg (dos veces por semana), 5mg/kg (una y dos veces por semana) y 15mg/kg (una y dos veces por semana). Se realizó la administración del anticuerpo y FZD8-Fc mediante inyección en la cavidad intraperitoneal. Se monitoreó el crecimiento tumoral en forma semanal y las mediciones del tumor se iniciaron una vez que los tumores fueron palpables. Los tumores se midieron dos veces por semana y se determinó el volumen tumoral tal como se describe en el presente documento.

El tratamiento con 15mg/kg de FZD8-Fc (dos veces por semana) resultó en el 83 % de reducción del crecimiento tumoral durante el tratamiento con el anticuerpo de control, tal como se muestra en la Figura 11A (p < 0.001). Además, el tratamiento con FZD8-Fc a la menor dosis evaluada (1.5mg/kg administrada dos veces a la semana) también resultó en un 52 % de reducción del crecimiento en el grupo de tratamiento con anticuerpo de control (Figura 11A). Por lo tanto, FZD8-Fc demostró actividad de crecimiento anti-tumoral en el modelo de tumor de colon OMP-C28 como un agente único en una forma dependiente de la dosis.

Se analizó el efecto de FZD8-Fc en combinación con un agente quimioterapéutico en el crecimiento de los xenoinjertos del tumor de colon C28. Se inyectaron células disociadas del tumor de colon C28 (10.000 células) en forma subcutánea en ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. Se dejó crecer a los tumores durante 21 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 128 mm³. Los ratones se distribuyeron en forma aleatoria (n = 10 por grupo) y se trataron con FZD8-Fc (54F03) (15 mg/kg una vez por semana), irinotecano (15 mg/kg una vez por semana), una combinación de FZD8-Fc y irinotecano o un anticuerpo de control. Se llevó a cabo la administración de FZD8-Fc, irinotecano y el anticuerpo de control mediante una inyección en la cavidad intraperitoneal. Se monitoreó el crecimiento tumoral y se midieron los volúmenes tumorales con un calibrador electrónico en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresaron como promedio ± S.E.M.

Tal como se muestra en la Figura 11B, el tratamiento con FZD8-Fc como un agente único (-▲-) resultó en un 66 % de reducción en el crecimiento tumoral durante el tratamiento con el anticuerpo de control (-■-) (p < 0,001). Además, el tratamiento con FZD8-Fc en combinación con irinotecano (-●-) resultó en un 76 % de reducción del crecimiento en el grupo de tratamiento de los anticuerpos de control (p < 0,001), que fue mayor que cada agente solo. Por lo tanto, FZD8-Fc demostró actividad de crecimiento anti-tumoral en el modelo de tumor de colon OMP-C28 como un agente único, así como también en combinación con un agente quimioterapéutico.

EJEMPLO 7

Aumento de diferenciación de células de tumores de colon mediante FZD8-Fc

Aumento de tinción de CK20 en tumores C28 con FZD8-Fc. Los tumores de control y en tratamiento del estudio de xenoinjerto C28 que se describieron con anterioridad (Ejemplo 6) se extrajeron al final del estudio. Los tumores se eliminaron y se llevó a cabo el análisis de inmunohistoquímica mediante técnicas estándar. En resumen, los tumores se fijaron en formalina, se incrustaron en parafina y se cortaron secciones de tumores de 4um de grosor. Luego de la desparafinación y la hidratación, se sometió a las secciones de tumor a un proceso de recuperación de antígenos en amortiguador Tris (pH 9,5). Las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) durante 10 minutos para bloquear peroxidasa endógenas. Se agregó anticuerpo anti-CK20 (clon Ks20,8, Dako, Carpinteria, CA) en amortiguador bloqueador a una dilución de 1:200 (NHS al 3 %, BSA al 1 %, Tween-20 al 0.1 %, en PBS) a cada sección y se incubó durante 1 hora. Los portaobjetos se lavaron 3 veces en PBST durante 5 minutos cada uno. Se agregó anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP (ImmPRESS™ anti-ratón Ig, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) a los portaobjetos y se incubó durante 30 minutos. Luego de múltiples lavados con PBST, se agregó sustrato Vector Nova Red (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) para la localización del antígeno CK20.

El tratamiento de tumores C28 con FZD8-Fc resultó en un aumento de las células que expresan CK20 en comparación con tumores tratados con el anticuerpo de control (Figura 12, tinción oscura).

EJEMPLO 8

5 Actividad anti-tumoral de FZD8-Fc en el modelo de tumor pancreático

10 *Inhibición del crecimiento tumoral mediante FZD8-Fc en el modelo de tumor pancreático PN21.* Se evaluó la actividad anti-tumoral de FZD8-Fc (54F03) en el modelo de xenoinjerto de tumor pancreático PN21. Las células disociadas OMP-PN21 (50,000 por animal) se inyectaron en forma subcutánea en ratones NOD/SCID macho de 6-8 semanas de edad. Se monitoreó el crecimiento tumoral en forma semanal y las mediciones del tumor se iniciaron una vez que los tumores fueron palpables. En el día 36, los ratones con volumen promedio de tumor de 144mm³ se distribuyeron en forma aleatoria en 4 grupos de 9 animales cada uno. Los animales se inyectaron con anticuerpo de control, FZD8-Fc (15mg/kg), gemcitabina (2mg/kg) o una combinación de FZD8-Fc y gemcitabina. La administración de FZD8-Fc y gemcitabina se llevó a cabo mediante inyección en la cavidad intraperitoneal, una vez por semana. Se midieron los tumores dos veces por semana y se determinó el volumen tumoral tal como se describe en el presente documento.

20 El tratamiento con FZD8-Fc resultó en un 66 % de reducción del crecimiento tumoral en comparación con el control, tal como se muestra en la Figura 13A ($p < 0,001$). Además, el tratamiento con una combinación de FZD8-Fc y gemcitabina resultó en una reducción mayor del crecimiento tumoral en comparación con cada agente solo ($p = 0.001$ frente a gemcitabina). Por lo tanto, FZD8-Fc demostró actividad de crecimiento anti-tumoral en el modelo de tumor pancreático PN21 como un agente único así como también en combinación con gemcitabina.

25 *Análisis de tumores PN21 tratados con FZD8-Fc mediante el ensayo de dilución limitante.* Tal como se describió con anterioridad en el Ejemplo 3, se utilizó un ensayo de dilución limitante a fin de evaluar el efecto del tratamiento con FZD8-Fc solo o en combinación con gemcitabina en células madre cancerosas de un tumor sólido en el modelo de tumor pancreático PN21.

30 Los tumores de control y en tratamiento del estudio de xenoinjerto que se describieron con anterioridad se extrajeron al final del estudio. Los tumores se procesaron y disociaron en células únicas. Se agruparon suspensiones de células únicas derivadas de 5 tumores de cada grupo de tratamiento y luego se incubaron en hielo las muestras agrupadas durante 30 minutos con anticuerpo que unen células de ratones en forma selectiva (α -ratón CD45-biotin 1:200 dilución y rata α -ratón H2Kd-biotin 1:100 dilución, BioLegend, San Diego, CA), seguido de la adición de gotas magnéticas marcadas con estreptavidina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se extrajeron las células de ratón con la ayuda de un imán. Se extrajeron las células humanas en la suspensión, se contaron y se tiñeron para los marcadores de superficie celular y las dosis de células apropiadas (30, 90 y 270 células) en amortiguador FACS se mezclaron en una mezcla 1:1 con Matrigel y se inyectaron en forma subcutánea en ratones NOD/SCID (10 ratones por dosis de célula por grupo de tratamiento). Se dejó crecer a los tumores durante 4 meses.

40 En el punto de tiempo deseado, se determinó el promedio de ratones con tumores detectables en todos los grupos inyectados con células tumorales tratadas y se comparó con el porcentaje de ratones con tumores detectables en células tratadas de control. Por ejemplo, se determina la cantidad de ratones inyectados con 125 células tumorales tratadas con anticuerpo de control que poseen tumores detectables y se comparó con la cantidad de ratones inyectados con 125 células tumorales FZD8-Fc tratadas que poseen tumores detectables.

50 En el día 72 luego de la inyección de las células, se determinaron los índices de aceptación del tumor en los varios grupos y se calculó la frecuencia de células madre cancerosas mediante la utilización de software L-CalcTM (StemCell Technologies Inc.; www.stemcell.com). Tal como se muestra en la Figura 13B, el tratamiento con FZD8-Fc redujo la frecuencia de células madre cancerosas a 1:976, aproximadamente a una reducción de 4 veces en comparación con el tratamiento con el anticuerpo de control. En contraste, el tratamiento con gemcitabina aumentó levemente la frecuencia de células madre cancerosas. En forma significativa, el tratamiento con una combinación de FZD8-Fc y gemcitabina redujo la frecuencia de células madre cancerosas a 1:5472, una reducción de casi 25 veces en comparación con el tratamiento de control. Sorprendentemente, el tratamiento con la combinación de FZD8-Fc y gemcitabina redujo la frecuencia de células madre cancerosas aproximadamente 5,5 veces más que el tratamiento FZD8-Fc solo y a pesar del hecho de que la gemcitabina en realidad parecía aumentar la frecuencia de células madre cancerosas.

EJEMPLO 9

60 *Aumento de la diferenciación de células de los tumores PN21 con FZD8-Fc.* Se evaluó también la capacidad de diferenciación celular de FZD8-Fc en el modelo de xenoinjerto del tumor pancreático OMP-PN21. Se extrajeron los tumores PN21 de los estudios que se describen en el Ejemplo 8 y se fijaron en formalina, se incrustaron en parafina y se cortaron secciones de tumor de 4 μ m de grosor. Luego de la desparafinación e hidratación, se sometió a las secciones del tumor a un proceso de recuperación de antígenos en amortiguador Tris (pH 9,5). Las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) durante 10 minutos para bloquear peroxidases

endógenas. Se agregó anticuerpo anti-Ki67 (clon MIB-1, Dako, Carpintería, CA) en amortiguador bloqueador (NHS al 3 %, BSA al 1 %, Tween-20 al 0,1 %, en PBS) a una dilución de 1:200 a cada sección y se incubó durante 1 hora. Se lavaron los portaobjetos 3 veces en PBST durante 5 minutos cada uno. Se agregó anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP (ImmPRESS™ anti-ratón, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) a los portaobjetos y se incubó durante 30 minutos. Luego de múltiples lavados con PBST, se agregó sustrato Vector Nova Red (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) para la localización del antígeno Ki67. Las secciones se trataron con ácido acético acuoso durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se trató las secciones con 1 % de azul de alcian en 3 % de ácido acético acuoso durante 30 minutos y se lavaron con agua. Las secciones se contra tiñeron en rojo rápido neutral, se deshidrataron y se montaron. Mediante la utilización de este método, las sialomucinas en las muestras de tejido se tiñen de azul y el entorno aparece como rosa o rojo.

El tratamiento de los tumores PN21 con FZD8-Fc resultó en un aumento de las células que expresan sialomucinas en comparación con los tumores tratados con anticuerpo de control (Figura 14, tinción gris oscuro). El tratamiento de los tumores PN21 con FZD8-Fc o FZD-Fc en combinación con gemcitabina resultó en un aumento de las células que expresan sialomucinas en comparación con los tumores tratados con el anticuerpo de control o gemcitabina sola (Figura 15). El tratamiento de los tumores PN21 con FZD8-Fc o la combinación de FZD8-Fc y gemcitabina también dio como resultado una disminución de las células proliferativas que se denota en la expresión de Ki67. Por lo tanto, el tratamiento de los tumores PN21 con FZD8-Fc, ya sea solo o en combinación con gemcitabina, redujo la proliferación de células e incrementó la frecuencia de células diferenciadas que expresan mucinas.

EJEMPLO 10

Producción de variantes de FZD8-Fc

Producción de variantes de FZD8-Fc. Se produjeron variantes de FZD8-Fc a ADN2.0 (Menlo Park, CA). El ADN2.0 sintetizó y ensambló oligonucleótidos de cadena simple corta para producir las diferentes proteínas de variantes de FZD8-Fc, 54F05, 54F08, 54F09, 54F12, 54F13, 54F14, 54F15, 54F16, 54F17, 54F18, 54F19, 54F20, 54F21 y 54F22. Los oligonucleótidos ensamblados luego se clonaron y se verificó su secuencia.

EJEMPLO 11

Inhibición de la señalización de Wnt mediante variantes de FZD8-Fc

La capacidad de las variantes de FZD8-Fc para bloquear o inhibir la activación de la vía de señalización Wnt se determinó *in vitro* mediante el ensayo indicador de luciferasa. Se cultivaron células STF293 en DMEM complementado con antibióticos y FCS al 10 %. Las células STF293 se transfectan en forma estable con un vector indicador que contiene siete copias del elemento de respuesta de transcripción de TCF unido a un promotor hacia arriba de un gen indicador de luciferasa de luciérnaga. Esta construcción mide la actividad de la vía de señalización de Wnt canónica. Las células se agregaron a placas de cultivo a 10,000 células por pocillo. Luego de la incubación durante la noche las variantes de FZD8-Fc o los ratones de control JAG1-Fc se agregaron en combinación con medio acondicionado con Wnt3a. Las variantes de FZD8-Fc y JAG1-Fc se utilizaron en concentraciones de 20, 4, 0.8, 0.16, 0.03, 0.006, 0.0012 y 0.0003 ug/ml. Las células se incubaron en medio acondicionado con Wnt3A al 25 % que se preparó a partir de células L que expresan en forma estable Wnt3a. Luego de la incubación durante la noche (aproximadamente 18 hrs), se midieron los niveles de luciferasa mediante un kit de ensayo de luciferasa Steady-Glo® (Promega, Madison, WI).

Se determinó la actividad bloqueadora de las variantes de FZD8-Fc y se presenta en la Tabla 3 como actividad relativa en comparación con la misma ejecución de referencia estándar que se utilizó en cada ensayo, el cual se estableció en 100 %.

Tabla 3

Variante de FZD8-Fc	% de Actividad Relativa
54F03	107, 143
54F05	167
54F08	137
54F09	156, 157
54F12	52
54F13	103
54F14	125
54F15	128
54F16	125

EJEMPLO 12

Farmacocinética de las variantes de FZD8-Fc en las ratas

5 Se evaluó la farmacocinética de diversas variantes de FZD8-Fc en las ratas en un estudio de farmacocinética (PK) de dos semanas. Las variantes de FZD8-Fc que se evaluaron fueron 54F03, 54F09, 54F12, 54F13, 54F15 y 54F16. Se dosificaron ratas Sprague Dawley, cinco machos en cada grupo, con variantes de FZD8-Fc por la vena de la cola a 10 mg/kg y se continuó durante dos semanas con muestras recogidas en los puntos de tiempo de 1, 24, 48, 72, 96, 168, 240 y 336 horas. En cada punto de tiempo, se recogió 1 ml de sangre en tubos EDTA de potasio y se centrifugaron. Se recogieron los sobrenadantes de plasma y se congelaron hasta el análisis de las muestras.

10 Se cuantificó el nivel de la proteína de variante de FZD8-Fc presente en el plasma en cada punto de tiempo y se calculó la semivida de cada variante de FZD8-Fc. La semivida de las variantes de FZD8-Fc se muestra en la Tabla 4.

15

Tabla 4

Variante de FZD8-Fc	t _{1/2} en horas	Región Fc
54F03	162	IgG1
54F09	136	IgG1
54F12	152	IgG2
54F13	268	IgG2
54F15	109	IgG1
54F16	154	IgG1

EJEMPLO 13

20 Farmacocinética de las variantes de FZD8-Fc en monos cinomolgos

Se dividieron en forma aleatoria en dos grupos de dos a cuatro monos cinomolgos macho previo jóvenes adultos/adultos sin tratamiento y se les administró un bolo intravenoso (IV) de la variante de FZD-Fc 54F15 o la variante 54F16 a una dosis de 30 mg/kg. Se observó a los animales dos veces por día (en la mañana y en la tarde) para controlar la mortalidad y signos de dolor y aflicción. Las observaciones junto a la jaula para controlar la salud general y la apariencia se realizaron una vez al día. En el día de la dosis, se observó a cada animal aproximadamente 1 y 4 horas después de la dosis para controlar la mortalidad y signos de dolor y aflicción. Se registró toda observación inusual a lo largo de la duración del estudio. Se tomaron los pesos corporales en el día de la administración de la dosis y al final de la recolección de sangre. Se recogió sangre (aproximadamente 0.5 ml) de una vena femoral con una jeringa y aguja y se transfirió a tubos con anticoagulante EDTA K3 en forma previa a la dosis y en las horas 1, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 240 y 336 luego de la dosis para análisis de PK. Además, se recogió sangre (aproximadamente 0.5 ml) de una vena femoral con una jeringa y aguja y se transfirió a tubos sin anticoagulante en forma previa a la dosis y en la hora 336 luego de la dosis para el análisis del anticuerpo anti-fármaco (ADA). Se recogieron los sobrenadantes de plasma y se congelaron hasta el análisis de las muestras. Se llevaron a cabo inmunoensayos HTRF (fluorescencia resuelta en tiempo homogéneo) para determinar la concentración de FZD-Fc en las muestras de plasma del animal para su análisis de PK y la concentración del anticuerpo anti-fármaco en suero. Se analizó la concentración de FZD-Fc en plasma frente al tiempo mediante análisis no compartimental (NCA) con Phoenix™ WinNonlin® Version 6.0, mediante un modelo de administración IV en bolo.

40 Se cuantificó el nivel de variantes de FZD8-Fc presente en el plasma en cada punto de tiempo (Figura 16) y se calculó la semivida de las variantes de FZD8-Fc, 54F15 y 54F16. Tal como se muestra en la Tabla 5, la semivida de la variante de FZD8-Fc, 54F15 se estimó en 102 horas a 30 mg/kg y la semivida de la variante de FZD-Fc8, 54F16 se estimó en 137 horas a 30 mg/kg.

45

Tabla 5

ID del Animal	T _{1/2} z (h)	AUC _{0-último} (ng*h/ml)	AUC _{0-∞} (ng*h/ml)	% AUC Extrap	Vz (ml)	Cl (ml/h)
FZD8-Fc 54F15						
C43064	102,3	28642771,4	31231858,7	8,3	141,7	0,960
C43061	102,5	31904918,2	34846234,1	8,4	127,3	0,861
Promedio	102,4	30273845	33039046	8,35	134,5	0,9105
FZD8-Fc 54F16						
C43066	139,0	29088083,0	35470395,6	18,0	169,6	0,846
C43076	134,1	35934159,0	43449944,6	17,3	133,6	0,690

Promedio	136,6	32511121	39460170	17,65	151,6	0,768
----------	-------	----------	----------	-------	-------	-------

EJEMPLO 14

Inhibición del crecimiento de tumor de colon *in vivo* mediante las variantes de FZD8-Fc

5 Se inyectaron células disociadas de tumor de colon C28 (10,000 células) en forma subcutánea en ratones NOD/SCID macho de 6-8 semanas de edad. Se dejó crecer a los tumores durante 28 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 145 mm³. Se distribuyó a los ratones en forma aleatoria (n = 9 por grupo) y se trataron con variantes de FZD8-Fc anticuerpo de control a una dosis de 15 mg/kg dos veces por semana. La administración de las variantes de FZD8-Fc y el anticuerpo de control se llevó a cabo mediante inyección en la cavidad intraperitoneal. Se monitoreó el crecimiento tumoral y se midieron los volúmenes del tumor con calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como promedio ± S.E.M.

15 Las variantes 54F12 y 54F13 no tuvieron un efecto aparente en el crecimiento tumoral, los volúmenes del tumor permanecieron sustancialmente igual que los tumores en ratones tratados con anticuerpo de control. En contraste, el tratamiento con las variantes 54F03, 54F09, 54F15 y 54F16 resultó en aproximadamente 56 %, 70 %, 64 % y 70 % de reducción (respectivamente) en el crecimiento tumoral en comparación con el tratamiento con el anticuerpo de control, tal como se muestra en la Figura 17. Por lo tanto, la actividad de crecimiento anti-tumoral de las variantes de FZD8-Fc se vio afectada por la secuencia de aminoácidos en la unión entre la porción FZD8 y la porción Fc. Además, la actividad de crecimiento anti-tumoral se vio afectada por la fuente de la región Fc, ya que las dos variantes que son proteínas de fusión IgG2 (54F12 y 54F13), no inhibieron el crecimiento tumoral en este modelo.

EJEMPLO 15

25 Inhibición del crecimiento del tumor pancreático *in vivo* mediante variantes de FZD8-Fc

30 Se inyectaron células disociadas de tumor pancreático PN4 (10,000 células) en forma subcutánea en ratones NOD/SCID macho adultos de 6-8 semanas. Se dejó crecer a los tumores durante 36 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 112 mm³. Se distribuyó a los ratones en forma aleatoria (n = 10 por grupo) y se trataron con variantes de FZD8-Fc o un anticuerpo de control a una dosis de 15 mg/kg dos veces por semana. La administración de las variantes de FZD8-Fc y el anticuerpo de control se realizó mediante inyección en la cavidad intraperitoneal. Se monitoreó el crecimiento tumoral y se midieron los volúmenes del tumor con calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como promedio ± S.E.M.

35 Las variantes 54F12 y 54F13 redujeron el crecimiento tumoral en menos de un 20 % en comparación con los tumores en ratones tratados con anticuerpo de control. El tratamiento con variantes de FZD8-Fc, 54F03, 54F09, 54F15 y 54F16 redujo el crecimiento tumoral aproximadamente de un 20 % a un 60 % en comparación con el tratamiento con el anticuerpo de control. Tal como se muestra en la Figura 18, las variantes 54F09 y 54F16 redujeron el crecimiento tumoral en el mayor porcentaje, 45 % (p < 0.001) y 60 % (p < 0.001), respectivamente. Por lo tanto, la actividad de crecimiento anti-tumoral de las variantes de FZD8-Fc se vio afectada por la secuencia de aminoácidos en la unión entre la porción FZD8 y la porción Fc. Tal como se muestra en el Ejemplo 14, la actividad de crecimiento anti-tumoral se vio afectada por la fuente de la región Fc, ya que ambas variantes que son proteínas de fusión IgG2 (54F12 y 54F13) tuvieron una actividad anti-tumoral más débil que las variantes de FZD8-Fc que son las proteínas de fusión IgG1.

45 Las células de tumor pancreático de los ratones que portan el tumor descritas con anterioridad se extrajeron y molieron en aproximadamente en fragmentos de 1 mm³, seguido de la digestión enzimática a 1 gramo por 10 ml de 300 µg/ml de colagenasa y 200 U/ml DNasa I durante 2 horas a 37 °C/CO₂ al 5 % con una mezcla intermitente con una pipeta de 10 ml para dispersar las células. Se detuvo la digestión mediante la adición de un volumen igual de amortiguador FACS (Solución Salina Tamponada de Hanks 1x (HBSS), Suero de Cabra Fetal (FCS) al 2 % inactivado por calor y HEPES 2mM pH 7.4). Se filtraron las células a través de filtros de nailon de 40 µm y se recolectaron por centrifugación a 150 xg durante 5 minutos. Se lisaron células de glóbulos rojos en un amortiguador lipotónico con cloruro de amonio durante 2 minutos en hielo y las células se lavaron de nuevo con amortiguador FACS en exceso y se resuspendieron con amortiguador FACS a 1x10⁷ células/ml.

55 Las suspensiones de célula única recién preparadas se tiñeron durante 20 minutos en hielo con H-2Kd anti-ratón biotinilado (clon SF1-1.1, Biolegend, San Diego, CA) a 5 µg/ml, CD45 anti-ratón biotinilado (30-F11, Biolegend) a 2.5 µg/ml y estreptavidin-PerCP-Cy5.5 (eBioscience, San Diego, CA) a una dilución de 1:200. Se extrajo el anticuerpo no unido mediante dos lavados con 10 volúmenes de amortiguador FACS. Para el análisis de los marcadores de la superficie humana celular, se tiñó la suspensión de célula tumoral única con anti-ESA-FITC (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) a una dilución de 1:50, CD44-PE-Cy7 anti-humano (eBioscience, San Diego, CA) a una dilución de 1:100 y CD201-PE anti-humano (BD Biosciences) a una dilución de 1:5. Se lavaron las células y se resuspendieron en amortiguador FACS con 2.5 µg/ml de 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las células teñidas con un color fluorescente único se utilizaron para calibrar el instrumento. Se excluyeron todas las células de ratón restantes (positivas para H-2Kd y CD45) y células muertas (positivas para DAPI) durante la clasificación de células. Los

dobletes y aglomeraciones de células se excluyeron mediante la estimulación de discriminación de dobles.

Tal como se muestra en la Figura 19, el tratamiento de los ratones portadores del tumor con las variantes de FZD8-Fc, 54F03 y 54F16, redujo el porcentaje de las células CD44^{hi} en comparación con los ratones tratados con el anticuerpo de control. A pesar de que el porcentaje de células CD201⁺CD44⁺ fue pequeño, el tratamiento de los ratones portadores del tumor con variantes de FZD8-Fc, 54F03 y 54F16, redujo el porcentaje de las células CD201⁺CD44⁺ en comparación con los ratones tratados con el anticuerpo de control. Se ha demostrado que CD44 ha sido el marcador de las células tumorigénicas (por ejemplo, células madre cancerosas). Además, en algunas realizaciones, se descubrió que las células que son CD44^{hi}CD201⁺ son más tumorigénicas que las células CD44^{hi}CD201⁻. Por lo tanto, es importante que las variantes de FZD8-Fc sean capaces de reducir el porcentaje de las poblaciones de células tanto CD44^{hi} como CD44^{hi}CD201⁺ y de ese modo, reducir el porcentaje o número de células tumorigénicas en los ratones tratados.

EJEMPLO 16

Caracterización de extremo N

Se predice que el sitio de escisión de secuencia de señal correcto en la proteína FZD8 será entre el aminoácido 25 (una alanina) y el aminoácido 26 (una alanina); la escisión en este sitio deja un extremo N de ASA. Se utilizó el análisis de espectrometría de masas para determinar la masa de las proteínas FZD8-Fc en comparación con la masa teórica de la proteína FZD8-Fc escindida en el sitio que se predijo.

Se produjeron variantes adicionales de FZD8-Fc con secuencias de señal modificadas a ADN2.0 (Menlo Park, CA) tal como se describió con anterioridad. El ADN2.0 sintetizó y ensambló oligonucleótidos de cadena simple corta de para producir las proteínas de las variantes de FZD8-Fc, 54F23 a 54F35. Luego se clonaron los oligonucleótidos ensamblados y se verificó la secuencia.

Se preparó ADN plásmido de cada variante de FZD8-Fc mediante la utilización de kits maxi-prep QIAGEN de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se realizó la expresión de cada variante mediante el reactivo FreeStyle™ MAX (Life Technologies) y células 293FS. Se cultivaron las células a fase log y se diluyeron a 1x10⁶ célula/ml. Para cada reacción, se diluyeron 315 ug de ADN plásmido en 5 ml de OptiMEM Pro. En un tubo diferente, se diluyeron 315 ul de reactivo FreeStyle™ MAX en 5 ml de OptiMem Pro. Se formó un complejo con el ADN plásmido y el reactivo FreeStyle™ MAX mediante la adición de reactivo diluido al ADN gota a gota, seguido de una incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente. El complejo AND-reactivo luego se agregó a 250 ml de células 293FS. Se dejaron crecer las reacciones de expresión durante 7-10 días y en dicho momento se extrajeron mediante centrifugación y filtración. Cada variante de Fzd8-Fc se purificó por purificación por afinidad mediante una columna de 5 ml HiTrap MAbSelect SURE. En resumen, el medio extraído se pasó a través de columnas que se habían equilibrado con amortiguador de unión. Las columnas se lavaron con amortiguador de unión para remover el material que no se unió y luego se eluyó la proteína de FZD8-Fc con amortiguador de elusión. Se dializaron las muestras que se eluyeron en un amortiguador apropiado para la espectrometría de masas.

Aproximadamente 250 µg de cada muestra de FZD8-Fc se redujo con Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) durante 30 minutos a 37 °C para separar las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo. Luego se sometió a alquilación a las mezclas reducidas mediante un tratamiento con yodoacetamida durante 30 minutos a 37 °C. Las muestras se pasaron a través de columnas NAP-5 (GE Health Care) para cambiar el amortiguador a Tris-HCL 10 mM (pH 7.4). El intercambio de amortiguadores fue seguido de la desglucosilación con endoglucosidasa PNGasa F. Las muestras se incubaron durante la noche a 37 °C a una proporción de 1:200 (enzima:muestra). Se detuvieron las reacciones mediante la adición de ácido. Las muestras FZD8-Fc reducidas, sometidas a alquilación y desglucosiladas se cargaron en ampollas para el análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC/MS) mediante un Waters UPLC™ y un espectrómetro de masas QToF electrospray. La calibración de masas del análisis de cada muestra mediante la utilización de agrupamientos de iones de ácido trifluoroacético de cesio, se realizó con una fuente de iones de electrospray dual Waters LockSpray™.

Tal como se muestra en la Figura 20A, una proteína de FZD8-Fc (54F16) con una secuencia de señal que era la misma secuencia que la secuencia natural, se produjo como una mezcla heterogénea en relación a la secuencia del extremo N. Una parte proporcional de la proteína presente en la muestra fue equivalente en masa a una proteína escindida en los aminoácidos 25 y 26 (pico a 41704.0) con una secuencia del extremo N de ASA. Sin embargo, más del 50 % de la proteína se encontraba presente en una forma con una masa diferente (pico a 41918.2). Este pico probablemente representa una proteína escindida en los aminoácidos 22 y 23; la escisión en este sitio deja una secuencia del extremo N de AAAASA (SEQ ID NO:76).

Se generaron las variantes de FZD8-Fc con secuencias de señal SEQ ID NO:68 a SEQ ID NO:74, se purificaron del cultivo celular y se analizaron mediante espectrometría de masas tal como se describió con anterioridad. Se observó que las variantes con secuencias de señal SEQ ID NO:70 a SEQ ID NO:74 produjeron una muestra de proteína casi completamente homogénea (varios resultados representativos se muestran en las Figuras 20B-20E). La variante de FZD8-Fc, 54F26 que comprende la SEQ ID NO:53 con secuencia de señal SEQ ID NO:71 se encontraba presente

5 en forma predominante (mayor al 95 %) como una proteína escindida en los aminoácidos 25 y 26 (pico 41930.1) con una secuencia de extremo N de ASA (Fig. 20B). También se observaron resultados similares con una variante que comprende la SEQ ID NO:53 y la secuencia de señal SEQ ID NO:72 (54F28, Fig. 20C), una variante que comprende la SEQ ID NO:53 y secuencia de señal SEQ ID NO:73 (54F30, Fig. 20D) y una variante que comprende la SEQ ID NO:53 y secuencia de señal SEQ ID NO:74 (54F32, Fig. 20E). Se observaron resultados similares con proteína producidas de transfecciones transitorias y estables.

EJEMPLO 17

10 Inhibición de crecimiento de tumor de colon *in vivo* mediante variantes de FZD8-Fc

15 Se inyectaron células disociadas de tumor de colon C28 (10,000 células) en forma subcutánea en ratones NOD/SCID macho adultos de 6-8 semanas de edad. Se dejó crecer a los tumores durante 56 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 175 mm³. Los ratones se distribuyeron en forma aleatoria (n = 10 por grupo) y se trataron con las construcciones de FZD8-Fc, 54F03, 54F23, 54F26 o un anticuerpo de control a una dosis de 15 mg/kg dos veces por semana. La administración de las variantes de FZD8-Fc y anticuerpo de control se realizó mediante inyección en la cavidad intraperitoneal. Se monitoreó el crecimiento tumoral y se midieron los volúmenes del tumor con calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresaron como promedio ± S.E.M.

20 Las variantes de FZD8-Fc, 54F23 y 54F26, se produjeron como una proteína predominantemente homogénea con un extremo N de aminoácidos ASA, mientras que 54F03 se produjo como una mezcla de proteína heterogénea con el extremo N de aminoácidos ASA y AAAASA. Tal como se muestra en la Figura 21, el tratamiento con variantes de FZD8-Fc, 54F03, 54F23 y 54F26 redujo el crecimiento tumoral en un 48 %, 57 % y 52 %, respectivamente, en comparación con el tratamiento con el anticuerpo de control luego de tres semanas de tratamiento.

SECUENCIAS

30 Variante de secuencia de aminoácidos 54F03 de FZD8-Fc (sin secuencia de señal predicha; la secuencia de unión "GRA" entre la secuencia de FZD8 y la secuencia de Fc de la proteína de fusión está subrayada) (SEQ ID NO:1)

ASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPLDKFF
 LCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNPDTL
 CMDYNRTDLTTGRADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
 K

35 Secuencia codificante de FZD8-Fc (los nucleótidos que codifican las secuencias derivadas de FZD8 están subrayados) (SEQ ID NO:2)

ATGGAGTGGGGTTACCTGTTGGAAGTGACCTCGCTGCTGGCCGCTTGGCGCTGCTGCAG
 CGCTCTAGCGCGCTGCGGCCGCTCGGCCAAGGAGCTGGCATGCCAAGAGATCACCGTG
 CCGCTGTGTAAGGGCATCGGCTACAACCTACACCTACATGCCCAATCAGTTCAACCACGAC
 ACGCAAGACGAGGCGGGCCTGGAGGTGCACCAGTTCTGGCCGCTGGTGGAGATCCAGTGC
 TCGCCCGATCTCAAGTTCTTCCTGTGCAGCATGTACACGCCCATCTGCCTAGAGGACTAC
 AAGAAGCCGCTGCCGCCCTGCCGCTCGGTGTGCGAGCGCGCCAAGGCCGGCTGCGCGCCG
 CTCATGCGCCAGTACGGCTTCGCCTGGCCCGACCGCATGCGCTGCGACCGGCTGCCCGAG
 CAAGGCAACCCTGACACGCTGTGCATGGACTACAACCGCACCGACCTAACCCCGGGCGC
 GCCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCA
 GTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTC
 ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
 GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
 TACCGTGTGGTACAGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
 AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
 AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC
 AAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTG
 GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGAC
 TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
 GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAG
 AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

FZD Mínimo y secuencias de dominio Fri de SFRP aminoácidos h-FZD1 116-227 (SEQ ID NO:3)

5 CQPI S I P L C T D I A Y N Q T I M P N L L G H T N Q E D A G L E V H Q F Y P L V K V Q C S A E L K F F L C S M Y A P
 V C T V L E Q A I P P C R S L C E R A R Q G C E A L M N K F G F Q W P D T L K C E K F P V H G A G E L C

aminoácidos h-FZD2 39-150 (SEQ ID NO:4)

10 CQPI S I P L C T D I A Y N Q T I M P N L L G H T N Q E D A G L E V H Q F Y P L V K V Q C S P E L R F F L C S M Y A P
 V C T V L E Q A I P P C R S I C E R A R Q G C E A L M N K F G F Q W P E R L R C E H F P R H G A E Q I C

aminoácidos h-FZD3 28-133 (SEQ ID NO:5)

15 C E P I T L R M C Q D L P Y N T T F M P N L L N H Y D Q Q T A A L A M E P F H P M V N L D C S R D F R P F L C A L Y A P
 I C M E Y G R V T L P C R R L C Q R A Y S E C S K L M E M F G V P W P E D M E C S R F P D C

aminoácidos h-FZD4 48-161 (SEQ ID NO:6)

20 C D P I R I S M C Q N L G Y N V T K M P N L V G H E L Q T D A E L Q L T T F T P L I Q Y G C S S Q L Q F F L C S V Y V P
 M C T E K I N I P I G P C G M C L S V K R R C E P V L K E F G F A W P E S L N C S K F P P Q N D H N H M C

aminoácidos h-FZD5 33-147 (SEQ ID NO:7)

25 C Q E I T V P M C R G I G Y N L T H M P N Q F N H D T Q D E A G L E V H Q F W P L V E I Q C S P D L R F F L C S M Y T P
 I C L P D Y H K P L P P C R S V C E R A K A G C S P L M R Q Y G F A W P E R M S C D R L P V L G R D A E V L C

aminoácidos h-FZD6 24-129 (SEQ ID NO:8)

30 C E P I T V P R C M K M A Y N M T F F P N L M G H Y D Q S I A A V E M E H F L P L A N L E C S P N I E T F L C K A F V P
 T C I E Q I H V V P P C R K L C E K V Y S D C K K L I D T F G I R W P E E L E C D R L Q Y C

aminoácidos h-FZD7 49-160 (SEQ ID NO:9)

35 C Q P I S I P L C T D I A Y N Q T I L P N L L G H T N Q E D A G L E V H Q F Y P L V K V Q C S P E L R F F L C S M Y A P
 V C T V L D Q A I P P C R S L C E R A R Q G C E A L M N K F G F Q W P E R L R C E N F P V H G A G E I C

aminoácidos h-FZD8 35-148 (SEQ ID NO:10)

C Q E I T V P L C K G I G Y N Y T Y M P N Q F N H D T Q D E A G L E V H Q F W P L V E I Q C S P D L K F F L C S M Y T P
 I C L E D Y K K P L P P C R S V C E R A K A G C A P L M R Q Y G F A W P D R M R C D R L P E Q G N P D T L C

ES 2 638 278 T3

aminoácidos h-FZD9 39-152 (SEQ ID NO:11)

CQAVEI PMCRGIGYNLTRMPNLLGHTSQGEAAAELAEFAPLVQYGCHSHLRFFFLCSLYAP
MCTDQVSTPI PACRPMCEQARLRCAPI MEQFNFGWPDSDL CARLPTRNDPHALC

5 aminoácidos h-FZD10 34-147 (SEQ ID NO:12)

CQPIEIPMCKDIGYNMTRMPNLMGHENQREAAIQLHEFAPLVEY GCHGHLRFFFLCSLYAP
MCTEQVSTPI PACRVMCEQARLKCSPI MEQFNFKWPDSDL CRKLPNKNDPNYLC

10 aminoácidos h-SFRP1 57-165 (SEQ ID NO:13)

CVDI PADLRLCHNVGYKKMVLPNLLEHETMAEVKQQASSWVPLLNKNCHAGTQVFLCSLF
APVCLDRPI YPCRWLCEAVRDSCEPVMQFFGFYWP EMLKCDKFPEGDVC

aminoácidos h-SFRP2 40-152 (SEQ ID NO:14)

15 CKPI PANLQLCHGIEYQNMRLPNLLGHETMKEVLEQAGAWI PLVMKQCHPDTKKFLCSLF
APVCLDDLD ETIQPC HSLCVQVKDRCAPVMSAFGF PWPDMLECDRFPQDNDLC

aminoácidos h-SFRP3 35-147 (SEQ ID NO:15)

20 CEPVRI PLCKSLPWNMTKMPNHLHHSTQANAILAIEQFEGLLGTHCSPDLLFFFLCAMYAP
ICTIDFQHEPIKPKSV CERARQGCEPILIKYRHSWPENLACEELPVYDRGVC

aminoácidos h-SFRP4 24-136 (SEQ ID NO:16)

25 CEAVRI PMCRHMPWNI TRMPNHLHHSTQENAILAIEQYEELVDVNC SAVL RFFFCAMYAP
ICTLEFLHDIKPKSVQ RARDDCEPLMKMYNHSWPESLACDEL PVYDRGVC

aminoácidos h-SFRP5 53-162 (SEQ ID NO:17)

CLDI PADLPLCHTVGYKRMRLPNLLEHESLAEVKQQASSWLPLLAKRCHSDTQVFLCSLF
APVCLDRPI YPCRS LCEAVRAGCAPLMEAYGF PWP EMLHCHKFPLDNDLC

Secuencias Fc

30 Región Fc de la IgG1 humana (SEQ ID NO:18)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

35 Región Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO:42)

KSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40 Región Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO:43)

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
N WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región Fc de IgG2 humana (SEQ ID NO:44)

CVVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDVLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGS
 FFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencias de dominio Fri de FZD

5 Dominio Fri de FZD4 humano (secuencia de señal predicha subrayada) (SEC ID NO:19)

MLAMAWRGAGPSVPGAPGGVGLSLGLLLQLLLLLGPARGFGDEEERRCDPIRISMCQNLG
YNVTKMPNLVGHQLQTDALQLTFTPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINIPIGPC
 GGMCLSVKRRCEPVLKEFGFAWPESLNCSKFPPQNDHNMCMMEGPGDEEV

10 Dominio Fri de FZD5 humano (secuencia de señal predicha subrayada) (SEQ ID NO:20)

MARPDPSPAPPSLLLLLLAQLVGRAAAASKAPVCQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQ
DEAGLEVHQFWPLVEIQCSPLDRFFLCSMYTPICLPDYHKPLPPCRSVCERAKAGCSPLM
 RQYGFAPPERMSCDRLPVLGRDAEVL CMDYNRSEATT

Dominio Fri de FZD8 humano (secuencia de señal predicha subrayada) (SEQ ID NO:21)

MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGAAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHD
TQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPLDKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAP
 15 LMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNPDTL CMDYNRTDLTT

Secuencia de aminoácidos de dominio Fri de FZD1 humano sin secuencia de señal predicha (SEQ ID NO:32; aminoácidos 87-237 de SEQ ID NO:27)

20 QQQPPPPQQQQSGQQYNGERGISVPDHGYCQPI S I PLCTDIAYNQTIMP NLLGHTNQEDA
 GLEVHQFYPLVKVQCSAELKFFLCSMYAPVCTVLEQALPPCRSLCERARQGCEALMNKFG
 FQWPDTLKCEKFPVHGAGELCVGQNTSDKGT

Secuencia de aminoácidos de dominio Fri de FZD2 humano sin secuencia de señal predicha (SEQ ID NO:33; aminoácidos 24-159 de SEQ ID NO:28)

25 QFHGEKGISIPDHGFCQPI S I PLCTDIAYNQTIMP NLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQ
 CSPELRFFLCSMYAPVCTVLEQAI PPCR S ICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPR
 HGAEQICVGQNHSE DG

Secuencia de aminoácidos de dominio Fri de FZD3 humano sin secuencia de señal predicha (SEQ ID NO:34; aminoácidos 23-143 de SEQ ID NO:29)

30 HSLFSC EPI TLRMCQDL PYN TTFMPNLLNHYDQQTAAALAMEPFHMPVNLDCSRDF
 RPFLCALYAPICMEYGRVTLPCRRLCQRAYSECSKLMEMFGVWPEDMECSRFPDCDEPY
 PRLVDL

Secuencia de aminoácidos de dominio Fri de FZD4 humano sin secuencia de señal predicha (SEQ ID NO:35; aminoácidos 40-170 de SEQ ID NO:22)

35 FGDEEERRCDPIRISMCQNLGYNVTKMPNLVGHQLQTDALQLTFTPLIQYGCSSQLQF
 FLCSVYVPMCTEKINIPIGPCGGMCLSVKRRCEPVLKEFGFAWPESLNCSKFPPQNDHNM
 MCMMEGPGDEEV

Secuencia de aminoácidos de dominio Fri de FZD5 humano sin secuencia de señal predicha (SEQ ID NO:36; aminoácidos 27-157 de SEQ ID NO:23)

40 ASKAPVCQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPLDRFFL
 CSMYTPICLPDYHKPLPPCRSVCERAKAGCSPLMRQYGFAPPERMSCDRLPVLGRDAEVL
 CMDYNRSEATT

Secuencia de aminoácidos de dominio Fri de FZD6 humano sin secuencia de señal predicha (SEQ ID NO:37;

ES 2 638 278 T3

aminoácidos 19-146 de SEQ ID NO:24)

HSLFTCEPITVPRCKMAYNMTFFPNLMGHYDQSIAAVEMEHFLPLANLECSPIETFLC
KAFVPTCIEQIHVVPPCRKLCVKVSDCKKLIDTFGIRWPEELECDRLQYCDQVPTFD
PHTEFLG

- 5 Secuencia de aminoácidos de dominio Fri de FZD7 humano sin secuencia de señal predicha (SEQ ID NO:38; aminoácidos 33-170 de SEQ ID NO:25)

QPYHGEKGISVDPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTILPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKV
QCSPELRFLLCSMYAPVCTVLDQAIPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEFP
VHGAGEICVGQNTSDGSG

- 10 Secuencia de aminoácidos de dominio Fri de FZD8 humano sin secuencia de señal predicha (SEQ ID NO:39; aminoácidos 28-158 de SEQ ID NO:30)

ASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPLKFF
LCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFQWPRMRCDRLEQGNPDTL
CMDYNRTDLTT

- 15 Secuencia de aminoácidos de dominio Fri de FZD9 humano sin secuencia de señal predicha (SEQ ID NO:40; aminoácidos 23-159 de SEQ ID NO:31)

LEIGRFDPERGRGAAPCQAVEIPMCRGIGYNLTRMPNLLGHTSQGEAAAELAEFAPLVQY
GCHSHLRFLLCSLYAPMCTDQVSTPIPACRPMCEQARLRCAPIEQFNFGWPDSDLCARL
PTRNDPHALCMEAPENA

- 20 Secuencia de aminoácidos de dominio Fri de FZD10 humano sin secuencia de señal predicha (SEQ ID NO:41; aminoácidos 21-154 de SEQ ID NO:26)

ISSMDMERPGDGKCPPIEIPMCKDIGYNTMTRMPNLMGHENQREAAIQLHEFAPLVEYGCH
GHLRFLLCSLYAPMCTEQVSTPIPACRVMCEQARLKCSPIMEQFNFKWPDSDLCKLKNK
NDPNYLCMEAPNNG

- 25 *Secuencias de dominio extracelular de FZD (ECD)*

ECD de FZD1 humano con secuencia de señal (SEQ ID NO:27)

MAEEEAPKKSRAAGGGASWELCAGALSARLAEESGDAGRRRPPVDPRRLARQLLLLLLW
LLEAPLLLGVRAQAAGQGPQGPQGPQPPPPQQQSGQYNGERGISVDPDHGYCQPIS
IPLCTDIAYNQTIMPNNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSAELKFFLLCSMYAPVCTVL
EQALPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPDTLKCEKFPVHGAGELCVGQNTSDKGTPTP
SLLPEFWTSNPQHGGGHRGGFPGGAGASERGFSCPRALKVPSYLNHYHFLGKDCGAPC
EPTKVYGLMYFGPEELRFSRT

30

ECD de FZD2 humano con secuencia de señal (SEQ ID NO:28)

MRPRSALPRLLLPLLLLPAAGPAQFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNNL
LGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFLLCSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQG
CEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEGDGAPALLTTAPPGLQPGAGGTP
GGPGGGGAPPRYATLEHPFHCPVRLKVPSYLSYKFLGERDCAAPCEPARPDGSMFFSQEE
TRFARLWILT

35

ECD de FZD3 humano con secuencia de señal (SEQ ID NO:29)

MAMTWIVFSLWPLTVFMGHIGGHSFLSCEPITLRMCQDLPYNTTFMPNNLNHYDQQTAAAL
AMEPFFHPMVNLDCSRDFRPFLLCALYAPICMEYGRVTLPCRRLCQRAYSECSKLMEMFGVP
WPEDMECSRFPDCDEPYPRVLNLAGEPTEGAPVAVQRDYGFWCPRELKDIDPLGYSFL
HVRDCSPPCPNMYFRREELSFARY

- 40 ECD de FZD4 humano con secuencia de señal (SEQ ID NO:22)

ES 2 638 278 T3

MLAMAWRGAGPSVPGAPGGVGLSLGLLLQLLLLLGPARGFGDEEERRCDPIRISMCQNLG
YNVTKMPNLVGHQLQTDALQLTTFTPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINIPIGPC
GGMCLSVKRRCEPVLKEFGFAWPESLNCSEKFPQNDHNHMCMEGPGDEEVPLPHKTPIQP
GEECHSVGTNSDQYIWKRLNLCVLCGYPDAGLYSRSAKEFTDI

ECD de FZD5 humano con secuencia de señal (SEQ ID NO:23)

5 MARPDPSAPPSLLLLLLAQLVGRAAAASKAPVCQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQ
DEAGLEVHQFWPLVEIQSPDLRFFLCSMYTPICLPDYHKPLPPCRSVCERAKAGCSPLM
RQYGFAPWPERMSCDRLPVLGRDAEVLCDYNRSEATTAPPRPFPKPTLPGPPGAPASGG
ECPAGGPFVCKCREPFVPIKESHPLYNKVRTGQVPCAVPCYQPSFSADERT

ECD de FZD6 humano con secuencia de señal (SEQ ID NO:24)

10 MEMFTFLLTICIFLPLLRGHSFLTCEPITVPRCMKMAYNMTFFPNLMGHYDQSIAAVEMEH
FLPLANLECSPNIEFLCKAFVPTCIEQIHVVPPCRKLCEKVYSDCKKLIDTFGIRWPEE
LECDRLQYCDETVPVTFDPHTEFLGPQKTEQVQRDIGFWCPRHLKTSGGQGYKFLGIDQ
CAPPCPNMYFKSDELEFAKSFIGTVSI

ECD de FZD7 humano con secuencia de señal (SEQ ID NO:25)

15 MRDPGAAAPLSSGLCALVLAALGALSAGAGAQPYPHGEKGISVPDHGFCQPI S I P L C T D I
AYNQTI L P N L L G H T N Q E D A G L E V H Q F Y P L V K V Q C S P E L R F F L C S M Y A P V C T V L D Q A I P P C
R S L C E R A R Q G C E A L M N K F G F Q W P E R L R C E N F P V H G A G E I C V G Q N T S D G S G G P G G G P T A Y P
T A P Y L P D L P F T A L P P G A S D G R G R P A F P F S C P R Q L K V P P Y L G Y R F L G E R D C G A P C E P G R A N
G L M Y F K E E E R R F A R L

ECD de FZD8 humano con secuencia de señal (SEQ ID NO:30)

20 MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGAAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHD
TQDEAGLEVHQFWPLVEIQSPDLKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAP
LMRQYGFAPWDRMRCDRLPEQGNPDTLCMDYNRTDLTTAAPSPPRRLLPPPPPEQPPSGS
GHGRPPGARPPHRGGGRGGGGDAAAPPARGGGGGKARPPGGGAAPCEPGCQCRAPMVS
VSSERHPLYNRVKTGQIANCALPCHNPFFSODERAFT

ECD de FZD9 humano con secuencia de señal (SEQ ID NO:31)

20 MAVAPLRGALLLWQLLAAGGAAL E I G R F D P E R G R G A A P C Q A V E I P M C R G I G Y N L T R M P N L
L G H T S Q G E A A A E L A E F A P L V Q Y G C H S H L R F F L C S L Y A P M C T D Q V S T P I P A C R P M C E Q A R L
R C A P I M E Q F N F G W P D S L D C A R L P T R N D P H A L C M E A P E N A T A G P A E P H K G L G M L P V A P R P A
R P P G D L G P G A G G S G T C E N P E K F Q Y V E K S R S C A P R C G P G V E V F W S R R D K D F

ECD de FZD10 humano con secuencia de señal (SEQ ID NO:26)

25 MQRPGPRLWLVLQVMGSCAAISSMDMERPGDGKQPIEIPMCKDIGYNMTRMPNLMGHEN
QREAAIQLHEFAPLVEYGCHGLRFFLCSLYAPMCTEQVSTPI PACRVMCEQARLKCSPI
MEQFNFKWPDSLDCRKLPNKNDPNYLCMEAPNNGSDEPTRGSLFPPLFRPQRPHSAQEH
PLKDGGPGRGGCDNPGKFHHVEKSASCAPLCTPGVDVYWSREDKRFA

Variantes de FZD8-Fc

30 Secuencia de aminoácidos de variante de FZD8-Fc 54F03 (sin secuencia de señal predicha; escisión alternativa)
(SEQ ID NO:45)

ES 2 638 278 T3

AAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSDDL
KFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNP
DTL CMDYNRTDLTTGRADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

Secuencia de aminoácidos de variante de FZD8-Fc 54F09 (sin secuencia de señal predicha) (SEQ ID NO:46)

ASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSDDLKFF
LCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNPDTL
CMDYNRTDLTTAAPSPPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

5

Secuencia de aminoácidos de variante de FZD8-Fc 54F09 (sin secuencia de señal predicha; escisión alternativa) (SEQ ID NO:47)

AAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSDDL
KFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNP
DTL CMDYNRTDLTTAAPSPPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

10

Secuencia de aminoácidos de la variante de FZD8-Fc 54F15 (sin secuencia de señal predicha) (SEQ ID NO:48)

ASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSDDLKFF
LCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNPDTL
CMDYNRTDLTTAAPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

15

Secuencia de aminoácidos de la variante de FZD8-Fc 54F15 (sin secuencia de señal predicha; escisión alternativa) (SEQ ID NO:49)

AAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSDDL
KFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNP
DTL CMDYNRTDLTTAAPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL

20

SPGK

Secuencia de aminoácidos de FZD8-Fc 54F16, 54F17, 54F18, 54F23, 54F25, 54F27, 54F29, 54F31 y 54F34 (sin secuencia de señal predicha) (SEQ ID NO:50)

ES 2 638 278 T3

ASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCS PDLKFF
LCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNPDTL
CMDYNRTDLTTKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

Secuencia de aminoácidos de variante de FZD8-Fc 54F16 (sin secuencia de señal predicha; escisión alternativa)
(SEQ ID NO:51)

5

AAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCS PDL
KFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNP
DTL CMDYNRTDLTTKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSL
SPG

Secuencia de aminoácidos de variante de FZD8-Fc 54F16 (con secuencia de señal) (SEQ ID NO:52)

10

MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGAAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHD
TQDEAGLEVHQFWPLVEIQCS PDLKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAP
LMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNPDTL CMDYNRTDLTTKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de variante de FZD8-Fc 54F19, 54F20, 54F24, 54F26, 54F28, 54F30, 54F32, 54F34
y 54F35 (sin secuencia de señal predicha) (SEQ ID NO:53)

15

ASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCS PDLKFF
LCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNPDTL
CMDYNRTDLTTEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

Secuencia de aminoácidos de variante de FZD8-Fc 54F19 (sin secuencia de señal predicha; escisión alternativa)
(SEQ ID NO:54)

20

ALAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCS PDL
KFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNP
DTL CMDYNRTDLTTEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVS NKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV MHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

Secuencia de aminoácidos de variante de FZD8-Fc 54F20 (sin secuencia de señal predicha; escisión alternativa)
(SEQ ID NO:55)

25

VLAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCS PDL

KFFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNP
 DTLCMDYNRTDLTTEPKSSDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ENSGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK

Secuencia de aminoácidos de variante de FZD8-Fc 54F34 (sin secuencia de señal predicha) (SEQ ID NO:65)

5 KELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSDDLKFFFLCS
 MYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNPDTLCMD
 YNRTDLTTEPKSSDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDV
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

Secuencia de aminoácidos de variante de FZD8-Fc 54F33 (sin secuencia de señal predicha) (SEQ ID NO:66)

10 KELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSDDLKFFFLCS
 MYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNPDTLCMD
 YNRTDLTTKSSDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

ECD de ROR1 humana con secuencia de señal (SEQ ID NO:56)

15 MHRPRRRGTRPPLLALLAALLLAARGAAQETELSVSAELVPTSSWNI SSELNKDSYLTTL
 DEPMNITITSLGQTAELHCKVSGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRLSFRSTIYGSRLRIRN
 LDTTDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIACAR
 FIGNRTVYMESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSS
 VPKPRDLRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMLMRLKLPNCEDLPQPE SPEAANCIRIG
 IPMADPINKNHKCYNSTGVDYRGTVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHS
 YCRNPGNQKEAPWCFTLDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILY

ECD de ROR2 humana con secuencia de señal (SEQ ID NO:57)

20 MARGSALPRRPLLCIPAVWAAAALLSVSRTSGEVEVLDPNPDLGQDGPITLTKGY
 FLNLFLEPVNNTIVQGQTAILHCKVAGNPPNVRWLKNDAPVVQEPRIIRKTEYGSRL
 RIQDLDTTDTGYYQCVATNGMKTITATGVLFVRLGPTHSPNHNFDYHEDGFCQPYRGI
 ACARFIGNRTIYVDSLQMQGEIENRITAAFTMIGTSTHLSDQCSQFAIPSFCHVFVPLCD
 ARSRTPKPRELCRDECEVLES DLCRQEYTIARSNPLILMRLQLPKCEALPMPE SPDAANC
 MRIGI PAERLGRYHQCYNGSGMDYRGTA STTKSGHQCPWALQHPHSHLSSTDFPELGG
 GHAYCRNPGGQMEGPWCFTQKNV RMELCDVPSVCS PRDSSKMG

Dominio Fri mínimo de h-ROR1 (SEQ ID NO:58)

20 CQPYRGIACARFIGNRTVYMESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCH
 YAFPYCDETSSVPKPRDLRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMLMRLKLPNCEDLPQPE
 SPEAANC

Dominio Fri mínimo de h-ROR2 (SEQ ID NO:59)

25 CQPYRGIACARFIGNRTIYVDSLQMQGEIENRITAAFTMIGTSTHLSDQCSQFAIPSFCH
 FVFPLCDARSRTPKPRELCRDECEVLES DLCRQEYTIARSNPLILMRLQLPKCEALPMPE
 SPDAANC

Unión (SEQ ID NO:60)

Conector ESGGGGVT (SEQ ID NO:61)

LESGGGGVT

5 Conector (SEQ ID NO:62)
GRAQVT

Conector (SEQ ID NO:63)
WRAQVT

10 Conector (SEQ ID NO:64)
ARGRAQVT

15 Secuencia de señal (SEQ ID NO:67)
MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGAAA

Secuencia de señal (SEQ ID NO:68)
MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGALA

20 Secuencia de señal (SEQ ID NO:69)
MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGVLA

Secuencia de señal (SEQ ID NO:70)
MEWGYLLEVTSLLAALLLQRSPIVHA

25 Secuencia de señal (SEQ ID NO:71)
MEWGYLLEVTSLLAALFLLQRSPIVHA

30 Secuencia de señal (SEQ ID NO:72)
MEWGYLLEVTSLLAALLLQRSPFVHA

Secuencia de señal (SEQ ID NO:73)
MEWGYLLEVTSLLAALLLQRSPIIYA

35 Secuencia de señal (SEQ ID NO:74)
MEWGYLLEVTSLLAALLLQRSPIAHA

Variante de FZD8-Fc 54F26 con secuencia de señal (SEQ ID NO:75)

MEWGYLLEVTSLLAALFLLQRSPIVHAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHD
TQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSFDLKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAP
LMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNPDTLCMDYNRTDLTTEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSQVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

Secuencia del extremo N (SEQ ID NO:76)
AAAASA

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende:
 - 5 (i) un agente de unión a Wnt que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; y
 - (ii) una secuencia señal seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73 y SEQ ID NO:74.
- 10 2. Un polipéptido de la reivindicación 1 que comprende SEQ ID NO:72 y SEQ ID NO: 53.
3. Un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 15 4. Una célula:
 - (i) que produce el polipéptido de cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2; o
 - (ii) que comprende el polinucleótido de la reivindicación 3.
- 20 5. Una composición que comprende un agente de unión a Wnt que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, en la que al menos el 80 % de dicho agente de unión a Wnt tiene una secuencia de aminoácidos de extremo N Ala Ser Ala (ASA).
- 25 6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 que es una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de cáncer o para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a la activación canónica de la señalización de Wnt.
- 30 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el cáncer es cáncer pancreático, cáncer hepatocelular o cáncer de ovarios.
- 35 9. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, en la que el agente de unión a Wnt ha de administrarse con un segundo agente terapéutico.
- 40 10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.
11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el agente quimioterapéutico es paclitaxel, paclitaxel unido a albúmina, carboplatino, irinotecán o gemcitabina.
- 45 12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el agente quimioterapéutico es gemcitabina y el cáncer es cáncer pancreático.
13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el agente quimioterapéutico es paclitaxel y el cáncer es cáncer pancreático.
- 50 14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el segundo agente quimioterapéutico es un inhibidor de la angiogénesis.
15. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el inhibidor de la angiogénesis es un anticuerpo anti-VEGF.
- 55 16. Un método *in vitro* para producir una composición de acuerdo con la reivindicación 5,

Comprendiendo el método expresar en una célula un polipéptido que comprende SEQ ID NO:53 y una secuencia señal seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73 y SEQ ID NO:74,

en donde al menos el 80 % del agente de unión a Wnt producido por las células tiene la secuencia de aminoácidos de extremo N Ala Ser Ala (ASA).
- 60 17. Un método *in vitro* para producir un polipéptido de unión a Wnt que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, comprendiendo el método:
 - 65 (i) expresar en una célula hospedadora un polipéptido de las reivindicaciones 1 o 2 en condiciones donde la secuencia señal es escindida por la célula hospedadora; y
 - (ii) purificar el polipéptido de unión a Wnt de SEQ ID NO:53.

18. Un polipéptido de unión a Wnt que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53 producido por el método de la reivindicación 17.

Figura 1

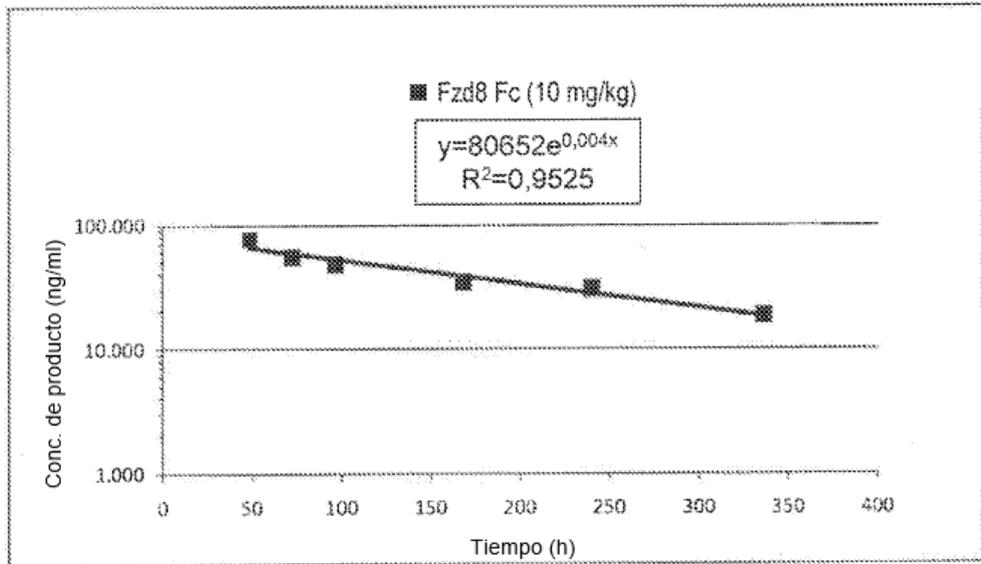


Figura 2

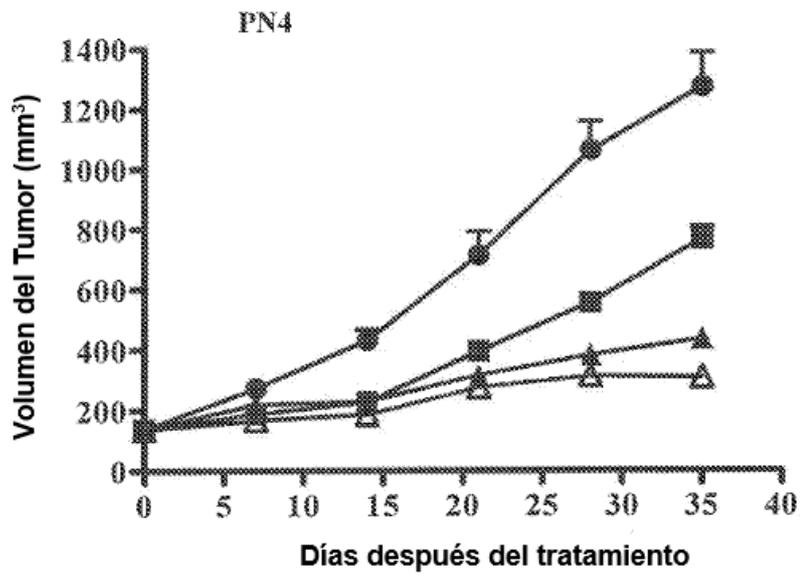


Figura 3

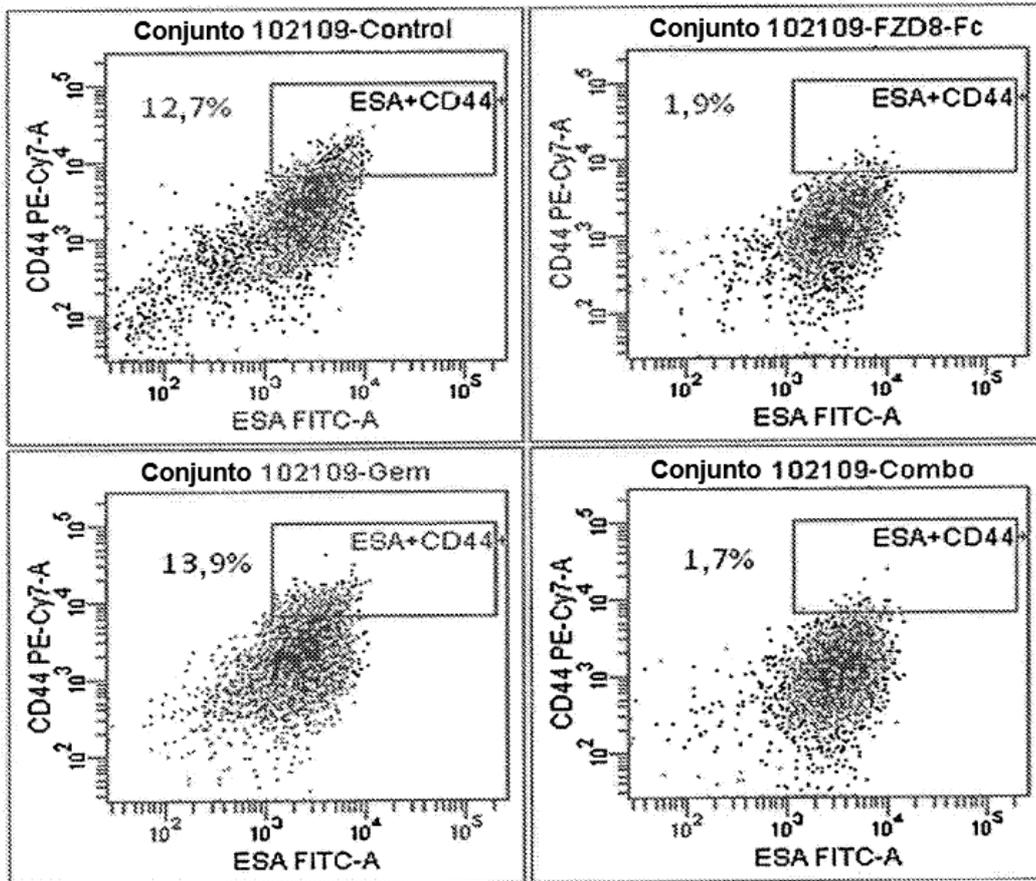


Figura 4

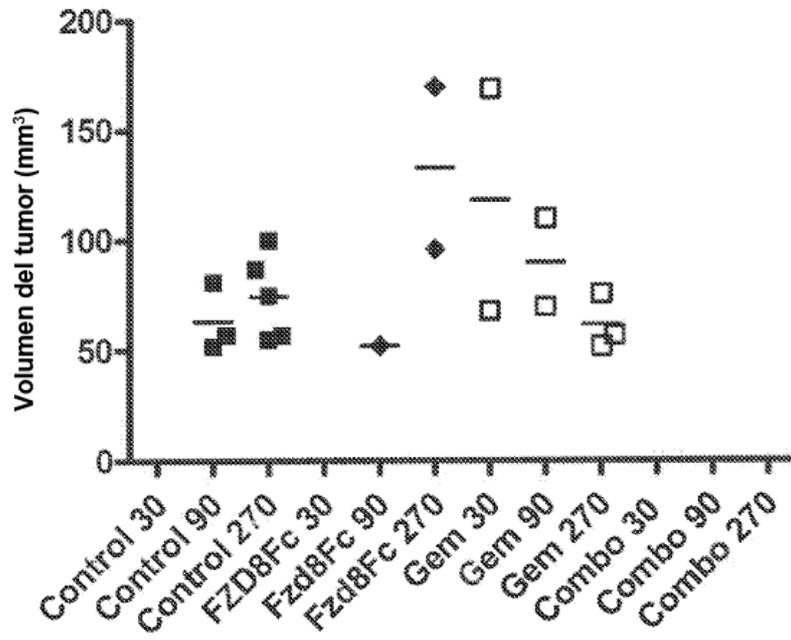


Figura 5

PN4

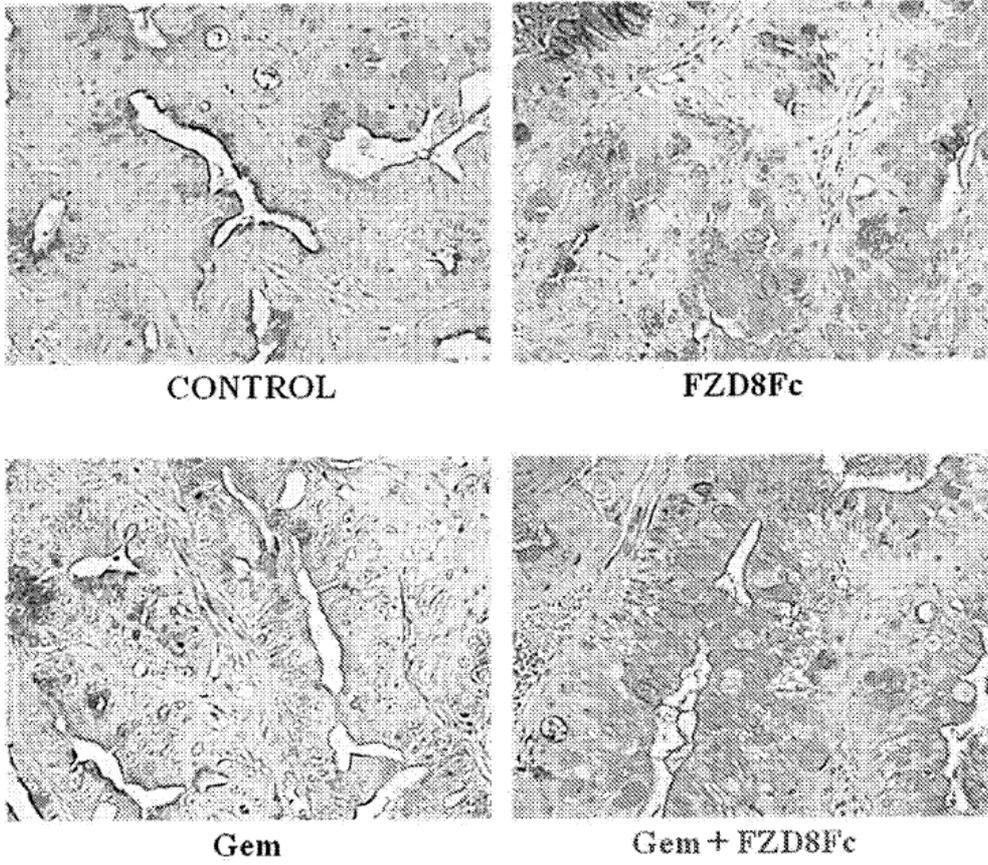
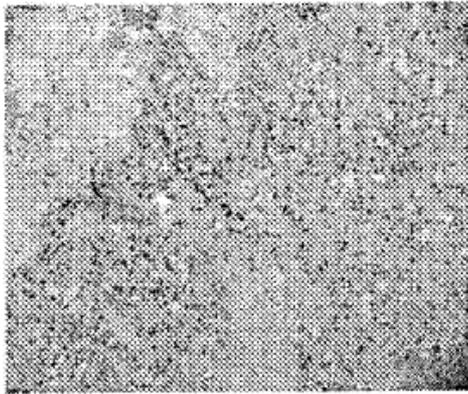
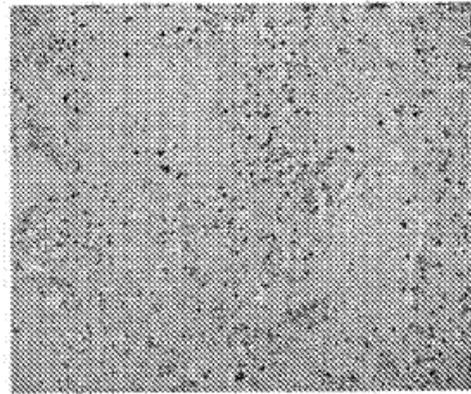


Figura 6

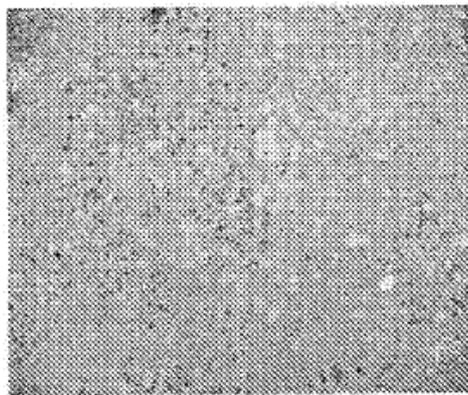
PN8



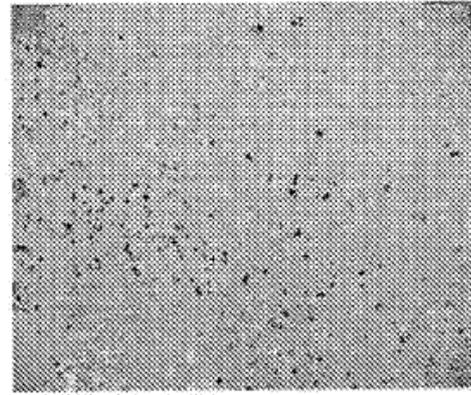
Control mAb



Gemcitabina



FZD8-Fc



FZD8-Fc + Gemcitabina

Figura 7

PN13

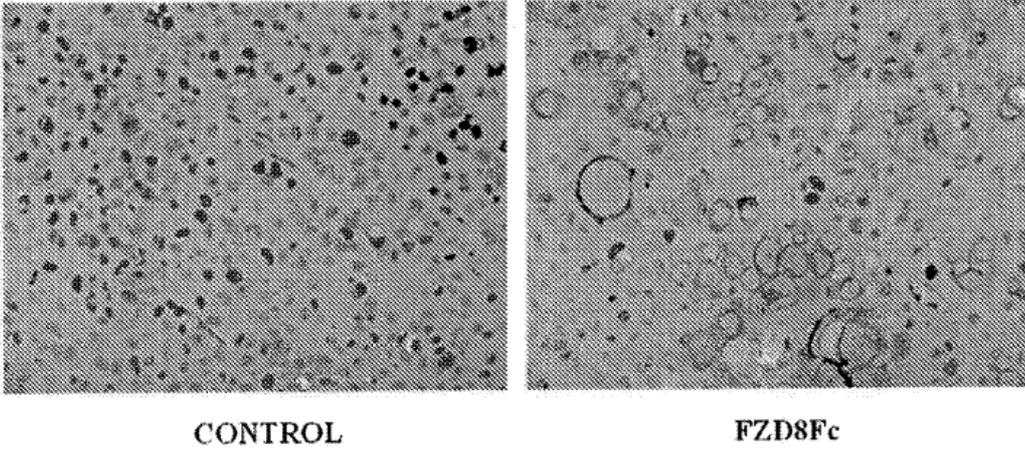


Figura 8

PN13

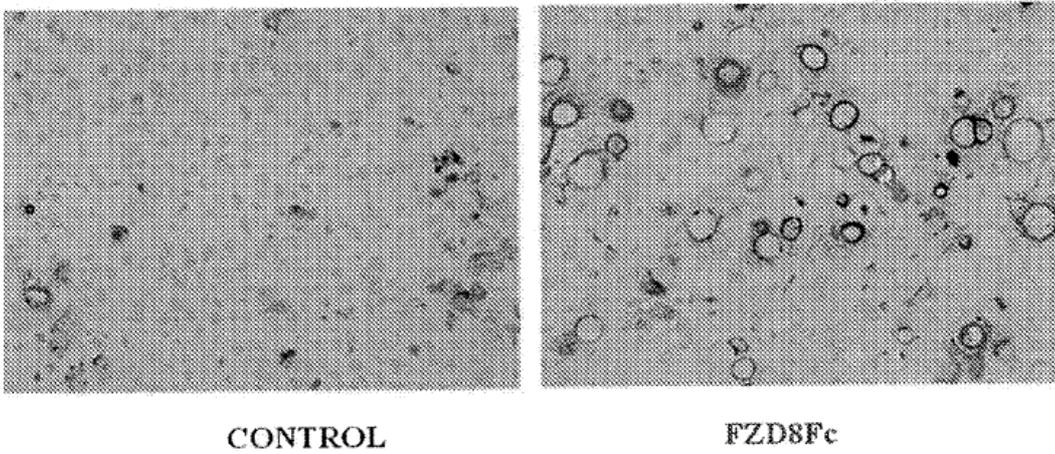
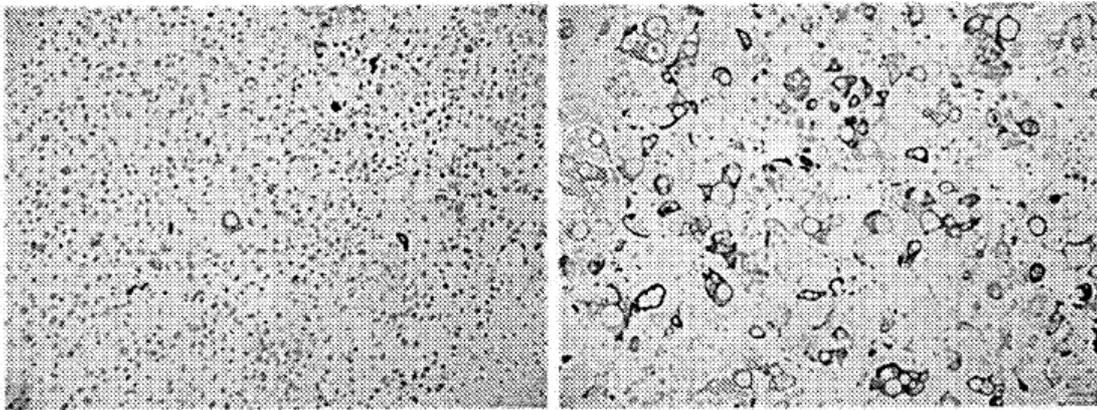


Figura 9

PN13



CONTROL

FZD8Fc

Figura 10

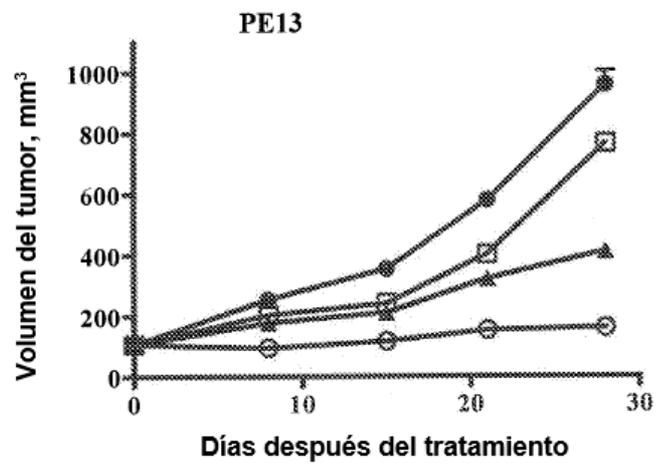
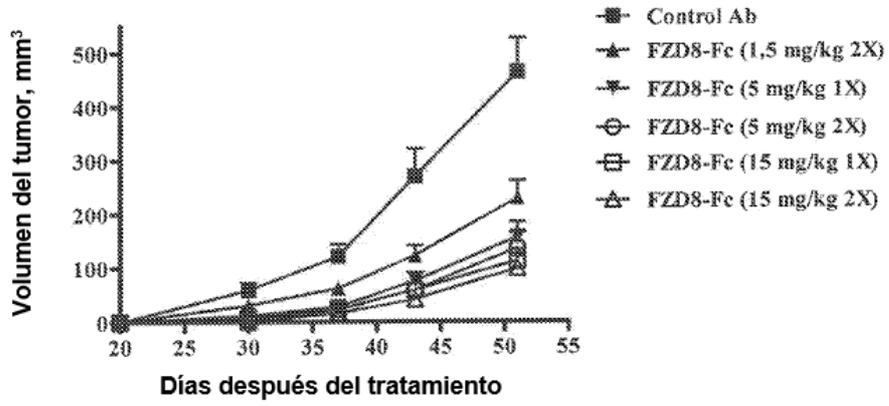


Figura 11

11A



11B

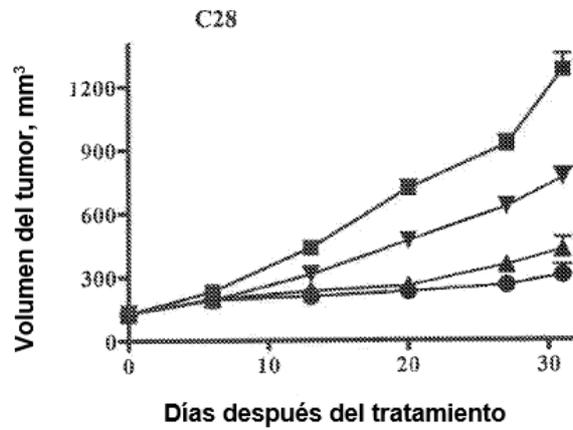
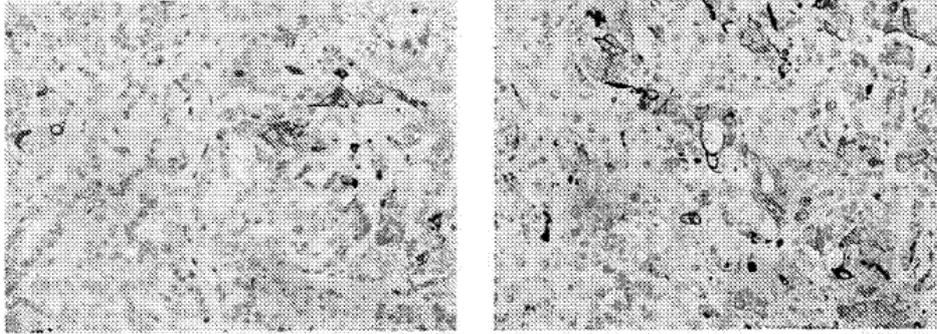


Figura 12

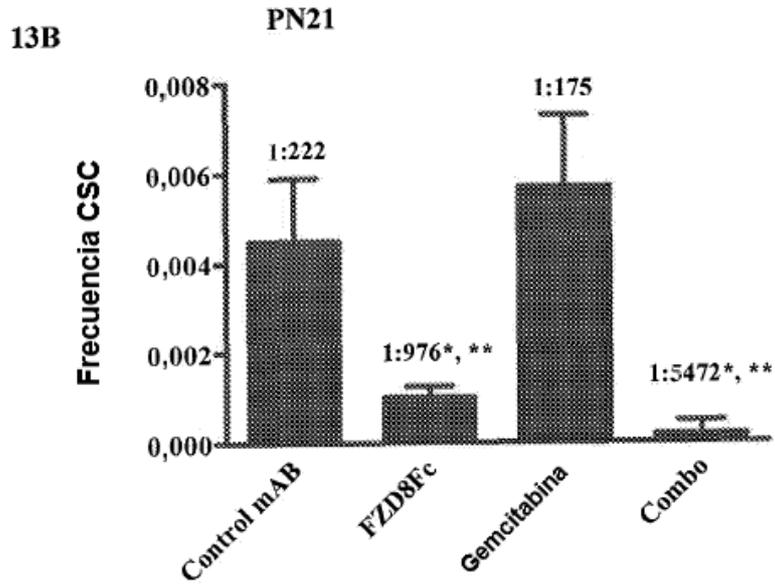
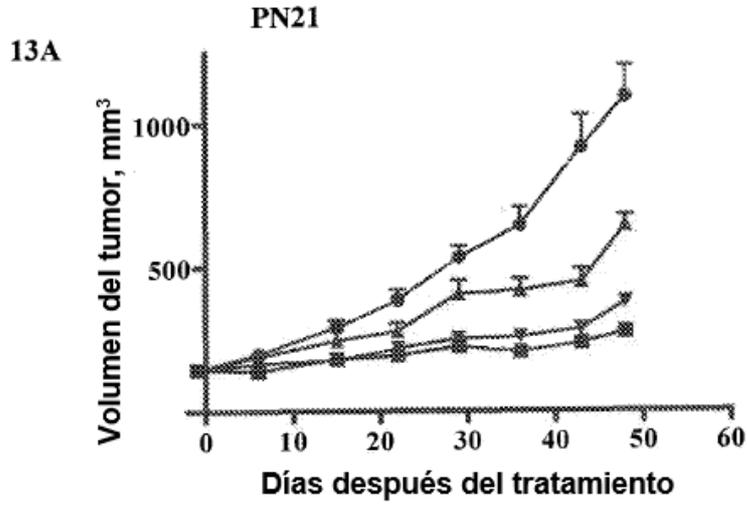
C28



Control

FZD8-Fc

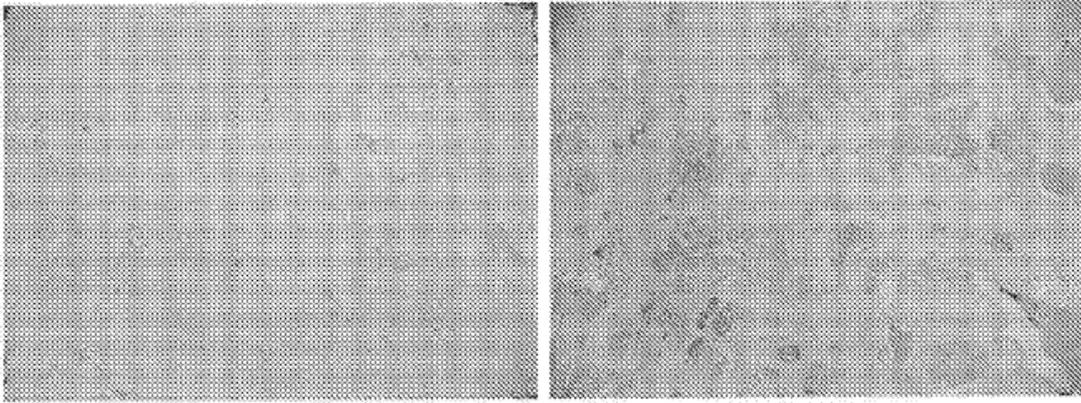
Figura 13



*: Diferente del control
 **: Diferente de Gemcitabina

Figura 14

PN21

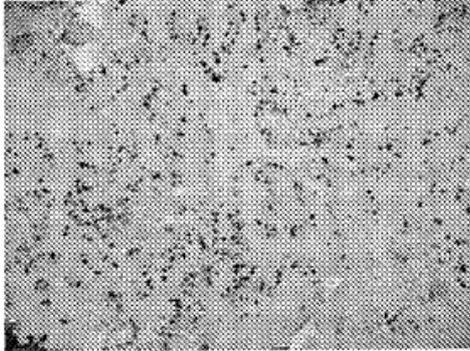


Control mAb

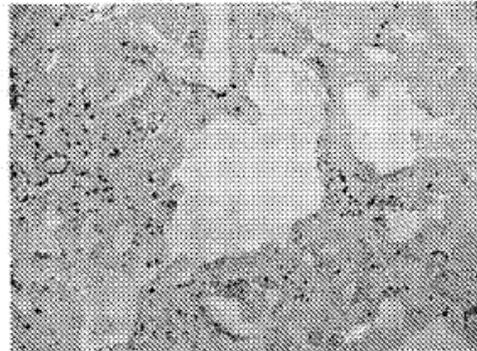
FZD8-Fc

Figura 15

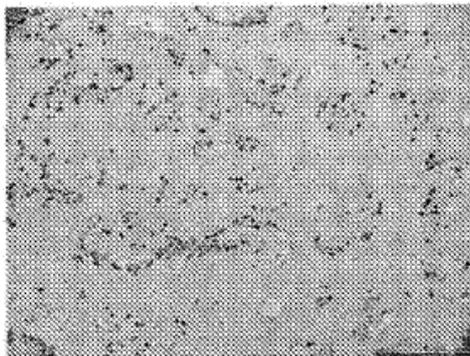
PN21



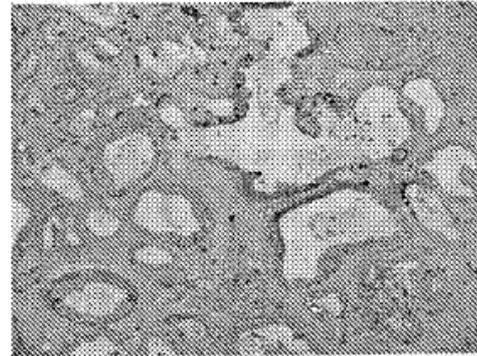
Control mAb



FZD8-Fc



Gemcitabina



FZD8-Fc + Gemcitabina

Figura 16

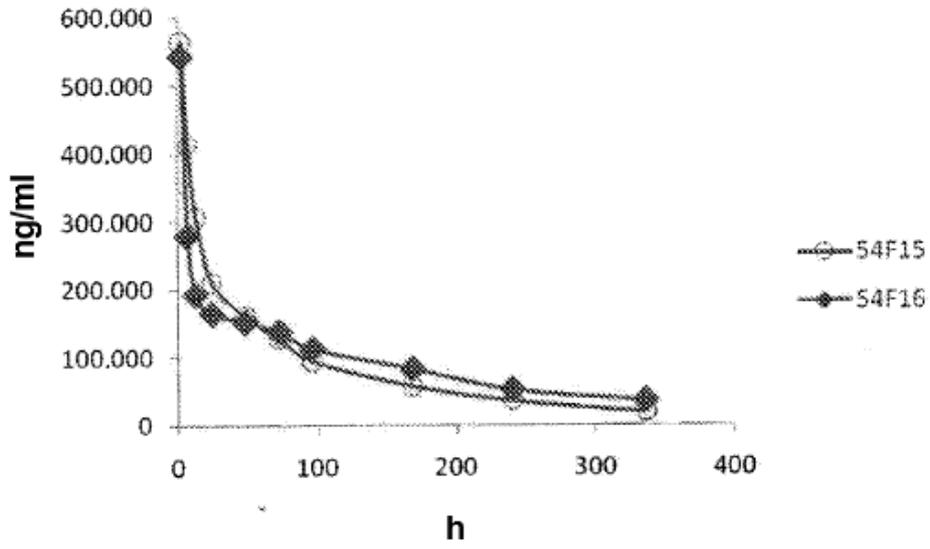


Figura 17

C28

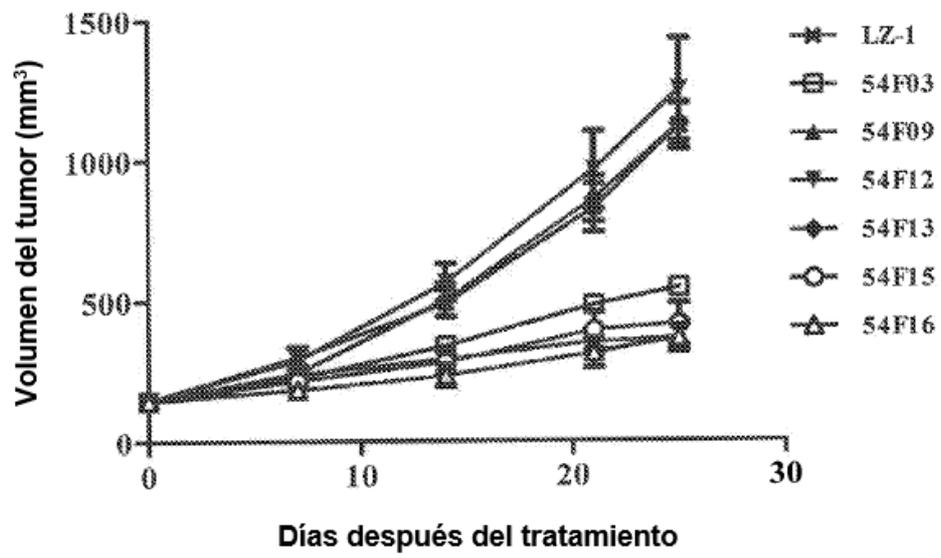


Figura 18

PN4

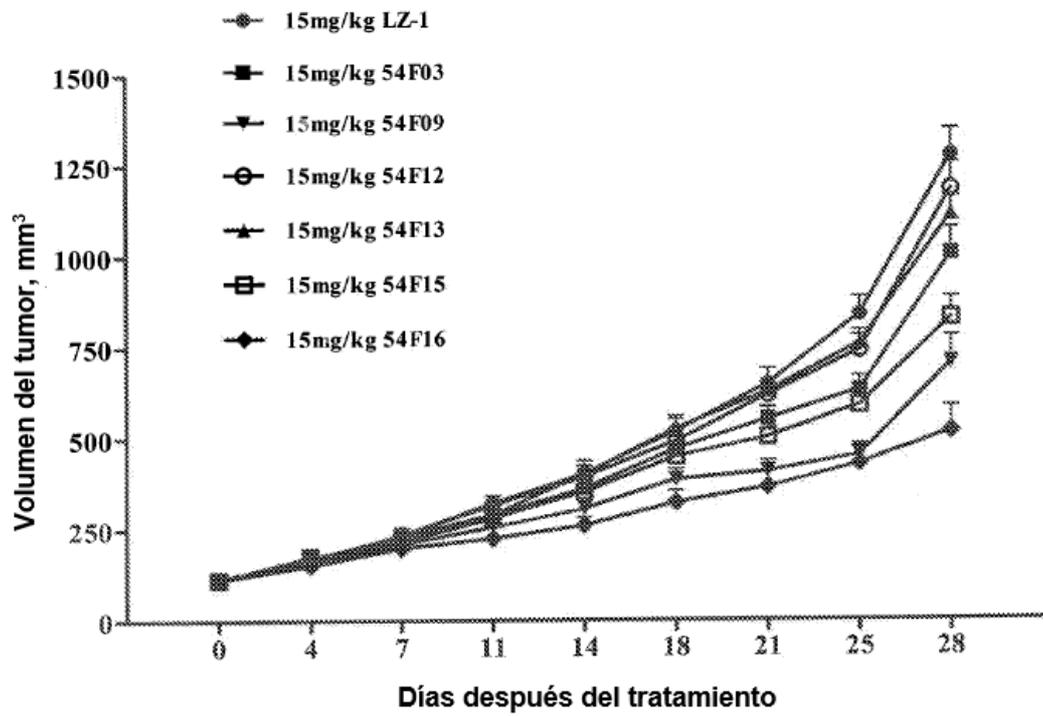


Figura 19

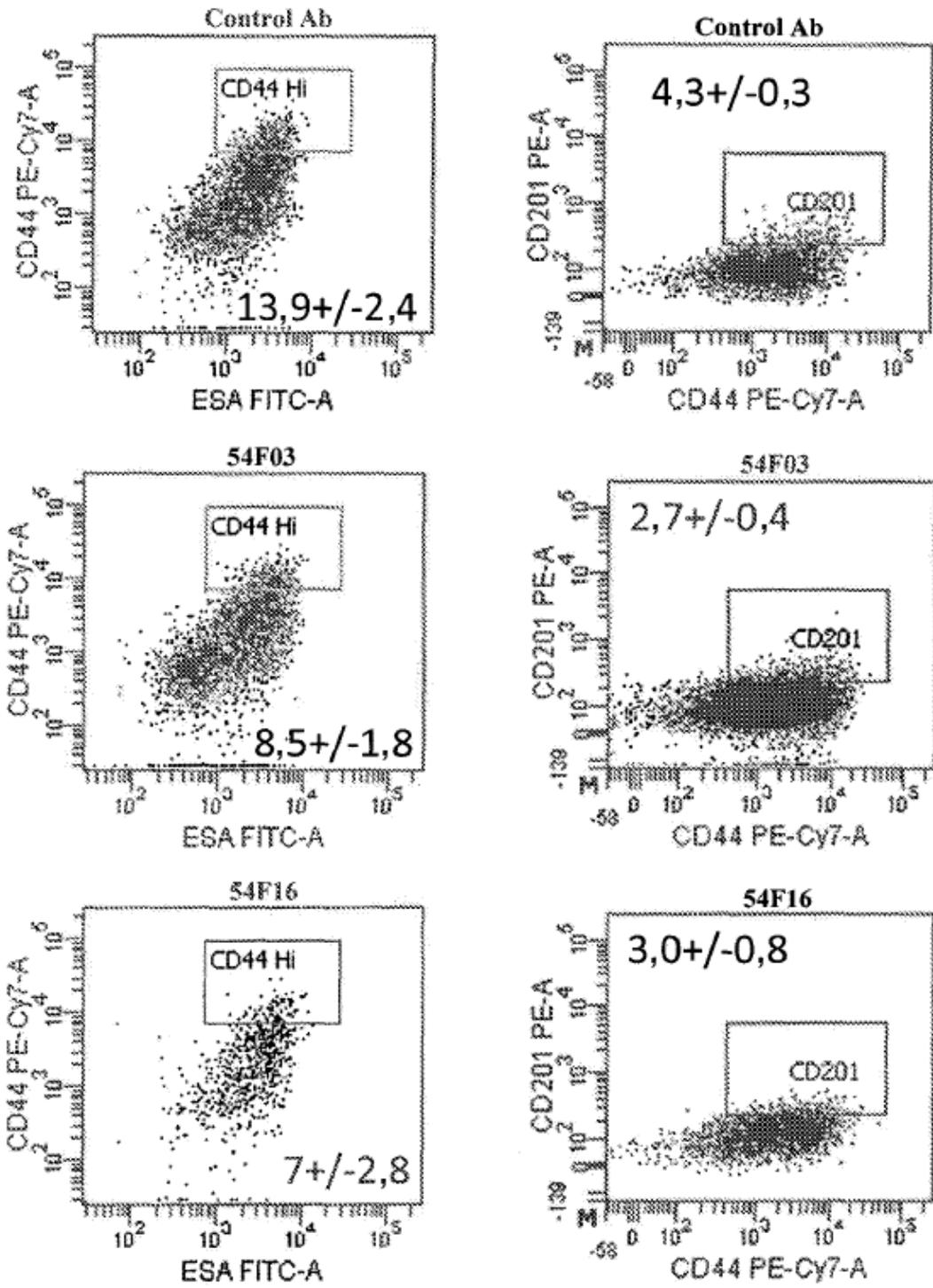


Figura 20

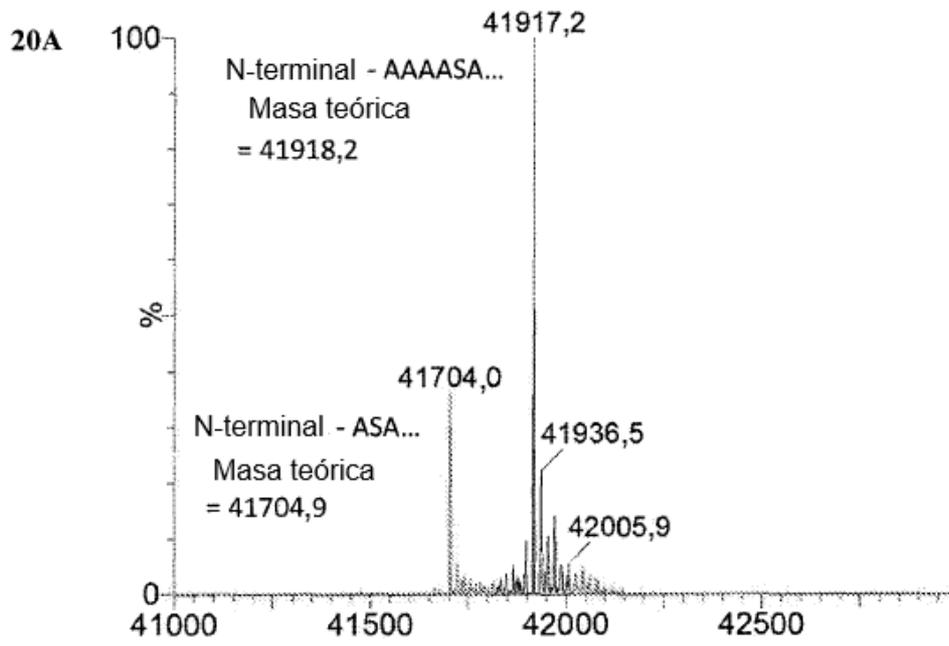


Figura 20

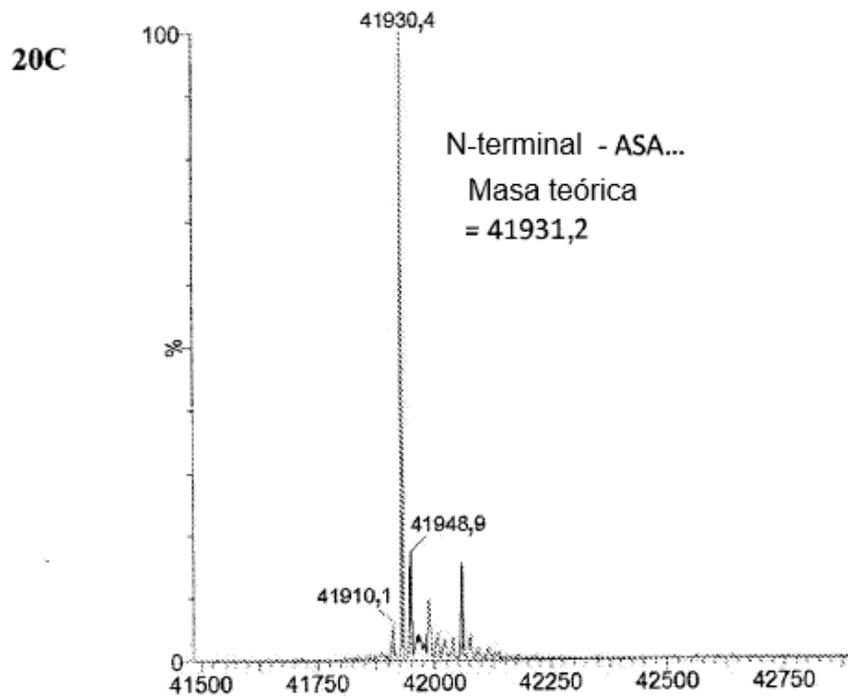
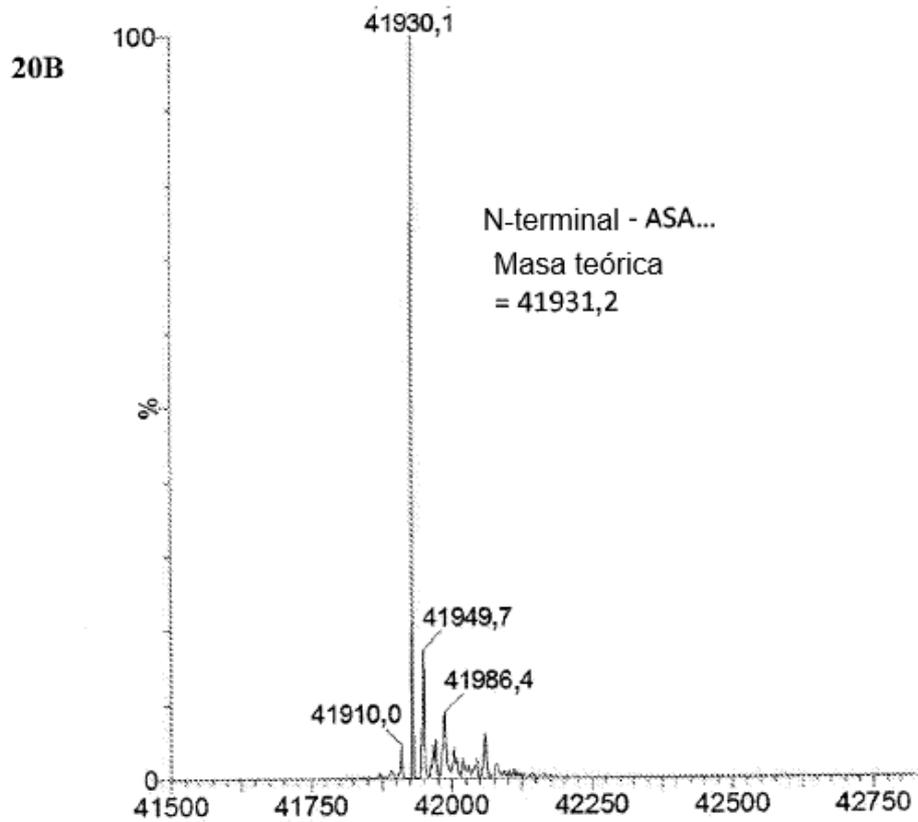


Figura 20

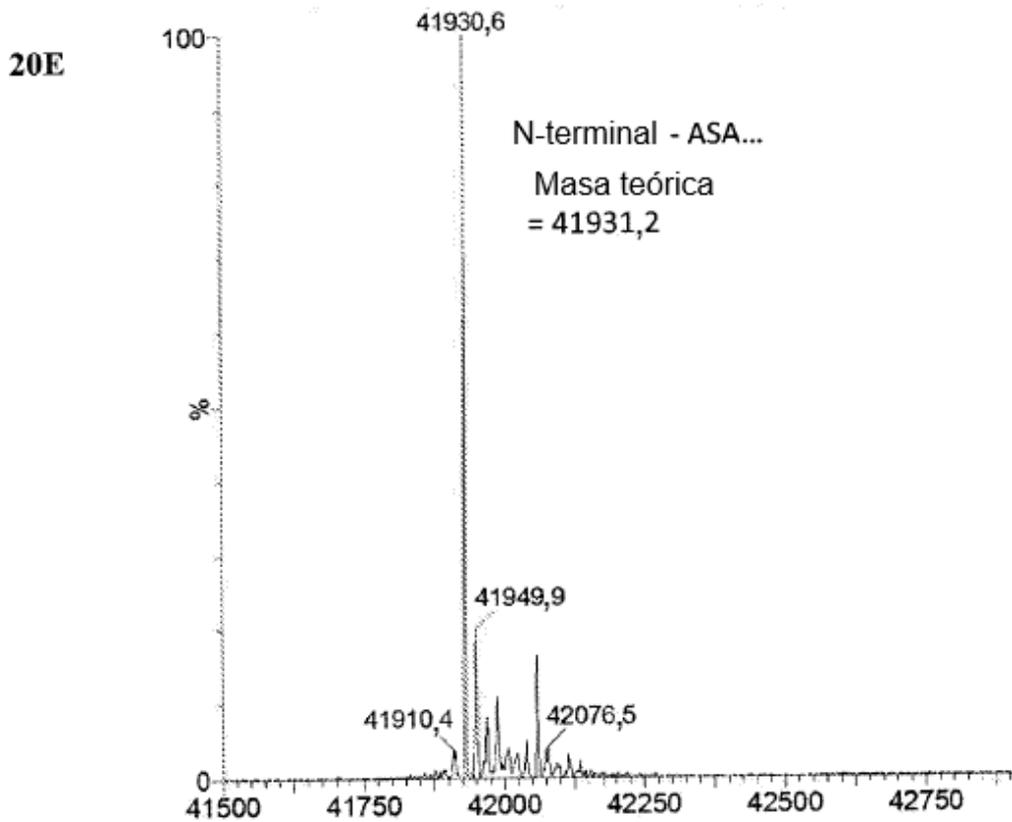
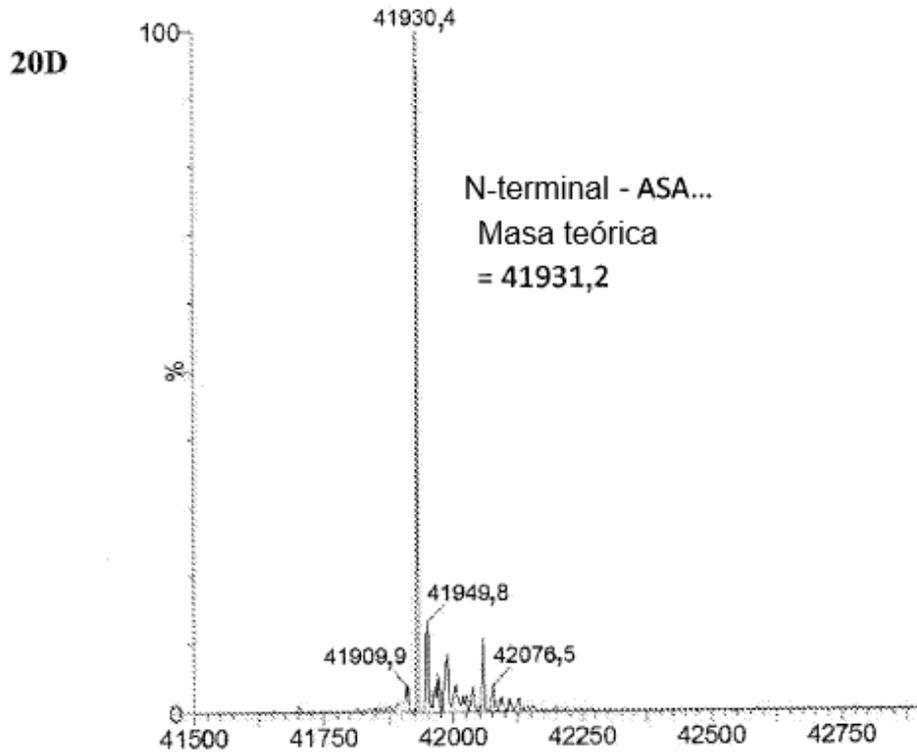


Figura 21

