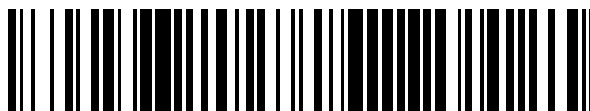


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 087**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2006 E 12154780 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2481756**

54 Título: **Composiciones y métodos para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**31.10.2005 US 731468 P**  
**13.06.2006 US 812966 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.11.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 641 087 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la oncología y proporciona nuevas composiciones y métodos para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. La presente invención proporciona anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer para el estudio, diagnóstico y tratamiento de tumores sólidos.

10

10 **Antecedentes de la invención**

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

15

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

20

25

30

Los métodos actuales de diagnóstico y estadificación del cáncer de mama incluyen el sistema tumor-ganglios-metástasis (TGM) que se basa en el tamaño del tumor, presencia tumoral en ganglios linfáticos y la presencia de metástasis distantes (American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. Filadelfia, Pa.: Lippincott-Raven Publishers, 5ª ed., 1997, pp 171-180; Harris, J R: "Staging of breast carcinoma" en Harris, J. R., Hellman, S., Henderson, I. C., Kinne D. W. (eds.): Breast Diseases. Filadelfia, Lippincott, 1991). Estos parámetros se utilizan para proporcionar un pronóstico y seleccionar la terapia adecuada. La apariencia morfológica del tumor también puede evaluarse pero debido a que los tumores con apariencia histopatológica similar pueden mostrar una variabilidad clínica significativa, esta estrategia tiene serias limitaciones. Finalmente, se pueden utilizar ensayos de marcadores de superficie celular para dividir ciertos tipos de tumores en subclases. Por ejemplo, un factor que se considera en el pronóstico y tratamiento del cáncer de mama es la presencia del receptor estrogénico (ER) ya que los cánceres de mama positivos a ER normalmente responden más fácilmente a terapias hormonales tales como el tamoxifeno o los inhibidores de la aromatasa que los tumores negativos a ER. Con todo, estos análisis, aunque son útiles, solo predicen parcialmente el comportamiento clínico de los tumores de mama y hay una gran diversidad fenotípica presente en los cánceres de mama que las herramientas de diagnóstico actuales no logran detectar y las terapias actuales no logran tratar.

35

40

45

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

50

55

Actualmente la prostatectomía radical y la radioterapia proporcionan un tratamiento curativo para la mayoría de los tumores de próstata localizados. Sin embargo, las opciones terapéuticas están muy limitadas en casos avanzados. Para la enfermedad metastásica, el tratamiento de referencia es la ablación androgénica con un agonista de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) solo o en combinación con anti-andrógenos. Aún a pesar del bloqueo máximo de los andrógenos, la enfermedad casi siempre progresa, desarrollando la mayoría una enfermedad independiente de andrógenos. Actualmente no hay un tratamiento aceptado uniformemente para el cáncer de próstata resistente a hormonas y se utilizan comúnmente regímenes quimioterápicos (Muthuramalingam et al., 2004, Clin. Oncol. 16:505-16; Trojan et al., 2005, Anticancer Res. 25:551-61).

60

65

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

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

El cáncer de pulmón es el cáncer más común en todo el mundo, el tercer cáncer más frecuentemente diagnosticado en los Estados Unidos, y con mucho la causa más frecuente de muertes por cáncer (Spiro et al., 2002, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166:1166-96; Jemal et al., 2003, *CA Cancer J. Clin.* 53:5-26). Se cree que fumar cigarrillos es responsable del 87 % estimado de todos los cánceres de pulmón, lo que la convierte en la enfermedad mortal más prevenible. El cáncer de pulmón se divide en dos tipos principales que suponen más del 90 % de todos los cánceres de pulmón; el cáncer de pulmón microcítico (SCLC) y el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). El SCLC supone el 15-20 % de los casos y se caracteriza por su origen en las vías respiratorias centrales grandes y su composición histológica de capas de células pequeñas con poco citoplasma. El SCLC es más agresivo que el NSCLC, creciendo rápidamente y metastatizando muy pronto. El NSCLC supone el 80-85 % de todos los casos y se divide además en tres subtipos principales que se basan en la histología: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide) y un carcinoma indiferenciado de células grandes.

El cáncer de pulmón se presenta normalmente en una fase tardía de su evolución y por lo tanto la mediana de la supervivencia es de solo 6-12 meses tras el diagnóstico y con una tasa de supervivencia total a los 5 años de solo el 5-10 %. Aunque la cirugía ofrece la mejor oportunidad de cura, solo una pequeña fracción de los pacientes con cáncer de pulmón son elegibles y la mayoría dependen de la quimioterapia y la radioterapia. A pesar de los intentos de manejar el intervalo y la intensidad de dosis en estas terapias, las tasas de supervivencia han aumentado poco en los últimos 15 años (Spiro et al., 2002, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166:1166-96).

Estos cuatro cánceres, así como muchos otros, se presentan como tumores sólidos que se componen de poblaciones heterogéneas de células. Por ejemplo, los cánceres de mama son una mezcla de células cancerosas y células normales, que incluyen células mesenquimales (estroma), células inflamatorias y células endoteliales. Varios modelos de cáncer ofrecen diferentes explicaciones para la presencia de esta heterogeneidad. Un modelo, el modelo clásico de cáncer, sostiene que las poblaciones de células cancerosas fenotípicamente distintas tienen la capacidad de proliferar y dar lugar a un nuevo tumor. En el modelo clásico, la heterogeneidad de las células tumorales es el resultado de factores ambientales, así como de mutaciones en curso dentro de las células cancerosas, dando como resultado una población diversa de células tumorigénicas. Este modelo se basa en la idea de que todas las poblaciones de células tumorales tienen cierto grado de potencial tumorigénico. (Pandis et al., 1998, *Genes, Chromosomes & Cancer* 12:122-129; Kuukasjrvi et al., 1997, *Cancer Res.* 57:1597-1604; Bonsing et al., 1993, *Cancer* 71:382-391; Bonsing et al., 2000, *Genes Chromosomes & Cancer* 82: 173-183; Beerman H et al., 1991, *Cytometry* 12:147-54; Aubele M & Werner M, 1999, *Analyt. Cell. Path.* 19:53; Shen L et al., 2000, *Cancer Res.* 60:3884).

Un modelo alternativo para la heterogeneidad celular observada en los tumores sólidos se basa en el impacto que tienen las células madre sobre el desarrollo del tumor. Según este modelo, el cáncer surge de la desregulación de los mecanismos que controlan el desarrollo y el mantenimiento normales de los tejidos. (Beachy et al., 2004, *Nature* 432: 324). Durante el desarrollo normal del animal, las células de la mayoría o todos los tejidos se derivan de precursores normales, llamadas células madre (Morrison et al., 1997, *Cell* 88:287-98; Morrison et al., 1997, *Curr. Opin. Immunol.* 9:216-21; Morrison et al., 1995, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11:35-71). Las células madre son células que: (1) tienen una capacidad proliferativa extensa; (2) son capaces de división celular asimétrica para generar uno o más tipos de progenie con potencial proliferativo y/o de desarrollo reducido y (3) son capaces de divisiones celulares simétricas para la auto-renovación o auto-mantenimiento. El ejemplo mejor estudiado de renovación de células adultas por diferenciación de las células madre es el sistema hematopoyético en el que los precursores inmaduros del desarrollo (células madre y progenitores hematopoyéticos) responden a señales moleculares para formar los

diferentes tipos de células sanguíneas y linfoides. Otras células, incluidas las células del intestino, el sistema ductal de la mama y la piel, se reponen constantemente a partir de una pequeña población de células madre en cada tejido, y estudios recientes sugieren que la mayoría de los tejidos adultos también albergan células madre, incluido el cerebro. Los tumores derivados de una "célula madre de tumor sólido" (o "célula madre de cáncer" de un tumor sólido) sufren posteriormente un desarrollo caótico a través de rondas simétricas y asimétricas de divisiones celulares. En este modelo de células madre, los tumores sólidos contienen un subconjunto distinto y limitado (posiblemente incluso raro) de células que comparten las propiedades de las "células madre" normales, en el sentido de que proliferan ampliamente y dan lugar eficientemente tanto a otras células madre de tumores sólidos (auto-renovación) como a la mayoría de las células tumorales de un tumor sólido que carecen de potencial tumorigénico. De hecho, las mutaciones dentro de una población de células madre de larga vida pueden iniciar la formación de células madre de cáncer que subyacen al crecimiento y mantenimiento de tumores y cuya presencia contribuye al fracaso de los actuales enfoques terapéuticos.

La naturaleza de las células madre de cáncer se reveló por primera vez en una neoplasia hematológica, la leucemia mieloide aguda (AML) (Lapidot et al., 1994, Nature 17:645-8). Más recientemente se ha demostrado que los tumores de mama humanos malignos albergan de manera similar una población de células madre distinta y pequeña que se enriquece por la capacidad para formar tumores en ratones inmunodeficientes. Se encontró que una población celular ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin- estaba enriquecida 50 veces más en células tumorigénicas en comparación con células tumorales no fraccionadas (Al-Hajj et al., 2003, Proc. Nat'l Acad. Sci. 100:3983-8). La capacidad para aislar prospectivamente las células de cáncer tumorigénicas ha permitido la investigación de vías biológicas críticas, que sustentan la tumorigenicidad en estas células, y por lo tanto promete el desarrollo de ensayos diagnósticos mejores y terapias para pacientes de cáncer. La presente invención se dirige hacia este fin. Se ha demostrado que la señalización de Wnt5a afecta directamente a la motilidad celular y la invasión del melanoma metastásico (Weeraratna et al (2002) Cancer Cell 1 3 279 - 288).

#### Breve resumen de la invención

Un aspecto de la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado según se expone en la reivindicación 1. También se proporciona un método para tratar el cáncer que comprende administrar un anticuerpo de la presente divulgación en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de células tumorales.

Objetivos y ventajas adicionales de la invención se exponen en parte en la descripción que sigue, y en parte serán evidentes a partir de la descripción, o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los objetivos y ventajas de la invención se realizarán y alcanzarán por medio de los elementos y combinaciones particularmente señalados en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son ilustrativas y explicativas solamente y no son restrictivas de la invención, como se reivindica. Los dibujos adjuntos, que se incorporan y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran varias realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención. En la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "uno", "una" y "el", "la" incluyen referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

#### Breve descripción de los dibujos/figuras

Figura 1: Análisis de unión específica de anticuerpos anti-FZD10, anti-FZD7, anti-FZD5, anti-FZD6, anti-FZD4 y anti-FZD8 a sus correspondientes receptores asociados a la membrana. Se incubaron células HEK293 que expresaban FZD10, FZD7, FZD5, FZD6, FZD4 y FZD8 de longitud completa sin (A) o con co-transfección (B, C, D, E y F) de GFP con anticuerpos anti-FZD o IgG de control y se clasifican por FACS. (A) Se muestran análisis de FAC de anticuerpos contra FZD10 en comparación con un control de isotipo de IgG negativo para cada anticuerpo. Una construcción etiquetada con FLAG que coincide con anticuerpos anti-FLAG se muestra como un control positivo (parte inferior). (B) Análisis de FAC de anticuerpos contra FZD7 en células que expresan FZD7 y GFP en comparación con una IgG de control. Una construcción etiquetada con FLAG que coincide con anticuerpos anti-FLAG se muestra como un control positivo (parte inferior, extremo derecho). (C) Análisis de FAC de anticuerpos contra FZD5 en células que expresan FZD5 y GFP en comparación con una IgG de control. El suero de un animal inmunizado con antígeno FZD5 se muestra en la parte inferior, a la derecha. (D) Análisis de FAC de anticuerpos contra FZD6 en células que expresan FZD6 y GFP en comparación con una IgG de control. Una construcción marcada con FLAG que coincide con anticuerpos anti-FLAG se muestra como un control positivo (parte inferior, derecha). (E) Análisis de FAC de anticuerpos contra FZD4 en las células que expresan FZD4 y GFP en comparación con un control de IgG. Una construcción etiquetada con FLAG que coincide con anticuerpos anti-FLAG se muestra como un control positivo (parte inferior, derecha). (F) Análisis FAC de anticuerpos contra FZD8 en células que expresan FZD8 y GFP.

Figura 2: Receptores de FZD Fc solubles que inhiben la señalización Wnt. Se incubaron células HEK 293 transfectadas de forma estable con el indicador 8xTCF-luciferasa con concentraciones crecientes de receptores solubles de FZD Fc en presencia de diferentes ligandos de Wnt, incluyendo Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a y Wnt7b. Las proteínas de fusión FZD4 Fc, FZD5 Fc y FZD8 Fc inhibían la señalización Wnt señalización mediada por los cinco ligandos de Wnt como se muestra por la pérdida de actividad de la luciferasa.

Figura 3: Identificación de anticuerpos anti-FZD5 que interfieren con la unión del ligando de Wnt3a. La

señalización Wnt en células HEK 293 transfectadas con el vector indicador Wnt 8xTCF-luciferasa se midió por la actividad luciferasa en presencia de Wnt3a y treinta y dos anticuerpos diferentes contra FZD5, ya sea solo (barra izquierda) o en presencia de FZD5 Fc soluble (barra derecha). Los anticuerpos que interfieren con la unión entre FZD5 Fc y Wnt3a dan como resultado una activación significativa de la señalización Wnt (barra derecha).

Figura 4: Reducción del crecimiento tumoral por anticuerpos anti-FZD6 y anti-FZD5. El crecimiento tumoral en ratones NOD/SCID inyectados con células tumorales de colon UM-C4 y tratadas con anticuerpos anti-FZD6 o anti-FZD5 se representa en el eje x en mm<sup>3</sup> durante 8 semanas. El tratamiento con anticuerpo anti-FZD6 23M2 (barras blancas) y anticuerpo anti-FZD5 44M13 (barras discontinuas) redujo significativamente el crecimiento tumoral en comparación con los controles inyectados con PBS (barras rellenas).

## Descripción detallada de la invención

El término “anticuerpo” se usa para indicar una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación incluyen anticuerpos antagonistas que se unen específicamente a una proteína marcadora de células madre de cáncer e interfieren con, por ejemplo, la unión al ligando, la dimerización de receptores, la expresión de una proteína marcadora de células madre de cáncer y/o la señalización posterior de una proteína marcadora de células madre de cáncer. En ciertas realizaciones, los anticuerpos divulgados incluyen anticuerpos agonistas que se unen específicamente a una proteína marcadora de células madre de cáncer y promueven, por ejemplo, la unión al ligando, la dimerización del receptor y/o la señalización por una proteína marcadora de células madre de cáncer. En ciertas realizaciones, los anticuerpos divulgados no interfieren ni promueven la actividad biológica de una proteína marcadora de células madre de cáncer, sino que inhiben el crecimiento de tumores, por ejemplo, mediante la internalización de anticuerpos y/o el reconocimiento del sistema inmunitario. Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo” incluye anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv), mutantes Fv (scFv) de cadena sencilla, anticuerpos multispecíficos, tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación del antígeno de un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno siempre y cuando los anticuerpos exhiban la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de los mismos (por ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), basándose en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada referidos como alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades diferentes y bien conocidas y configuraciones tridimensionales. Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas tales como toxinas, radioisótopos, etc.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “fragmento de anticuerpo” se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un “anticuerpo Fv” se refiere al fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión del antígeno, ya sea como dos cadenas, en las que un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera forman un dímero no covalente, (ScFv), en el que un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera están unidos covalentemente por un enlazador peptídico flexible de manera que las dos cadenas se asocien en una estructura dimerica similar. En esta configuración, las regiones de determinación de la complementariedad (CDR) de cada dominio variable interactúan para definir la especificidad de unión al antígeno del dímero de Fv. En otra alternativa, puede usarse un único dominio variable (o la mitad de un Fv) para reconocer y unirse al antígeno, aunque generalmente con menor afinidad.

Un “anticuerpo monoclonal” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una población de anticuerpos homogénea implicada en el reconocimiento y la unión altamente específicos de un solo determinante antigénico o epítipo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales que generalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. La expresión “anticuerpo monoclonal abarca tanto anticuerpos monoclonales intactos como de longitud completa, así como fragmentos de anticuerpo (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), mutantes de cadena sencilla (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Además, “anticuerpo monoclonal” se refiere a tales anticuerpos fabricados en cualquier número de formas incluyendo, pero no se limitan a, hibridoma, selección de fago, expresión recombinante y animales transgénicos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “anticuerpo humanizado” se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son cadenas de inmunoglobulinas específicas, inmunoglobulinas quiméricas o fragmentos de las mismas que contienen secuencias no humanas mínimas. Generalmente, los anticuerpos

humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los restos de la región determinante de la complementariedad (CDR) están reemplazadas por restos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo ratón, rata, conejo, hámster) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región estructural (FR) de Fv de una inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes restos en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. El anticuerpo humanizado puede modificarse adicionalmente mediante la sustitución de restos adicionales en la región estructural de Fv y/o dentro de los restos no humanos sustituidos para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y generalmente dos o tres dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede comprender también al menos una porción de una región o dominio constante (Fc) de inmunoglobulina, generalmente la de una inmunoglobulina humana. Ejemplos de métodos usados para generar anticuerpos humanizados se describen en la patente US-5.225.539.

El término "anticuerpo humano" tal como se utiliza en la presente memoria significa un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un ser humano fabricado usando cualquier técnica conocida en la técnica. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido humano de cadena pesada y/o ligera tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y cadena pesada humana.

Los "anticuerpos híbridos" son moléculas de inmunoglobulina en las que están ensambladas entre sí pares de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos con diferentes regiones determinantes antigénicas de manera que dos epítopos diferentes o dos antígenos diferentes pueden ser reconocidos y unidos por el tetrámero resultante.

La expresión "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Generalmente, la región variable de las cadenas ligera y pesada corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de otro (habitualmente humano) para evitar la inducción de una respuesta inmunitaria en esa especie.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a la porción de un antígeno capaz de ser reconocida y específicamente unida por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítopos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos son generalmente retenidos por desnaturalización de las proteínas, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden generalmente tras la desnaturalización de proteínas. Un epítipo incluye generalmente al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

El hecho de que un anticuerpo "se una selectivamente" o "se una específicamente" significa que el anticuerpo reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad o con alguna combinación de lo anterior a un epítipo que con sustancias alternativas, incluidas las proteínas no relacionadas. "Se une selectivamente" o "se une específicamente" significa, por ejemplo, que un anticuerpo se une a una proteína con una KD de al menos aproximadamente 0,1 mM, pero más habitualmente de al menos aproximadamente 1  $\mu$ M. "Se une selectivamente" o "se une específicamente" significa a veces que un anticuerpo se une a una proteína a veces con una KD de al menos aproximadamente 0,1  $\mu$ M o mejor y otras veces al menos aproximadamente 0,01  $\mu$ M o mejor. Debido a la identidad de secuencia entre proteínas homólogas en diferentes especies, la unión específica puede incluir un anticuerpo que reconoce una proteína marcadora de células madre de cáncer en más de una especie.

Como se usa en la presente memoria, las expresiones "unión no específica" y "unión de fondo" cuando se usan en referencia a la interacción de un anticuerpo y una proteína o péptido se refieren a una interacción que no depende de la presencia de una estructura particular (es decir, el anticuerpo se une a proteínas en general en lugar de a una estructura particular tal como un epítipo).

Los términos "aislado" o "purificado" se refieren a un material que está esencialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad se determinan generalmente usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) o ácido nucleico de la presente divulgación que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un ácido nucleico aislado se separa de marcos de lectura abiertos que flanquean naturalmente el gen y codifican proteínas distintas de la proteína codificada por el gen. Un anticuerpo aislado se separa de otras proteínas no inmunoglobulinas y de otras proteínas de inmunoglobulina con diferente especificidad de unión al antígeno.

También puede significar que el ácido nucleico o la proteína está en algunas realizaciones con una pureza de al menos 80 %, en algunas realizaciones con una pureza de al menos 85 %, en algunas realizaciones con una pureza de al menos 90 %, en algunas realizaciones con una pureza de al menos 95 % y en algunas realizaciones con una pureza de al menos 99 %.

5 Como se usa en la presente memoria, 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 no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más  
10 particulares de tales 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 de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cánceres de cabeza y cuello.

15 Las expresiones “trastorno proliferativo” y “enfermedad proliferativa” se refieren a trastornos asociados con proliferación celular anormal como el cáncer.

20 “Tumor” y “neoplasia”, tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a cualquier masa de tejido que resulte del crecimiento o proliferación excesiva de células, benignas (no cancerosas) o malignas (cancerosas) incluyendo lesiones precancerosas.

25 “Metástasis” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al proceso mediante el cual un cáncer se propaga o se transfiere desde el lugar de origen a otras regiones del cuerpo con el desarrollo de una lesión cancerosa similar en la nueva localización. Una célula “metastásica” o “metastatizante” es aquella que pierde contactos adhesivos con las células vecinas y migra a través del torrente sanguíneo o linfa desde el sitio primario de la enfermedad para invadir las estructuras corporales vecinas.

30 Las expresiones “células madre de cáncer”, “células madre de tumores” o “células madre de tumores sólidos” se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a una población de células de un tumor sólido que: (1) tienen una capacidad proliferativa extensa; 2) son capaces de división celular asimétrica para generar uno o más tipos de progenie diferenciada con potencial proliferativo o de desarrollo reducido; y (3) son capaces de divisiones celulares simétricas para auto-renovación o auto-mantenimiento. Estas propiedades de las “células madre de  
35 cáncer”, “células madre de tumores” o “células madre de tumores sólidos” confieren a las células madre de cáncer la capacidad de formar tumores palpables tras el trasplante en serie en un ratón inmunocomprometido en comparación con la mayoría de las células tumorales que no forman tumores. Las células madre de cáncer se someten a la auto-renovación frente a la diferenciación de manera caótica para formar tumores con tipos de células anormales que pueden cambiar con el tiempo a medida que se producen las mutaciones. Las células madre de tumores sólidos difieren de la “línea madre de cáncer” proporcionada por la patente US-6.004.528. En esta patente, la “línea madre  
40 de cáncer” se define como un tipo de células progenitoras de crecimiento lento que tiene pocas mutaciones pero que experimenta divisiones celulares simétricas en lugar de asimétricas como resultado de cambios tumorigénicos que se producen en el entorno de la célula. Esta hipótesis de la “línea madre de cáncer” propone por tanto que las células tumorales altamente mutadas y de rápida proliferación surgen en gran medida como resultado de un entorno anormal, que hace que las células madre relativamente normales se acumulen y luego sufran mutaciones que las  
45 convierten en células tumorales. La patente US-6.004.528 propone que dicho modelo pueda utilizarse para mejorar el diagnóstico de cáncer. El modelo de células madre de tumores sólidos es fundamentalmente diferente del modelo de “línea madre de cáncer” y, por consiguiente, exhibe utilidades no ofrecidas por el modelo de “línea madre de cáncer”. En primer lugar, las células madre de tumores sólidos no se “salvan mutacionalmente”. La “línea madre de cáncer que no sufre mutaciones” descrita por la patente US-6.004.528 puede considerarse una lesión precancerosa, mientras que las células madre de tumores sólidos son células cancerosas que pueden contener ellas mismas las mutaciones que son responsables de la tumorigénesis que comienza en la etapa precancerosa, y que prosigue hasta las etapas posteriores del cáncer. Es decir, las células madre de tumores sólidos (“células madre de cáncer”) se incluirían entre las células altamente mutadas que se distinguen de la “línea madre de cáncer” en la patente US-  
50 6.004.528. En segundo lugar, las mutaciones genéticas que conducen al cáncer pueden ser en gran medida intrínsecas dentro de las células madre del tumor sólido, así como ser ambientales. El modelo de células madre de tumores sólidos predice que las células madre de tumores sólidos aislados pueden dar lugar a tumores adicionales tras el trasplante (lo que explica la metástasis), mientras que el modelo de “línea madre de cáncer” predeciría que las células de la “línea madre de cáncer” trasplantadas no podrían dar lugar a un nuevo tumor, ya que era su entorno anormal el que era tumorigénico. De hecho, la capacidad de trasplantar células madre de tumores sólidos humanos disociadas del trasplante y fenotípicamente aisladas a ratones (en un entorno que es muy diferente del entorno normal del tumor) donde todavía forman nuevos tumores distingue la presente divulgación del modelo de “línea madre de cáncer”. En tercer lugar, las células madre de tumores sólidos se dividen tanto simétricamente como asimétricamente, de tal manera que la división celular simétrica no es una propiedad obligada. En cuarto lugar, las células madre de tumores sólidos pueden dividirse rápida o lentamente, dependiendo de muchas variables, de tal  
60 manera que una tasa de proliferación lenta no es una característica definitoria.  
65

Las expresiones “célula cancerosa”, “célula tumoral” y equivalentes gramaticales se refieren a la población total de células derivadas de un tumor o de una lesión precancerosa que incluye tanto células no tumorigénicas, que comprenden la mayor parte de la población de células tumorales y células madre tumorigénicas (células madre de cáncer).

5 Como se usa en la presente memoria, “tumorigénico” se refiere a las características funcionales de una célula madre del tumor sólido que incluye las propiedades de auto-renovación (dando lugar a células madre de cáncer tumorigénicas adicionales) y proliferación para generar todas las demás células tumorales (dando lugar a células diferenciadas y, por tanto, células tumorales no tumorigénicas) que permiten que las células madre del tumor sólido formen un tumor. Estas propiedades de auto-renovación y proliferación para generar todas las demás células tumorales confieren a las células madre de cáncer de esta divulgación la capacidad de formar tumores palpables tras el trasplante en serie en un ratón inmunocomprometido en comparación con la mayoría de las células tumorales que son incapaces de formar tumores. Las células tumorales, es decir, las células tumorales no tumorigénicas, pueden formar un tumor tras el trasplante en un ratón inmunocomprometido un número limitado de veces (por ejemplo, una o dos veces) después de obtener las células tumorales de un tumor sólido.

20 Como se usa en la presente memoria, las expresiones “marcador(es) canceroso(s) de células madre”, “marcador(es) de células madre de cáncer”, “marcador(es) de células madre de tumores” o “marcador(es) de células madre de tumores sólidos” se refieren a un gen o genes o una proteína, polipéptido o péptido expresados por el gen o genes cuyo nivel de expresión, solo o en combinación con otros genes, está correlacionado con la presencia de células cancerosas tumorigénicas en comparación con células no tumorigénicas. La correlación puede relacionarse con una expresión aumentada o disminuida del gen (por ejemplo, niveles aumentados o disminuidos de ARNm o del péptido codificado por el gen).

25 Como se usa en la presente memoria, los términos “células tumorales no fraccionadas”, “células tumorales preclasificadas”, “masa de células tumorales” y sus equivalentes gramaticales se usan indistintamente para referirse a una población de células tumorales aislada de una muestra de paciente (por ejemplo, de una biopsia tumoral o derrame pleural) que no ha sido segregada, o fraccionada, basándose en la expresión del marcador de superficie celular.

30 Como se usan en la presente memoria, las expresiones “células tumorales no ESA+CD44+”, “no ESA+44+”, “células tumorales no tumorigénicas clasificadas”, “células tumorales no tumorigénicas”, “células no madre” “células tumorales” y sus equivalentes gramaticales se usan indistintamente para referirse a una población tumoral a partir de la cual se han segregado o separado las células madre de cáncer de esta divulgación, basándose en la expresión del marcador de superficie celular.

40 Como se usa en la presente memoria, el término “biopsia” o la expresión “tejido de biopsia” se refieren a una muestra de tejido o fluido que se extrae de un sujeto con el propósito de determinar si la muestra contiene tejido canceroso. En algunas realizaciones, se obtiene tejido o fluido de biopsia debido a que se sospecha que un sujeto tiene cáncer y después se examina el tejido o fluido de biopsia para detectar la presencia o ausencia de cáncer.

45 Como se usa en la presente memoria, el término “sujeto” se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, pero sin limitarse a, seres humanos, primates no humanos, roedores y similares, que es el receptor de un tratamiento particular. Generalmente, los términos “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente en la presente memoria en referencia a un sujeto humano.

50 “Farmacéuticamente aceptable” se refiere a aprobado o aprobable por un organismo regulador del gobierno Federal o de un estado o incluido en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, incluyendo seres humanos.

“Sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a una sal de un compuesto que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original.

55 “Excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable” se refiere a un excipiente, vehículo o adyuvante que se puede administrar a un sujeto, junto con al menos un anticuerpo de la presente divulgación, y que no destruye su actividad farmacológica y no es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para proporcionar una cantidad terapéutica del compuesto.

60 “Vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra al menos un anticuerpo de la presente divulgación.

“Profármaco” se refiere a un derivado de un compuesto terapéuticamente eficaz que requiere una transformación dentro del cuerpo para producir el compuesto terapéuticamente eficaz. Los profármacos pueden ser farmacológicamente inactivos hasta convertirse en el compuesto original terapéuticamente eficaz.

65 La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido,



5 polinucleótido, molécula orgánica pequeña u otro fármaco eficaz para “tratar” una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir o detener la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos incluyendo, por ejemplo, la propagación del cáncer en tejido blando y hueso; inhibir y detener la metástasis tumoral; inhibir y detener el crecimiento tumoral; aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer, reducir la morbilidad y la mortalidad; mejorar la calidad de vida o una combinación de tales efectos. En la medida en que el fármaco impide el crecimiento y/o elimina células cancerosas existentes, puede denominarse citostático y/o citotóxico.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, “proporcionar un diagnóstico” o “información diagnóstica” se refiere a cualquier información que sea útil para determinar si un paciente tiene una enfermedad o afección y/o clasificar la enfermedad o afección en una categoría fenotípica o en cualquier categoría que tenga importancia en cuanto al pronóstico o a la probable respuesta al tratamiento (ya sea tratamiento en general o cualquier tratamiento particular) de la enfermedad o afección. Del mismo modo, el diagnóstico se refiere a proporcionar cualquier tipo de información diagnóstica, incluyendo, pero sin limitarse a, si es probable que un sujeto tenga una afección (tal como un tumor), información relacionada con la naturaleza o clasificación de un tumor como por ejemplo un tumor de alto riesgo o un tumor de bajo riesgo, información relacionada con el pronóstico y/o información útil para seleccionar un tratamiento apropiado. La selección del tratamiento puede incluir la elección de un agente quimioterapéutico particular u otra modalidad de tratamiento tal como cirugía o radiación o una elección acerca de si suspender temporalmente o administrar la terapia.

25 Como se usa en la presente memoria, las expresiones “proporcionar un pronóstico”, “información pronóstica” o “información predictiva” se refieren a proporcionar información relativa al impacto de la presencia de cáncer (por ejemplo, como se determina por los métodos de diagnóstico de la presente divulgación) en la salud futura de un sujeto (por ejemplo, morbilidad o mortalidad esperada, probabilidad de contraer cáncer y riesgo de metástasis).

30 Los términos como “tratar” o “tratamiento” o “para tratar” o “aliviar” o “para aliviar” se refieren tanto a 1) medidas terapéuticas que curan, retardan, disminuyen los síntomas y/o frenan la progresión de una afección patológica diagnosticada como a 2) medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o retardan el desarrollo de una afección o trastorno patológico específico. Así, aquellos que necesitan tratamiento incluyen a aquellos que ya están con el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno y aquellos en los que se debe prevenir el trastorno. Un sujeto es “tratado” con éxito de acuerdo con los métodos de la presente divulgación si el paciente muestra uno o más de los siguientes: una reducción en el número o ausencia completa de células cancerosas; una reducción en el tamaño del tumor; la inhibición o ausencia de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, incluyendo, por ejemplo, la diseminación de cáncer en tejido blando y hueso; la inhibición o ausencia de metástasis tumoral; la inhibición o ausencia de crecimiento tumoral; el alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; la reducción de la morbilidad y la mortalidad; la mejora de la calidad de vida; o alguna combinación de efectos.

40 Tal como se usa en la presente memoria, los términos “polinucleótido” o “ácido nucleico” se refieren a un polímero compuesto por una multiplicidad de unidades de nucleótidos (ribonucleótido o desoxirribonucleótido o variantes estructurales relacionadas) enlazadas por enlaces fosfodiéster, incluyendo, pero sin limitarse a, ADN o ARN. El término abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN. El término “gen” se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido, precursor o ARN (por ejemplo, ARNr, ARNt). El polipéptido puede codificarse mediante una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia codificante siempre y cuando se conserve la actividad o propiedades funcionales deseadas (por ejemplo, actividad enzimática, unión al ligando, transducción de la señal, inmunogenicidad, etc.) de la longitud total o del fragmento. El término también abarca la región codificante de un gen estructural y las secuencias situadas adyacentes a la región codificante en ambos extremos 5' y 3' durante una distancia de aproximadamente 1 kb o más en cualquier extremo de tal manera que el gen corresponde a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias localizadas en 5' de la región codificante y presentes en el ARNm se denominan secuencias 5' no traducidas. Las secuencias situadas en 3' o en dirección 3' de la región codificante y presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. El término “gen” abarca tanto ADNc como formas genómicas de un gen. Una forma genómica o un clon de un gen contiene la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes denominadas “intrones” o “regiones intermedias” o “secuencias intervinientes”. Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en ARN nuclear (ARNhn), los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se eliminan o se “cortan y empalman” del transcrito nuclear o primario; los intrones por lo tanto, están ausentes en el transcrito del ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia o el orden de los aminoácidos en un polipéptido nascente. Además de contener intrones, las formas genómicas de un gen también pueden incluir secuencias situadas en el extremo 5' y 3' de las secuencias que están presentes en el transcrito de ARN. Estas secuencias se denominan secuencias o regiones “flanqueantes” (estas secuencias flanqueantes están localizadas en 5' o 3' respecto a las secuencias no traducidas presentes en el transcrito de ARNm). La región flanqueante en 5' puede contener secuencias reguladoras tales como promotores y potenciadores que controlan o influyen en la transcripción del gen. La región flanqueante 3' puede contener secuencias que dirigen la terminación de la transcripción, la escisión post-transcripcional y la poliadenilación.

- El término “recombinante” cuando se usa con referencia a una célula, ácido nucleico, proteína o vector indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector ha sido modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogos, la alteración de un ácido nucleico o proteína nativos, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que están sobreexpresados o expresados anormalmente de otro modo, tales como, por ejemplo, expresados como fragmentos no naturales o variantes de corte y empalme. Por el término “ácido nucleico recombinante” se entiende en la presente memoria ácido nucleico, formado originalmente in vitro, en general, mediante la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, usando polimerasas y endonucleasas, en una forma que no se encuentra normalmente en la naturaleza. De esta manera, se logra una unión operativa de diferentes secuencias. Así, un ácido nucleico aislado, en forma lineal, o un vector de expresión formado in vitro por ligación de moléculas de ADN que normalmente no están unidas, se consideran ambos recombinantes para los propósitos de esta divulgación. Se entiende que una vez que se produce un ácido nucleico recombinante y se introduce en una célula u organismo hospedador, éste se replicará de forma no recombinante, es decir, utilizando la maquinaria celular in vivo de la célula hospedadora en lugar de manipulaciones in vitro; sin embargo, dichos ácidos nucleicos, una vez producidos de forma recombinante, aunque posteriormente se replican de forma no recombinante, todavía se consideran recombinantes para los propósitos de la divulgación. De manera similar, una “proteína recombinante” es una proteína fabricada usando técnicas recombinantes, es decir, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante como se ha descrito anteriormente.
- Como se usa en la presente memoria, la expresión “gen heterólogo” se refiere a un gen que no está en su entorno natural. Por ejemplo, un gen heterólogo incluye un gen de una especie introducida en otra especie. Un gen heterólogo también incluye un gen nativo de un organismo que ha sido alterado de alguna manera (por ejemplo, mutado, añadido en múltiples copias, enlazado a secuencias reguladoras no nativas, etc.). Los genes heterólogos se distinguen de los genes endógenos en que las secuencias génicas heterólogas se unen generalmente a secuencias de ADN que no se encuentran naturalmente asociadas con las secuencias génicas en el cromosoma o se asocian con porciones del cromosoma no existentes en la naturaleza (por ejemplo, los genes expresados en loci donde el gen no se expresa normalmente).
- Como se usa en la presente memoria, el término “vector” se usa en referencia a moléculas de ácido nucleico que transfieren segmento(s) de ADN de una célula a otra. El término “vehículo” se utiliza a veces indistintamente con “vector”. Los vectores a menudo se derivan de plásmidos, bacteriófagos o virus de plantas o animales.
- “Ligación” se refiere al proceso de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico bicatenarios. A menos que se disponga lo contrario, la ligación se puede llevar a cabo usando tampones y condiciones conocidos con 10 unidades de ADN ligasa de T4 (“ligasa”) por 0,5 µg de cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN a ligar. La ligación de ácido nucleico puede servir para enlazar dos proteínas juntas en el marco de lectura para producir una sola proteína o proteína de fusión.
- Como se usa en la presente memoria, la expresión “expresión génica” se refiere al proceso de conversión de la información genética codificada en un gen en ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt o ARNs) a través de la “transcripción” del gen (por ejemplo, mediante la acción enzimática de una ARN polimerasa) y para los genes que codifican la proteína, en la proteína mediante la “traducción” de ARNm. La expresión génica puede ser regulada en muchas etapas del proceso. La “regulación al alza” o “activación” se refiere a la regulación que aumenta la producción de productos de expresión génica (por ejemplo, ARN o proteína), mientras que la “regulación a la baja” o “represión” se refiere a la regulación que disminuye la producción. Las moléculas (por ejemplo, factores de transcripción) que están implicadas en la regulación al alza o la regulación a la baja se denominan a menudo “activadores” y “represores”, respectivamente.
- Los términos “polipéptido”, “péptido”, “proteína” y “fragmento de proteína” se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un imitador químico artificial del correspondiente aminoácido de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos naturales y polímeros de aminoácidos no naturales.
- El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos e imitadores de aminoácidos que funcionan de forma similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y o-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, por ejemplo, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Los imitadores de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de forma similar a un aminoácido natural.
- “Variantes modificadas conservativamente” se aplica tanto a las secuencias de aminoácidos como de ácido nucleico.

“Variantes de aminoácidos” se refiere a secuencias de aminoácidos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes conservativamente modificadas se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas o asociadas (por ejemplo, contiguas en la naturaleza).

5 Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican la mayoría de las proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos ellos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina está especificada por un codón, el codón puede ser alterado a otro de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas conservativamente. Todas las secuencias de ácidos nucleicos de la presente memoria que codifican un polipéptido también describen variaciones silenciosas del ácido nucleico. Un experto reconocerá que en ciertos contextos cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que habitualmente es el único codón para metionina, y TGG, que habitualmente es el único codón para triptófano) puede ser modificado para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, las variaciones silenciosas de un ácido nucleico que codifica un polipéptido están implícitas en una secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias de sonda reales. En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que alteran, añaden o eliminan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una “variante modificada conservativamente” incluyendo donde la alteración da lugar a la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes conservativamente modificadas son además y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecie y alelos de la divulgación. Generalmente, las sustituciones conservadoras incluyen: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

La expresión “epítipo etiquetado” como se usa en la presente memoria se refiere a un polipéptido quimérico que comprende una proteína marcadora de células madre de cáncer o una secuencia de dominio o parte de la misma, fusionada a una “etiqueta de epítipo”. El polipéptido de etiqueta de epítipo comprende suficientes restos de aminoácidos para proporcionar un epítipo para el reconocimiento por un anticuerpo, pero es suficientemente corto para que no interfiera con la actividad de la proteína marcadora de células madre de cáncer. Las etiquetas de epítipo adecuadas generalmente tienen al menos seis restos de aminoácidos, habitualmente entre aproximadamente 8 a aproximadamente 50 restos de aminoácidos, y a veces entre aproximadamente 10 a aproximadamente 20 restos. Las etiquetas de epítipo comúnmente usadas incluyen etiquetas Fc, HA, His y FLAG.

Se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a un dominio extracelular de un receptor FZD8 humano e inhibe el crecimiento de células tumorales. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano.

También se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a un dominio extracelular de dos o más receptores FZD humanos e inhibe el crecimiento de células tumorales. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular de FZD2 y FZD6 humanos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular de FZD7 y FZD10 humanos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular de FZD4 y FZD5 humanos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular de FZD4 y FZD8 humanos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular de FZD5 y FZD8 humanos. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano.

También se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente al dominio extracelular de tres o más receptores FZD humanos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular de FZD4, FZD5 y FZD8 humanos. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se proporciona un hibridoma que produce un anticuerpo de la presente divulgación.

También se proporciona un método de tratamiento del cáncer que comprende administrar un anticuerpo o una composición farmacéutica de la presente divulgación en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de células tumorales. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un resto citotóxico. En ciertas realizaciones, el

método comprende además administrar al menos un agente terapéutico adicional apropiado para efectuar la terapia de combinación. En ciertas realizaciones, las células tumorales se eligen entre un tumor de mama, un tumor colorrectal, un tumor de pulmón, un tumor de próstata, un tumor pancreático y un tumor de cabeza y cuello.

5 Al igual que los tejidos en los que se originan, los tumores sólidos consisten en una población heterogénea de células. El hecho de que la mayoría de estas células carezcan de tumorigenicidad sugiere que el desarrollo y mantenimiento de los tumores sólidos también depende de una pequeña población de células madre (es decir, células cancerosas tumorigénicas) con la capacidad de proliferar y dar lugar eficientemente a otras células madre tumorales (auto-renovación) y a la mayoría de las células tumorales más diferenciadas que carecen de potencial tumorigénico (es decir, células cancerosas no tumorigénicas). El concepto de células madre de cáncer se presentó por primera vez poco después del descubrimiento de HSC y se estableció experimentalmente en la leucemia mielógena aguda (AML) (Park et al., 1971, J. Natl. Cancer Inst. 46:411-22; Lapidot et al., 1994, Nature 367:645-8; Bonnet & Dick, 1997, Nat. Med. 3:730-7; Hope et al., 2004, Nat. Immunol. 5:738-43). Las células madre de tumores sólidos se han aislado más recientemente basándose en su expresión de un patrón único de receptores de la superficie celular y en la evaluación de sus propiedades de auto-renovación y proliferación en cultivo y en modelos animales de xenoinjerto. Se descubrió una población ESA+ CD44+ CD24-/bajo Linaje- más de 50 veces enriquecida para la capacidad de formar tumores con respecto a las células tumorales no fraccionadas (Al-Hajj et al., 2003, Proc. Nat'l. Acad. Sci. 100: 3983-8). La capacidad de aislar células madre de cáncer tumorigénicas del grueso de células tumorales no tumorigénicas ha conducido a la identificación de marcadores de células madre de cáncer, genes con expresión diferencial en células madre de cáncer en comparación con células tumorales no tumorigénicas o epitelio normal de mama utilizando análisis de micromatrices. La presente divulgación emplea el conocimiento de estos marcadores de células madre de cáncer identificados para diagnosticar y tratar el cáncer.

Los marcadores de células madre de cáncer de la presente divulgación se refieren a un receptor FZD humano, incluyendo, por ejemplo, FZD4, FZD5 y FZD8 humanos como marcadores de células madre de cáncer, que implican la vía de señalización Wnt en el mantenimiento de células madre de cáncer y como diana para tratar el cáncer mediante la eliminación de estas células tumorigénicas. La vía de señalización Wnt es uno de varios reguladores críticos de la formación de patrones embrionarios, el mantenimiento de tejidos post-embrionarios y la biología de células madre. Más específicamente, la señalización Wnt juega un papel importante en la generación de polaridad celular y la especificación del destino celular, incluyendo la auto-renovación por las poblaciones de células madre. La activación no regulada de la vía Wnt se asocia con numerosos cánceres humanos en los que se puede alterar el destino del desarrollo de las células tumorales para mantenerlas en un estado indiferenciado y proliferativo. Por lo tanto, la carcinogénesis puede proceder usurpando mecanismos homeostáticos que controlan el desarrollo normal y la reparación tisular por células madre (revisado en Reya & Clevers, 2005, Nature 434: 843; Beachy et al., 2004, Nature 432:324).

La vía de señalización Wnt se dilucidó por primera vez en el mutante de desarrollo de *Drosophila* sin alas (*wg*) y en el proto-oncogén murino *int-1*, ahora *Wnt1* (Nusse & Varmus, 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 glucoproteínas modificadas con lípidos secretados de las que se han identificado 19 en mamíferos. Estos ligandos secretados activan un complejo de receptor que consiste en un miembro de la familia de receptores Frizzled (Fzd) y una proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 5 o 6 (LPR5/6). Los receptores Fzd tienen siete proteínas de dominio transmembrana de la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G (GPCR) y contienen un gran dominio del extremo N extracelular de unión al ligando con 10 cisteínas conservadas, conocido como dominio rico en cisteína (CRD) o dominio Fri. Hay diez receptores FZD humanos; FZD 1:10. Los diferentes CRD Fzd tienen diferentes afinidades de unión para Wnt específicos (Wu & Nusse, 2002, J. Biol. Chem. 277:41762-9), y los receptores Fzd se han agrupado en los que activan la vía de la  $\beta$ -catenina canónica y los que activan las vías no-canónicas descritas posteriormente (Miller et al., 1999, Oncogene 18:7860-72). Para formar el complejo de receptor que une los ligandos de FZD, los receptores FZD interactúan con LRP5/6, proteínas de paso transmembrana únicas con cuatro dominios tipo EGF extracelulares separadas por seis repeticiones de aminoácidos YWTD (Johnson et al., 2004, J. Bone Mineral Res. 19:1749).

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

Además de la vía de señalización canónica, los ligandos de Wnt también se activan vías independientes de la  $\beta$ -catenina (Veeman et al., 2003, Dev. Cell 5:367-77). La señalización Wnt no canónica se ha implicado en numerosos procesos pero el más convincente es en los movimientos de gastrulación por medio de un mecanismo similar a la vía de polaridad celular plana de *Drosophila* (PCP). Otros mecanismos potenciales de señalización Wnt no canónica

- incluyen el flujo de calcio, JNK, y las proteínas G pequeñas y heterotriméricas. A menudo se observa antagonismo entre las vías canónicas y no canónicas, y algunas pruebas indican que 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). Así, en ciertos contextos, los receptores Fzd actúan como reguladores negativos de la vía de señalización Wnt canónica. Por ejemplo, FZD6 reprime la señalización canónica inducida por Wnt-3a cuando se coexpresa con FZD1 a través de la vía TAK1-NLK (Golan et al., 2004, JBC 279:14879-88). De forma similar, Fzd2 antagonizó la señalización canónica Wnt en presencia de Wnt-5a a través de la cascada TAK1-NLK MAPK (Ishitani et al., 2003, Mol. Cell. Biol. 23:131-9).
- 10 Las células madre hematopoyéticas (HSC) son las células madre mejor comprendidas del cuerpo, y la señalización Wnt está implicadas tanto en su mantenimiento normal como en la transformación leucémica (Reya & Clevers, 2005, Nature 434:843). Las HSC son una población escasa de células que residen en un nicho de estroma en la médula ósea de adultos. Estas células se caracterizan tanto por un perfil de expresión génica único como por una capacidad de dar lugar continuamente a más células progenitoras diferenciadas para reconstituir el sistema hematopoyético completo. Tanto las HSC como las células de su microambiente del estroma expresan los ligando de Wnt, y la activación del indicador Wnt está presente en las HSC *in vivo*. Además, tanto la  $\beta$ -catenina como el Wnt3A purificado promueven la auto-renovación de HSC murinas *in vitro* y aumentan su capacidad para reconstituir el sistema hematopoyético *in vivo* mientras que Wnt5A promueve la expansión de los progenitores hematopoyéticos humanos *in vitro* y la repoblación en un modelo de xenoinjerto NOD-SCID (Reya et al., 2003, Nature 423:409-14; Willert et al., 2003, Nature 423:448-52; Van Den Berg et al., 1998, Blood 92:3189-202; Murdoch et al., 2003, Proc. Nat'l Acad. Sci. 100:3422-7).
- 25 Más recientemente se ha descubierto que la señalización Wnt tiene un papel en el crecimiento oncogénico de los linajes mieloides y linfoides. Por ejemplo, los progenitores de granulocitos-macrófagos (GMP) de las leucemias mielógenas crónicas presentan señalización Wnt activada de la que son dependientes para el crecimiento y la renovación (Jamieson et al., 2004, N. Engl. J. Med. 351:657-67). Y aunque las leucemias no parecen albergar mutaciones en la vía Wnt, la señalización Wnt autocrina y/o paracrina puede sustentar la auto-renovación cancerosa (Reya & Clevers 2005, Nature 434:843).
- 30 La vía de señalización Wnt canónica también tiene un papel central en el mantenimiento de poblaciones de células madre en el intestino delgado y colon, y la activación inapropiada de esta vía tiene un papel preeminente en los cánceres colorrectales (Reya & Clevers, 2005, Nature 434:843). El epitelio de absorción de los intestinos está dispuesto en vellosidades y criptas. Las células madre residen en las criptas y se dividen lentamente para producir rápidamente células proliferantes que dan lugar a todas las poblaciones de células diferenciadas que salen de las criptas para ocupar las vellosidades intestinales. La cascada de señalización Wnt tiene un papel dominante en el control del destino celular a lo largo del eje criptas-vellosidades y es esencial para el mantenimiento de la población de células madre. La alteración de la señalización Wnt o por pérdida genética de Tcf7/2 por recombinación homóloga (Korinek et al., 1998, Nat. Genet. 19:379) o sobre-expresión de Dickkopf-1 (Dkk1), un potente antagonista de Wnt secretado (Pinto et al., 2003, Genes Dev. 17:1709-13; Kuhnert et al., 2004, Proc. Nat'l. Acad. Sci. 101:266-71), da como resultado el agotamiento de las poblaciones de células madre intestinales.
- 45 El cáncer colorrectal se inicia más comúnmente por mutaciones de activación en la cascada de señalización Wnt. Aproximadamente el 5-10 % de todos los cánceres colorrectales son hereditarios siendo una de las formas principales la poliposis adenomatosa familiar (FAP), una enfermedad autosómica dominante en la que aproximadamente el 80 % de los individuos afectados contienen una mutación de la línea germinal en el gen de la poliposis adenomatosa cólica (APC). También se han identificado mutaciones en otros componentes de la vía Wnt incluyendo la auxina y la  $\beta$ -catenina. Los adenomas individuales son crecimientos clónicos de la célula epitelial que contiene un segundo alelo inactivado, y un gran número de adenomas de la FAP inevitablemente da como resultado el desarrollo de adenocarcinomas por medio de la adición de mutaciones en los oncogenes y/o genes supresores de tumores. Además, la activación de la vía de señalización Wnt, incluyendo las mutaciones de ganancia de función en el APC y  $\beta$ -catenina, pueden inducir el desarrollo hiperplásico y el crecimiento tumoral en modelos de ratón (Oshima et al., 1997, Cancer Res. 57:1644-9; Harada et al., 1999, EMBO J. 18:5931-42).
- 55 Se descubrió un papel para la señalización Wnt en primer lugar con la identificación del *Wnt1* (originalmente *int1*) como un oncogén en tumores mamarios transformados por la inserción de un virus murino cercano (Nusse & Varmus, 1982, Cell 31:99-109). Desde entonces, se han acumulado pruebas adicionales para el papel de la señalización Wnt en el cáncer de mama. Por ejemplo, la sobre-expresión transgénica de la  $\beta$ -catenina en las glándulas mamarias da como 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 Wnt altera el desarrollo normal de la glándula mamaria (Tepera et al., 2003, J. Cell Sc. 116:1137-49; Hatsell et al., 2003, J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 8:145-58). Más recientemente se ha demostrado que las células madre mamarias se activan con la señalización Wnt (Liu et al., 2004, Proc. Nat'l Acad.Sci. 101:4158). En el cáncer humano de mama, la acumulación de  $\beta$ -catenina implica la señalización Wnt activada en más del 50 % de los carcinomas, y aunque no se han identificado mutaciones específicas, se ha observado la regulación al alza 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).

FZD10, FZD8, FZD7, FZD4 y FZD5 son cinco de los diez receptores Wnt humanos identificados. En el embrión de ratón, el Fzd10 se expresa con Wnt7 en el tubo neural, brotes de las extremidades y ducto Mulleriano (Nunnally & Parr, 2004, Dev. Genes Evol. 214:144-8) y puede actuar como un receptor para Wnt-7a durante el desarrollo de los brotes de las extremidades (Kawakami et al., 2000, Dev. Growth Differ. 42:561-9). El Fzd10 se co-exprime con Wnt-7b en los pulmones, y los estudios de transfección celular han demostrado que el co-receptor Fzd10/LRP5 activa la vía de señalización Wnt canónica en respuesta al Wnt7b (Wang et al., 2005, Mol. Cell Biol. 25:5022-30). El ARNm de FZD10 está regulado al alza en numerosas líneas celulares del cáncer, incluyendo líneas celulares del cáncer de cuello de útero, gástrico y glioblastoma, y en cánceres primarios que incluyen aproximadamente el 40 % de los cánceres gástricos primarios, cánceres de colon, y sarcomas sinoviales (Saitoh et al., 2002, Int. J. Oncol. 20:117-20; Terasaki et al., 2002, Int. J. Mol. Med. 9:107-12; Nagayama et al., 2005, Oncogene 1-12). El FZD8 está regulado al alza en varias líneas celulares del cáncer humano, cánceres gástricos primarios y carcinomas renales (Saitoh et al., 2001, Int. J. Oncol. 18:991-96; Kirikoshi et al., 2001, Int. J. Oncol. 19:111-5; Janssens et al., 2004, Tumor Biol. 25:161-71). El FZD7 se expresa a lo largo del tracto intestinal y está regulado al alza en uno de cada seis casos de cáncer gástrico primario (Kirikoshi et al., 2001, Int. J. Oncol. 19:111-5). La expresión del ectodominio FZD7 por una línea celular de cáncer de colon inducía cambios morfológicos y disminuía el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto (Ishikawa et al., 2001, Dev. 128:25-33). El FZD5 tiene un papel esencial en la angiogénesis del saco vitelino y de la placenta (Ishikawa et al., 2001, Dev. 128:25-33) y está regulado al alza en carcinomas renales en asociación con la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina (Janssens et al., 2004, Tumor Biology 25:161-71). El FZD4 muestra unos altos niveles de expresión en las células epiteliales de las criptas intestinales y es uno de varios factores que presentan una expresión diferencial en tejido normal frente a neoplásico (Gregorieff et al., 2005, Gastroenterology 129:626-38). La identificación de los receptores de FZD como marcadores de células madre de cáncer hace por lo tanto que estas proteínas sean dianas ideales para los agentes terapéuticos del cáncer.

La presente divulgación proporciona un marcador de células madre de cáncer cuya expresión puede analizarse para diagnosticar o controlar una enfermedad asociada con la expresión de un marcador de células madre de cáncer. En algunas realizaciones, la expresión de un marcador de células madre de cáncer se determina por expresión polinucleotídica tal como, por ejemplo, ARNm que codifica el marcador de células madre de cáncer. El polinucleótido puede ser detectado y cuantificado por cualquiera de diversos medios bien conocidos por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica un marcador de células madre de cáncer se detecta por hibridación in situ de cortes de tejido a partir, por ejemplo, de una biopsia de un paciente. En algunas realizaciones, el ARN se aísla de un tejido y se detecta mediante, por ejemplo, transferencia Northern, RT-PCR cuantitativa o micromatrices. Por ejemplo, el ARN total se puede extraer de una muestra de tejido y los cebadores que específicamente hibridan y amplifican un marcador de células madre de cáncer pueden usarse para detectar la expresión de un polinucleótido marcador de células madre de cáncer usando RT-PCR.

En ciertas realizaciones, la expresión de un marcador de células madre de cáncer puede determinarse mediante la detección del polipéptido correspondiente. El polipéptido puede ser detectado y cuantificado por cualquiera de un número de medios bien conocidos por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, se detecta un polipéptido marcador de células madre de cáncer usando métodos bioquímicos analíticos tales como, por ejemplo, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía en capa fina (TLC). El polipéptido aislado puede secuenciarse también de acuerdo con técnicas estándar. En algunas realizaciones, se detecta una proteína marcadora de células madre de cáncer con anticuerpos producidos contra la proteína usando, por ejemplo, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica en cortes de tejido. En otra alternativa, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer pueden detectar la expresión utilizando, por ejemplo, ELISA, FACS, inmunotransferencia Western, inmunoprecipitación o micromatrices de proteínas. Por ejemplo, las células madre de cáncer se pueden aislar de una biopsia del paciente y determinar la expresión de una proteína marcadora de células madre de cáncer detectada con anticuerpos marcados fluorescentemente usando FACS. En otro método, las células que expresan un marcador de células madre de cáncer se pueden detectar *in vivo* utilizando anticuerpos marcados en un estudio de imagen típico. Por ejemplo, los anticuerpos marcados con isótopos paramagnéticos pueden usarse para la resonancia magnética (MRI).

En algunas realizaciones de la presente divulgación, un ensayo de diagnóstico comprende determinar la expresión o no de un marcador de células madre de cáncer en células tumorales utilizando, por ejemplo, inmunohistoquímica, hibridación in situ o RT-PCR. En otras realizaciones, un ensayo de diagnóstico comprende determinar los niveles de expresión de un marcador de células madre de cáncer usando, por ejemplo, RT-PCR cuantitativa. En algunas realizaciones, un ensayo de diagnóstico comprende además determinar los niveles de expresión de un marcador de células madre de cáncer en comparación con un tejido de control tal como, por ejemplo, epitelio normal.

La detección de una expresión de marcador de células madre de cáncer puede usarse entonces para proporcionar un pronóstico y seleccionar una terapia. Un pronóstico puede basarse en cualquier expresión de riesgo conocida de un marcador de células madre de cáncer. Además, la detección de un marcador de células madre de cáncer se puede usar para seleccionar una terapia apropiada que incluye, por ejemplo, el tratamiento con anticuerpos contra la proteína marcadora de células madre de cáncer detectada. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular de una proteína marcadora de células madre de cáncer, tal como un receptor FZD humano.

En el contexto de la presente divulgación, un anticuerpo adecuado es un agente que puede tener uno o más de los siguientes efectos, por ejemplo: interfiere la expresión de un marcador de célula madre de cáncer, interfiere con la activación de una vía de transducción de la señal de las células madre de cáncer, por ejemplo, inhibiendo estéricamente las interacciones entre un marcador de célula madre de cáncer y su ligando, receptor o co-receptores; activa una vía de transducción de la señal de las células madre de cáncer, por ejemplo, actuando como ligando o promoviendo la unión de un ligando endógeno o se une a un marcador de células madre de cáncer e inhibe la proliferación de células tumorales.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer actúan extracelularmente para modular la función de un marcador de células madre de cáncer. En algunas realizaciones, la unión extracelular de un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer puede inhibir la señalización de una proteína marcadora de células madre de cáncer, por ejemplo, inhibiendo la activación intrínseca (por ejemplo, la actividad quinasa) de un marcador de células madre de cáncer y/o inhibiendo estéricamente la interacción, por ejemplo, de un marcador de células madre de cáncer con su ligando, con su receptor, con un co-receptor o con la matriz extracelular. En algunas realizaciones, la unión extracelular de un antagonista contra un marcador de células madre de cáncer puede regular a la baja la expresión en la superficie celular de un marcador de células madre de cáncer tal como, por ejemplo, por internalización de una proteína marcadora de células madre de cáncer y/o disminuyendo el tráfico en la superficie celular de un marcador de células madre de cáncer. En algunas realizaciones, la unión extracelular de un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer puede promover la señalización de una proteína marcadora de células madre del cáncer, por ejemplo, actuando como un ligando señuelo o aumentando la unión del ligando.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer se unen a una proteína marcadora de células madre de cáncer y tienen uno o más de los siguientes efectos: inhiben la proliferación de células tumorales, provocan la muerte celular de las células tumorales o previenen la metástasis de células tumorales. En ciertas realizaciones, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer provocan la muerte celular a través de una toxina conjugada, un agente quimioterapéutico, un radioisótopo u otro agente similar. Por ejemplo, un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se conjuga con una toxina que se activa en células tumorales que expresan el marcador de células madre de cáncer por internalización de proteínas. En ciertas realizaciones, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer median la muerte celular de una célula que expresa la proteína marcadora de células madre de cáncer a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). ADCC implica lisis celular por células efectoras que reconocen la porción Fc de un anticuerpo. Muchos linfocitos, monocitos, macrófagos tisulares, granulocitos y eosinófilos, por ejemplo, tienen receptores Fc y pueden mediar la citólisis (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer provocan la muerte celular de una célula que expresa una proteína marcadora de células madre de cáncer activando la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). CDC implica la unión del complemento del suero a la porción Fc de un anticuerpo y la subsiguiente activación de la cascada de proteínas del complemento, dando como resultado un daño a la membrana celular y eventualmente la muerte celular. Se sabe que la actividad biológica de los anticuerpos se determina, en gran medida, por los dominios constantes o la región Fc de la molécula de anticuerpo (Uananue and Benacerraf, Textbook of Immunology, 2ª Edición, Williams & Wilkins, p. 218 (1984). Los anticuerpos de diferentes clases y subclases difieren a este respecto, al igual que los anticuerpos de la misma subclase pero de diferentes especies. De los anticuerpos humanos, IgM es la clase más eficiente de anticuerpos para unirse al complemento, seguido de IgG1, IgG3 e IgG2, mientras que IgG4 aparece bastante deficiente en la activación de la cascada del complemento (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497; Jefferis et al., 1998, Immunol. Rev. 163:59-76). De acuerdo con la presente divulgación, se preparan anticuerpos de aquellas clases que tienen la actividad biológica deseada.

Se puede ensayar la capacidad de cualquier anticuerpo particular contra una célula madre de cáncer para mediar la lisis de la célula diana mediante la activación del complemento y/o ADCC. Las células de interés se cultivan y se etiquetan *in vitro*; el anticuerpo se añade al cultivo celular en combinación con células del complemento del suero o inmunitarias que pueden activarse mediante los complejos antígeno-anticuerpo. La citólisis de las células diana se detecta, por ejemplo, mediante la liberación del marcador de las células lisadas. De hecho, los anticuerpos pueden ser seleccionados usando el propio suero del paciente como una fuente de complemento y/o células inmunitarias. El anticuerpo que es capaz de activar el complemento o la mediación de ADCC en el ensayo *in vitro*, puede usarse entonces terapéuticamente en ese paciente en particular.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer pueden desencadenar la muerte celular inhibiendo la angiogénesis. La angiogénesis es el proceso por el que se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes y es un proceso fundamental necesario para el crecimiento normal, por ejemplo, durante el desarrollo embrionario, la curación de heridas y en respuesta a la ovulación. El crecimiento de un tumor sólido mayor de 1-2 mm<sup>2</sup> también requiere angiogénesis para aportar nutrientes y oxígeno sin los que las células tumorales mueren. En ciertas realizaciones, un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer puede dirigirse a células vasculares que expresan el marcador de células madre de cáncer incluyendo, por ejemplo, células endoteliales, células de músculo liso o componentes de la matriz extracelular necesarios para el ensamblaje vascular. En ciertas realizaciones, un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer inhibe la

señalización del factor de crecimiento necesaria para el reclutamiento, ensamblaje, mantenimiento o supervivencia de las células vasculares.

5 Los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer se pueden usar en los métodos de diagnóstico y terapéuticos descritos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación se usan para detectar la expresión de una proteína marcadora de células madre de cáncer en muestras biológicas tales como, por ejemplo, una biopsia de tejido, un derrame pleural o una muestra de sangre de un paciente. De las biopsias de tejido se pueden hacer cortes y detectar proteínas usando, por ejemplo, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. Además, se pueden aislar células individuales de una muestra y se puede detectar la expresión  
10 de la proteína en células fijas o vivas mediante análisis FACS. En ciertas realizaciones, pueden usarse anticuerpos en matrices de proteínas para detectar la expresión de un marcador de células madre de cáncer, por ejemplo, en células tumorales, en lisados celulares o en otras muestras de proteínas. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación se usan para inhibir el crecimiento de células tumorales poniendo en contacto los anticuerpos con células tumorales en ensayos *in vitro* basados en células, modelos en animales *in vivo*, etc. En  
15 ciertas realizaciones, los anticuerpos se usan para tratar el cáncer en un paciente mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer.

Los anticuerpos policlonales se pueden preparar por cualquier método conocido. Los anticuerpos policlonales se obtienen inmunizando a un animal (por ejemplo, un conejo, rata, ratón, burro, etc.) mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno relevante (un fragmento peptídico purificado, proteína recombinante de longitud completa, proteína de fusión, etc.) opcionalmente conjugado con hemocianina de la lapa californiana (KLH), albúmina sérica, etc., diluida en solución salina estéril y combinada con un adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund completo o incompleto) para formar una emulsión estable. El anticuerpo policlonal se recupera a  
20 continuación de la sangre, ascitis y similares, de un animal así inmunizado. La sangre recogida se coagula, y el suero se decanta, se aclara por centrifugación, y se determina el título de anticuerpos. Los anticuerpos policlonales se pueden purificar a partir de suero o ascitis según métodos estándar en la técnica, incluyendo cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, diálisis, etc.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por  
30 Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495. Utilizando el método del hibridoma, se inmuniza un ratón, hámster u otro animal hospedante apropiado, como se ha descrito anteriormente, para provocar la producción por los linfocitos de anticuerpos que se unirán específicamente a un antígeno inmunizante. Los linfocitos también pueden inmunizarse *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada utilizando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que pueden seleccionarse después de  
35 linfocitos no fusionados y células de mieloma. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno escogido determinado por inmunoprecipitación, inmunotransferencia o mediante un ensayo de unión *in vitro* (por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunosorbente unido a enzimas (ELISA)) se pueden propagar ya sea en cultivo *in vitro* utilizando métodos normalizados (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) o *in vivo* como tumores de ascitis en un animal. Los  
40 anticuerpos monoclonales pueden entonces purificarse a partir del medio de cultivo o fluido ascítico como se describe para los anticuerpos policlonales anteriores.

En otra alternativa, también pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando métodos de ADN recombinante como se describe en la patente US-4.816.567. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan  
45 a partir de linfocitos B maduros o de células de hibridoma, tales como por RT-PCR usando cebadores oligonucleotídicos que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y su secuencia se determina usando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesada y ligera se clonan a continuación en vectores de expresión adecuados, que cuando se transfectan en células hospedadora tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, los anticuerpos monoclonales son generados por las células hospedadoras. También, pueden aislarse anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de los mismos de las especies deseadas a partir de bibliotecas de presentación en fagos que expresan CDR de la especie deseada tal como se describe (McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554; Clackson et al., 1991, Nature, 352:624-628; and Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597).  
50

El polinucleótido(s) que codifica un anticuerpo monoclonal puede modificarse adicionalmente de varias maneras diferentes usando tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En algunas realizaciones, los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón pueden estar sustituidos 1) por las regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o  
60 2) por un polipéptido no inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En algunas realizaciones, las regiones constantes se truncan o se eliminan para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. La mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable puede usarse para optimizar la especificidad, afinidad, etc. de un anticuerpo monoclonal.

65 En algunas realizaciones de la presente divulgación, el anticuerpo monoclonal contra un marcador de células madre de cáncer es un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos que contienen secuencias



mínimas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) dentro de las regiones variables. Tales anticuerpos se usan terapéuticamente para reducir la antigenicidad y las respuestas de HAMA (anticuerpo humano anti-ratón) cuando se administran a un sujeto humano. En la práctica, los anticuerpos humanizados son generalmente anticuerpos humanos con un mínimo de secuencias no humanas. Un anticuerpo humano es un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un ser humano.

Los anticuerpos humanizados se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Un anticuerpo puede humanizarse sustituyendo la CDR de un anticuerpo humano con la de un anticuerpo no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc.) que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas (Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536). El anticuerpo humanizado puede modificarse adicionalmente mediante la sustitución de restos adicionales en la región estructural Fv y/o dentro de los restos no humanos sustituidos para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanos pueden prepararse directamente utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica. Se pueden generar linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o aislados de un individuo inmunizado que produce un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (véase, por ejemplo, Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95 y la patente US-5.750.373). Además, el anticuerpo humano puede seleccionarse de una biblioteca de fagos, donde dicha biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan et al., 1996, Nat. Biotech., 14:309-314; Sheets et al., 1998, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581). También se pueden producir anticuerpos humanizados en ratones transgénicos que contienen loci de inmunoglobulina humana que son capaces tras la inmunización de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Este enfoque se describe en las patentes US-5.545.807; US-5.545.806; US-5.569.825; US-5.625.126; US-5.633.425 y US-5.661.016.

Esta divulgación también abarca anticuerpos biespecíficos que reconocen específicamente un marcador de células madre de cáncer. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que son capaces de reconocer y unir específicamente al menos dos epítomos diferentes. Los diferentes epítomos pueden estar dentro de la misma molécula (por ejemplo, el mismo polipéptido marcador de células madre de cáncer) o en diferentes moléculas de manera que ambos, por ejemplo, los anticuerpos pueden reconocer específicamente y unirse a un marcador de células madre de cáncer así como, por ejemplo, 1) una molécula efectora sobre un leucocito tal como un receptor de linfocitos T (por ejemplo, CD3) o receptor de Fc (por ejemplo, CD64, CD32 o CD16) o 2) un agente citotóxico como se describe en detalle a continuación. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpos.

Ejemplos de anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítomos diferentes, al menos uno de los cuales tiene su origen en un polipéptido de la divulgación. En otra alternativa, un brazo anti-antigénico de una molécula de inmunoglobulina puede combinarse con un brazo que se une a una molécula activadora en un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28, o B7) o receptores de Fc para IgG con el fin de enfocar mecanismos de defensa celular a la célula que expresa el antígeno particular. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para dirigir agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionúclidos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Las técnicas para preparar anticuerpos biespecíficos son comunes en la técnica (Millstein et al., 1983, Nature 305:537-539; Brennan et al., 1985, Science 229:81; Suresh et al., 1986, Methods in Enzymol. 121:120; Trauneker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, J. Exp. Med. 175:217-225; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, J. Immunol. 152:5368 y la patente US-5.731.168). También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos (Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991))

En ciertas realizaciones se proporciona un fragmento de anticuerpo para, por ejemplo, aumentar la penetración del tumor. Se conocen varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivan mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (por ejemplo Morimoto et al., 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117; Brennan et al., 1985, Science, 229:81). En ciertas realizaciones, los fragmentos de anticuerpo se producen de forma recombinante. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse y secretarse de *E. coli* u otras células hospedadoras, permitiendo así la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Tales fragmentos de anticuerpos pueden aislarse también de las bibliotecas de fagos de anticuerpos discutidas anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser anticuerpos lineales como se describe en la patente US-5.641.870, por ejemplo, y pueden ser monoespecíficas o biespecíficas. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la materia.

De acuerdo con la presente divulgación, las técnicas pueden adaptarse para la producción de anticuerpos de cadena única específicos de un polipéptido de la divulgación (véase la patente US-4.946.778). Además, se pueden adaptar métodos para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse, et al., Science 246: 1275-1281

(1989)) para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para un receptor FZD, o derivados, fragmentos, análogos o homólogos de los mismos. Los fragmentos de anticuerpo que contienen los idiotipos de un polipéptido de la divulgación pueden producirse mediante técnicas en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a: (a) un fragmento F(ab')<sub>2</sub> producido por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (b) un fragmento Fab generado por reducción de puentes disulfuro de un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, (c) un fragmento Fab generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor y (d) fragmentos Fv.

Además, puede ser deseable, especialmente en el caso de fragmentos de anticuerpo, modificar un anticuerpo para aumentar su semivida en suero. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión al receptor de rescate en el fragmento de anticuerpo por mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o incorporando el epítipo en una etiqueta de péptido que se fusiona a continuación al fragmento de anticuerpo en cada extremo o en el medio (por ejemplo, por ADN o síntesis de péptidos).

Los anticuerpos heteroconjugados están también dentro del alcance de la presente divulgación. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células inmunitarias a células no deseadas (patente US-4.676.980). Se contempla que los anticuerpos se puedan preparar *in vitro* utilizando métodos conocidos en la química de las proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

Para los propósitos de la presente divulgación, debe apreciarse que los anticuerpos modificados pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del anticuerpo con los polipéptidos de un receptor FZD humano. A este respecto, la región variable puede comprender o derivarse de cualquier tipo de mamífero que pueda ser inducido para montar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno asociado al tumor deseado. Como tal, la región variable de los anticuerpos modificados puede ser, por ejemplo, de primates humanos, murinos, no humanos (por ejemplo monos *cynomolgus*, macacos, etc.) o de origen lupino. En algunas realizaciones tanto las regiones variables como las constantes de las inmunoglobulinas modificadas son humanas. En otras realizaciones, las regiones variables de anticuerpos compatibles (habitualmente derivadas de una fuente no humana) pueden diseñarse o adaptarse específicamente para mejorar las propiedades de unión o reducir la inmunogenicidad de la molécula. A este respecto, las regiones variables útiles en la presente divulgación pueden ser humanizadas o alteradas de otro modo mediante la inclusión de secuencias de aminoácidos importadas.

Los dominios variables en las cadenas pesada y ligera se alteran mediante la sustitución al menos parcial de una o más CDR y, si es necesario, mediante la sustitución de la región estructural parcial y el cambio de secuencia. Aunque las CDR pueden derivarse de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase como el anticuerpo del que derivan las regiones estructurales, se prevé que las CDR deriven de un anticuerpo de diferente clase y preferiblemente de un anticuerpo de una especie diferente. Puede no ser necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable donadora para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. Más bien puede ser solo necesario transferir los restos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión al antígeno. Habida cuenta de las explicaciones expuestas en las patentes US-5.585.089, US-5.693.761 y US-5.693.762, estará dentro de la competencia de los expertos en la materia, ya sea llevando a cabo una experimentación rutinaria o mediante pruebas de ensayo y error obtener un anticuerpo funcional con inmunogenicidad reducida.

A pesar de las alteraciones en la región variable, los expertos en la materia apreciarán que los anticuerpos modificados de esta divulgación comprenderán anticuerpos o fragmentos inmunorreactivos de los mismos, en los que al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante ha sido suprimida o de otro modo alterada para proporcionar las características bioquímicas deseadas tales como una mayor localización tumoral o una semivida sérica reducida cuando se compara con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o inalterada. En algunas realizaciones, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una región constante humana. Las modificaciones a la región constante compatible con esta divulgación comprenden adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Es decir, los anticuerpos modificados divulgados en la presente memoria pueden comprender alteraciones o modificaciones a uno o más de los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o al dominio constante de cadena ligera (CL). En algunas realizaciones de la divulgación, se contemplan regiones constantes modificadas en las que uno o más dominios están parcial o totalmente suprimidos. En algunas realizaciones, los anticuerpos modificados comprenderán construcciones o variantes eliminadas en las que se ha eliminado todo el dominio CH2 (construcciones  $\Delta$ CH2). En algunas realizaciones, el dominio de región constante omitido se reemplazará por un espaciador corto de aminoácidos (por ejemplo, 10 restos) que proporciona parte de la flexibilidad molecular conferida generalmente por la región constante ausente.

Además de su configuración, se sabe en la técnica que la región constante media varias funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a los anticuerpos activa el sistema del complemento. La

activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar implicada en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Además, los anticuerpos se unen a las células a través de la región Fc, donde un sitio receptor Fc en la región Fc del anticuerpo se une a un receptor Fc (FcR) en una célula. Hay una serie de receptores Fc que son  
 5 específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores eta), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies celulares desencadena una serie de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen la engullición y destrucción de partículas recubiertas de anticuerpo, eliminación de complejos inmunitarios, lisis de células diana recubiertas de anticuerpo por células asesinas (denominada citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o  
 10 ADCC), la liberación de mediadores inflamatorios, la transferencia placentaria y el control de la producción de inmunoglobulinas. Aunque varios receptores Fc y sitios receptores han sido estudiados hasta cierto punto, todavía hay mucho que se desconoce acerca de su ubicación, estructura y funcionamiento.

Aunque no limita el alcance de la presente divulgación, se cree que los anticuerpos que comprenden regiones constantes modificadas como se describe en la presente memoria proporcionan funciones efectoras alteradas que, a su vez, afectan al perfil biológico del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la delección o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo modificado circulante aumentando de este modo la localización del tumor. En otros casos, puede ser  
 15 que las modificaciones de regiones constantes, consistentes con esta divulgación, moderen la unión del complemento y, de este modo, reduzcan la semivida en el suero y la asociación inespecífica de una citotoxina conjugada. Sin embargo, pueden usarse otras modificaciones de la región constante para eliminar los enlaces disulfuro o restos de oligosacáridos que permitan una localización mejorada debido al aumento de la especificidad del antígeno o la flexibilidad del anticuerpo. De manera similar, las modificaciones a la región constante de acuerdo con esta divulgación pueden hacerse fácilmente usando técnicas bioquímicas o de ingeniería molecular bien  
 20 conocidas totalmente dentro del alcance del experto en la materia.

Se observará que los anticuerpos modificados pueden ser modificados genéticamente para fusionar el dominio CH3 directamente a la región bisagra de los respectivos anticuerpos modificados. En otras construcciones puede ser deseable proporcionar un espaciador peptídico entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por  
 30 ejemplo, podrían expresarse construcciones compatibles en las que el dominio CH2 se ha suprimido y el dominio CH3 restante (modificado o no modificado) se une a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Dicho espaciador puede añadirse, por ejemplo, para asegurar que los elementos reguladores del dominio constante permanecen libres y accesibles o que la región de bisagra permanece flexible. Sin embargo, debe observarse que los espaciadores de aminoácidos pueden, en algunos casos, demostrar ser inmunogénicos y provocar una  
 35 respuesta inmunitaria no deseada contra la construcción. Por consiguiente, cualquier espaciador añadido a la construcción puede ser relativamente no inmunogénico o incluso omitido en conjunto si se pueden mantener las cualidades bioquímicas deseadas de los anticuerpos modificados.

Además de la delección de dominios enteros de regiones enteras, se apreciará que los anticuerpos de la presente divulgación pueden proporcionarse mediante la delección parcial o sustitución de unos pocos o incluso un solo aminoácido. Por ejemplo, la mutación de un solo aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser  
 40 suficiente para reducir sustancialmente la unión a Fc y, de este modo, aumentar la localización del tumor. De manera similar, puede ser deseable eliminar simplemente la parte de uno o más dominios de regiones constantes que controlan la función efectora (por ejemplo, la unión CLQ del complemento) a modular. Tales delecciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (semivida sérica) mientras que deja intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de la región constante objeto. Además, como se ha mencionado anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos divulgados pueden modificarse mediante la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que realcen el perfil de la construcción  
 45 resultante. A este respecto, puede ser posible interrumpir la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ej., unión a Fc) manteniendo sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Ciertas realizaciones pueden comprender la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para mejorar las características deseables tales como la función efectora o proporcionar más fijación de citotoxina o carbohidrato. En tales realizaciones puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios de la región constante seleccionados.  
 50

La presente divulgación comprende además variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, expuestos en la presente memoria. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución conservadoras, es decir, la  
 55 sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, la sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro dentro de la misma clase general tal como, por ejemplo, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, un aminoácido básico con otro aminoácido básico o un aminoácido neutro con otro aminoácido neutro. Lo que se pretende mediante una sustitución conservadora de aminoácidos es bien conocido en la técnica.

La divulgación también se refiere a inmunocombinados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas  
 65

(por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos), isótopos radiactivos (es decir, un radioconjugado), etc. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunocombinados incluyen, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes de intercalación. Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden usar incluyen la cadena A de la difteria, los fragmentos activos no ligantes de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina, la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modicina, la alfa sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Existen varios radionúclidos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados incluyendo  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , y  $^{186}\text{Re}$ . Los combinados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando varios agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-pirididil) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). También se pueden usar combinados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

Los anticuerpos combinados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Se ha propuesto que tales anticuerpos, por ejemplo, dirigen células inmunitarias a células no deseadas (patente US-4.676.980). Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* utilizando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptopbutirimidato.

Independientemente de cómo se obtengan cantidades útiles, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden usar en cualquiera de una serie de formas combinadas (es decir, un inmunocombinado) o no combinadas. En otra alternativa, los anticuerpos de esta divulgación se pueden usar en una forma no combinada o "desnuda" para aprovechar los mecanismos naturales de defensa del sujeto incluyendo la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) para eliminar las células malignas. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden combinarse con radioisótopos, tales como  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$  y  $^{188}\text{Re}$  usando cualquiera de un número de quelantes o marcadores directos bien conocidos. En otras realizaciones, las composiciones divulgadas pueden comprender anticuerpos acoplados a fármacos, profármacos o modificadores de la respuesta biológica tales como metotrexato, adriamicina y linfoquinas tales como interferón. Otras realizaciones más de la presente divulgación comprenden el uso de anticuerpos combinados a biotoxinas específicas tales como ricina o la toxina de la difteria. En otras realizaciones más, los anticuerpos modificados pueden formar complejos con otros ligandos inmunológicamente activos (por ejemplo anticuerpos o fragmentos de los mismos) en los que la molécula resultante se une tanto a la célula neoplásica como a una célula efectora tal como un linfocito T. La selección del anticuerpo modificado combinado o no combinado a usar dependerá del tipo y estadio del cáncer, del uso de tratamiento adyuvante (por ejemplo, quimioterapia o radiación externa) y de la afección del paciente. Se apreciará que un experto en la materia podría fácilmente hacer tal selección en vista de las enseñanzas de la presente invención.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ensayarse en cuanto a la unión inmunoespecífica por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoenayos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como análisis BIAcore, análisis FACS, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, transferencias Western, radioinmunoenayos, ELISA, inmunoenayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoenayos fluorescentes e inmunoenayos de proteína A. Tales ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., Eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

En algunas realizaciones, la inmunoespecificidad de un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se determina usando ELISA. Un ensayo ELISA comprende preparar antígeno, recubrir pocillos de una placa de microvaloración de 96 pocillos con antígeno, añadir el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer combinado a un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) al pocillo, incubando durante un periodo de tiempo y detectar la presencia del antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer no está combinado con un compuesto detectable, sino que se añade al pocillo un segundo anticuerpo combinado que reconoce el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer. En algunas realizaciones, en lugar de revestir el pocillo con el antígeno, el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer puede recubrirse con el pocillo y un segundo anticuerpo combinado con un compuesto detectable puede añadirse después de la adición del antígeno al pocillo recubierto. Un experto en la materia estaría bien informado en cuanto a los parámetros que pueden ser modificados

para aumentar la señal detectada, así como otras variaciones de ELISA conocidas en la técnica (véase, por ej. Ausubel et al., Eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 11.2.1).

5 La afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno marcador de células madre de cáncer y la tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno se pueden determinar mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación del antígeno marcado (por ej.,  $^3\text{H}$  o  $^{125}\text{I}$ ), o fragmento o variante del mismo, con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado seguido de la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo frente a un marcador de células madre de cáncer y las tasas de disociación de unión se puede determinar a partir de los datos mediante análisis de parcela de Scatchard. En algunas realizaciones, el análisis cinético BIAcore se usa para determinar las tasas de unión y de disociación de los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer. El análisis cinético de BIAcore comprende analizar la unión y disociación de anticuerpos de chips con antígenos marcadores de células madre de cáncer inmovilizados en su superficie.

10 En ciertas realizaciones, la divulgación abarca polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido que comprende un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra un receptor FZD humano. Por lo tanto, la expresión "polinucleótido que codifica un polipéptido" abarca un polinucleótido que incluye solo secuencias codificantes del polipéptido, así como un polinucleótido que incluye secuencias codificantes y/o no codificantes adicionales. Los polinucleótidos de la divulgación pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético y pueden ser bicatenarios o monocatenarios y si son monocatenarios puede ser la cadena codificante o no codificante (antisentido).

15 La presente divulgación se refiere además a variantes de los polinucleótidos descritos anteriormente en la presente memoria, que codifican, por ejemplo, fragmentos, análogos y derivados. La variante del polinucleótido puede ser una variante alélica natural del polinucleótido o una variante no natural del polinucleótido. En ciertas realizaciones, el polinucleótido puede tener una secuencia codificante que es una variante alélica natural de la secuencia codificante de los polipéptidos divulgados. Como se conoce en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de una secuencia polinucleotídica que tiene, por ejemplo, una sustitución, delección o adición de uno o más nucleótidos, que no altera sustancialmente la función del polipéptido codificado.

20 En ciertas realizaciones, los polinucleótidos comprenden la secuencia codificante del polipéptido maduro fusionado en el mismo marco de lectura a un polinucleótido que contribuye, por ejemplo, a la expresión y secreción de un polipéptido de una célula hospedadora (por ejemplo, una secuencia líder que funciona como secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido desde la célula). El polipéptido que tiene una secuencia líder es una preproteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula hospedadora para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar una proproteína que es la proteína madura más restos de aminoácidos 5' adicionales. Una proteína madura que tiene una prosequencia es una proproteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que la prosequencia se escinde, queda una proteína madura activa.

25 En ciertas realizaciones los polinucleótidos comprenden la secuencia codificante del polipéptido maduro fusionado 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 hexa-histidina suministrada por un vector pQE-9 para proporcionar la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un hospedador bacteriano, o la secuencia marcadora puede ser una hemaglutinina (HA) derivada de la proteína hemaglutinina de la gripe cuando se usa un hospedador mamífero (por ejemplo, células COS-7).

30 En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que tienen 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 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra un receptor FZD humano.

35 Por un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos por lo menos, por ejemplo, 95 % "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia se pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia polinucleotídica puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta el 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia puede suprimirse o sustituirse con otro nucleótido o se pueden insertar en la secuencia de referencia varios nucleótidos hasta 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones amino o carboxi terminal de la secuencia nucleotídica de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

40 Como cuestión práctica, si cualquier molécula de ácido nucleico en particular es al menos un 80 % idéntica, al

menos un 85 % idéntica, al menos un 90 % idéntica, y en algunas realizaciones, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de referencia puede determinarse convencionalmente utilizando programas informáticos conocidos tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit o cualquier otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95 % idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente divulgación, los parámetros se establecen de tal manera que el porcentaje de identidad se calcula sobre toda la longitud de la secuencia de nucleótidos de referencia y se permiten huecos en homología de hasta 5 % del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

Las variantes polinucleotídicas pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes, o ambas. En algunas realizaciones, las variantes polinucleotídicas contienen alteraciones que producen sustituciones silenciosas, adiciones o deleciones, 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. Las variantes de polinucleótidos pueden producirse por diversas razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un hospedador particular (codones de cambio en el ARNm humano a los preferidos por un hospedador bacteriano tal como *E. coli*).

Los polipéptidos de la presente divulgación pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales o polipéptidos sintéticos que comprenden un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra un receptor FZD humano. Se reconocerá en la técnica que algunas secuencias de aminoácidos de la divulgación pueden variar sin efecto significativo de la estructura o función de la proteína. De este modo, la divulgación incluye además variaciones de los polipéptidos que muestran una actividad sustancial o que incluyen regiones de un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra una proteína receptora FZD humana. Tales mutantes incluyen deleciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones de tipo.

Los polipéptidos y análogos pueden modificarse adicionalmente para contener restos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la proteína. Los restos derivados pueden mejorar la solubilidad, la semivida biológica o la absorción de la proteína. Los restos también pueden reducir o eliminar cualquier efecto secundario deseable de las proteínas y similares. Se puede encontrar una visión general de estos restos en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20ª edición, Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

Los polipéptidos aislados descritos en la presente invención pueden producirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Tales métodos van desde métodos de síntesis directa de proteínas hasta la construcción de una secuencia de ADN que codifica secuencias de polipéptidos aislados y expresan esas secuencias en un huésped transformado adecuado. En algunas realizaciones, se construye una secuencia de ADN usando tecnología recombinante aislando o sintetizando una secuencia de ADN que codifica una proteína de tipo silvestre de interés. Opcionalmente, la secuencia puede ser mutagenizada por mutagénesis específica de sitio para proporcionar análogos funcionales de la misma. Véase, por ej. Zoeller et al., *Pro. Nat'l. Acad. Sci. USA* 81:5662-5066 (1984) y la patente US-4.588.585.

En algunas realizaciones, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés se construiría por síntesis química utilizando un sintetizador de oligonucleótidos. Tales oligonucleótidos pueden diseñarse basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionando aquellos codones que son favorecidos en la célula hospedadora en la que se producirá el polipéptido recombinante de interés. Pueden aplicarse métodos estándar para sintetizar una secuencia polinucleotídica aislada que codifica un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, se puede usar una secuencia completa de aminoácidos para construir un gen traducido de nuevo. Además, se puede sintetizar un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido particular aislado. Por ejemplo, se pueden sintetizar varios oligonucleótidos pequeños que codifican porciones del polipéptido deseado y después se ligan. Los oligonucleótidos individuales contienen generalmente salientes 5' o 3' para el montaje complementario.

Una vez ensamblados (mediante síntesis, mutagénesis dirigida a un sitio u otro método), las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido aislado particular de interés se insertarán en un vector de expresión y se unirán operativamente a una secuencia de control de expresión apropiada para la expresión de la proteína en un hospedador deseado. El ensamblaje apropiado puede confirmarse mediante secuenciación de nucleótidos, mapeo de restricción y expresión de un polipéptido biológicamente activo en un hospedador adecuado. Como es bien conocido en la técnica, con el fin de obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un hospedador, el gen debe estar operativamente unido a secuencias de control de la expresión transcripcional y de traducción que son funcionales en el hospedador de expresión elegido.

Se usan vectores de expresión recombinantes para amplificar y expresar ADN que codifica fusiones de polipéptidos marcadores de células madre de cáncer. Los vectores de expresión recombinantes son construcciones de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifican una fusión de polipéptido marcador de células madre de cáncer o un análogo bioequivalente operativamente unido a elementos reguladores

de la transcripción o de la traducción adecuados derivados de genes de mamíferos, microbianos, víricos o insectos. Una unidad transcripcional comprende generalmente un conjunto de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores de la transcripción, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína y (3) secuencias apropiadas de iniciación y terminación de la transcripción y traducción, como se describe con detalle a continuación. Tales elementos reguladores pueden incluir una secuencia de operador para controlar la transcripción. Además, se puede incorporar la capacidad de replicarse en un hospedador, habitualmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes. Las regiones de ADN están unidas operativamente cuando están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (líder secretor) está operativamente unido al ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está operativamente unido a una secuencia de codificación si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia de codificación si está posicionado de manera que permita la traducción. Generalmente, unidos operativamente significa contiguos y, en el caso de los líderes secretores, significa contiguos y en el marco de lectura. Los elementos estructurales destinados a ser utilizados en sistemas de expresión de levaduras incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula hospedadora. En otra alternativa, cuando la proteína recombinante se expresa sin un líder o secuencia de transporte, puede incluir un resto de metionina N-terminal. Opcionalmente, este resto puede escindirse posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

La elección de la secuencia de control de la expresión y del vector de expresión dependerá de la elección del hospedador. Se puede emplear una amplia variedad de combinaciones hospedador/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para hospedadores eucarióticos incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de la expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de la expresión útiles para hospedadores bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *Esherichia coli*, incluyendo pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de rango de hospedador más amplio, tales como M13 y fagos filamentosos de ADN monocatenario.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de una proteína marcadora de células madre de cáncer incluyen células procariotas, levaduras, insectos o células eucariotas superiores bajo el control de promotores apropiados. Los procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen de mamífero como se describe a continuación. También podrían emplearse sistemas de traducción sin células. Los vectores apropiados de clonación y expresión para su uso con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamíferos se describen en Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985).

También se emplean ventajosamente varios sistemas de cultivo de células de mamíferos o insectos para expresar proteína recombinante. La expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero puede realizarse porque dichas proteínas están generalmente dobladas correctamente, adecuadamente modificadas y son completamente funcionales. Ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (Cell 23: 175, 1981) y otras líneas celulares capaces de expresar un vector apropiado que incluye, por ejemplo, células L, C127, 3T3, células de ovario de hámster chino (CHO), líneas celulares HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados unidos al gen a expresar y otras secuencias no transcritas flanqueantes en 5' o 3' y secuencias no traducidas en 5' o 3', tales como los necesarios sitios de unión a ribosomas, un sitio de poliadenilación, sitios dador y aceptor de corte y empalme y secuencias de terminación de la transcripción. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos se revisan en Luckow y Summers, Bio/Technology 6:47 (1988).

Las proteínas producidas por un hospedador transformado pueden purificarse de acuerdo con cualquier método adecuado. Dichos métodos estándar incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y cromatografía en columna por exclusión de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Se pueden unir a la proteína marcadores de afinidad tales como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de la cubierta del virus de la gripe y glutatión-S-transferasa para permitir una purificación sencilla por paso sobre una columna de afinidad apropiada. Las proteínas aisladas también pueden caracterizarse físicamente utilizando técnicas tales como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X.

Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas que secretan proteína recombinante en medios de cultivo pueden concentrarse primero usando un filtro de concentración de proteína comercializado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. Como alternativa, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser de acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. En otra alternativa, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Por último, se pueden

emplear una o más etapas de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) que emplean medios RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos colgantes, para purificar adicionalmente una composición proteína de células madre de cáncer-Fc. También se pueden emplear algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano puede aislarse, por ejemplo, mediante extracción inicial de gránulos celulares, seguida de una o más etapas de concentración, precipitación salina, intercambio iónico acuoso o cromatografía por exclusión de tamaño. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se puede emplear para las etapas de purificación final. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante pueden alterarse por cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica o uso de agentes de lisis celular.

La presente divulgación proporciona métodos para inhibir el crecimiento de células tumorigénicas que expresan un marcador de células madre de cáncer usando los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer descrito en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el método para inhibir el crecimiento de células tumorigénicas que expresan un marcador de células madre de cáncer comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer *in vitro*. Por ejemplo, una línea celular inmortalizada o una línea celular de cáncer que expresa un marcador de células madre de cáncer se cultiva en un medio al que se añade un anticuerpo contra el marcador de células madre de cáncer expresado para inhibir el crecimiento celular. En algunas realizaciones, se aíslan células madre tumorales que comprenden células madre tumorales de una muestra de paciente tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, derrame pleural o muestra de sangre y se cultivan en medio al que se añade un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer para inhibir crecimiento celular.

En algunas realizaciones, el método para inhibir el crecimiento de células tumorigénicas que expresan un marcador de células madre de cáncer comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer *in vivo*. En ciertas realizaciones, el contacto de una célula tumorigénica con un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se lleva a cabo en un modelo animal. Por ejemplo, los xenoinjertos que expresan un marcador de células madre de cáncer se cultivan en ratones inmunocomprometidos (por ej., ratones NOD/SCID) a los que se administra un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer para inhibir el crecimiento tumoral. En algunas realizaciones, las células madre de cáncer que expresan un marcador de células madre de cáncer se aíslan de una muestra de paciente tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, derrame pleural o muestra de sangre y se inyectan en ratones inmunocomprometidos a los que luego se administran un anticuerpo contra el marcador de células madre de cáncer para inhibir el crecimiento de células tumorales. En algunas realizaciones, el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se administra al mismo tiempo o poco después de la introducción de células tumorigénicas en el animal para prevenir el crecimiento del tumor. En algunas realizaciones, el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se administra como un agente terapéutico después de que las células tumorigénicas hayan crecido hasta un tamaño especificado.

La presente divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos que se dirigen a un marcador de células madre de cáncer. Estas composiciones farmacéuticas tienen utilidad en la inhibición del crecimiento de células tumorales y el tratamiento del cáncer en pacientes humanos.

Las formulaciones se preparan para almacenamiento y uso combinando un anticuerpo purificado de la presente divulgación, un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, vehículo, excipiente) (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª Edición Mack Publishing, 2000). Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, tampones no tóxicos tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro de sodio; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (por ejemplo, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico, alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, menos de aproximadamente 10 restos de aminoácidos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; carbohidratos tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ej., complejos de Zn-proteína) y tensioactivos no iónicos tales como TWEEN o polietilenglicol (PEG).

La composición farmacéutica de la presente divulgación se puede administrar mediante diversas maneras para el tratamiento local o sistémico. La administración puede ser tópica (tal como a las membranas mucosas incluyendo administración vaginal y rectal) tales como parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos; pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador, intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica); oral; o parenteral incluyendo inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal (por ejemplo, intratecal o intraventricular).



La formulación terapéutica puede estar en forma farmacéutica unitaria. Tales formulaciones incluyen comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones en agua o medios no acuosos, o supositorios para administración oral, parenteral o rectal o para administración por inhalación. En composiciones sólidas tales como comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un vehículo farmacéutico. Los ingredientes de formación de tabletas convencionales incluyen almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas y otros diluyentes (por ejemplo agua) para formar una composición sólida de preformulación que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente divulgación o una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable del mismo. La composición de preformulación sólida se subdivide a continuación en formas farmacéuticas unitaria del tipo descrito anteriormente. Los comprimidos, píldoras, etc. de la nueva composición pueden revestirse o combinarse de otro modo para proporcionar una forma farmacéutica que proporcione la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o pastilla 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 disgregación y permite que el componente interior pase intacto a través del estómago o se retrase en su liberación. Se pueden usar diversos materiales para tales capas entéricas o revestimientos, incluyendo tales materiales una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen anticuerpos de la presente divulgación formando complejos con liposomas (Epstein, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang, et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 y las patentes US-4.485.045 y US-4.544.545). Los liposomas con un mayor tiempo de circulación se describen en la patente US-5.013.556. Algunos liposomas pueden generarse mediante la evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

Los anticuerpos también pueden ser atrapados en microcápsulas. Tales microcápsulas se preparan, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones como se describe en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

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

En algunas realizaciones, el tratamiento implica la administración combinada de un anticuerpo de la presente divulgación y un agente quimioterapéutico o cóctel de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. El tratamiento con un anticuerpo puede ocurrir antes, simultáneamente con, o después de la administración de quimioterapias. Las quimioterapias contempladas en la divulgación incluyen sustancias químicas o fármacos que son conocidos en la técnica y están comercializados, tales como doxorubicina, 5-Fluorouracilo, citosina arabinósido ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citotóxina, taxol, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina y carboplatino. La administración combinada puede incluir la coadministración, ya sea en una única formulación farmacéutica o usando formulaciones separadas, o la administración consecutiva en cualquier orden, pero generalmente dentro de un periodo de tiempo de tal modo que todos los agentes activos pueden ejercer sus actividades biológicas de forma simultánea. La preparación y los programas de administración para tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según lo determinado empíricamente por el experto en la materia. Los esquemas de preparación y posológicos para tal quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams y Wilkins, Baltimore, Maryland (1992).

En otras realizaciones, el tratamiento implica la administración combinada de un anticuerpo de la presente divulgación y radioterapia. El tratamiento con el anticuerpo puede ocurrir antes, simultáneamente con, o después de la administración de la radioterapia. Se puede usar cualquier esquema posológico para tal terapia de radiación según lo determinado por el experto en la materia.

En otras realizaciones, el tratamiento puede implicar la administración combinada de anticuerpos de la presente divulgación con otros anticuerpos contra antígenos asociados a tumores adicionales incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos que se unen a EGFR, HER2 y VEGF. Además, el tratamiento puede incluir la administración de una o más citocinas, puede ir acompañado de la extirpación quirúrgica de células cancerosas o cualquier otra terapia que el médico responsable del tratamiento considere necesaria.

Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo de la presente divulgación dependiendo del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y curso de la enfermedad, la capacidad de respuesta de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines terapéuticos o preventivos, el tratamiento previo, la historia clínica del paciente, etc., será a discreción del médico tratante. El anticuerpo se puede administrar una vez o más de una serie de tratamientos que duran de varios días a varios meses, o hasta que se consigue una curación o se consigue una disminución del estado patológico (por ejemplo, reducción en el tamaño del tumor). Los esquemas posológicos óptimos se pueden calcular a partir de las mediciones de la acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente y variarán dependiendo de la potencia relativa de un anticuerpo individual. El médico que lo administra puede determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. En general, la dosificación es de 0,01 µg a 100 mg por kg de peso corporal y puede administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente. El médico tratante puede estimar las tasas de repetición para la dosificación basándose en los tiempos de residencia medidos y las concentraciones del fármaco en fluidos corporales o tejidos.

La presente divulgación proporciona kits que comprenden los anticuerpos descritos en la presente memoria y que pueden usarse para realizar los métodos descritos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, un kit comprende al menos un anticuerpo purificado contra un marcador de células madre de cáncer en uno o más recipientes. En algunas realizaciones, los kits contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para realizar un ensayo de detección, incluyendo todos los controles, instrucciones para la realización de los ensayos y cualquier software necesario para el análisis y presentación de resultados. Un experto en la materia reconocerá fácilmente que los anticuerpos divulgados de la presente divulgación se pueden incorporar fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en la técnica.

Las realizaciones de la presente divulgación se pueden definir adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos, que describen en detalle la preparación de anticuerpos de la presente divulgación y métodos para usar anticuerpos de la presente divulgación. Será evidente para los expertos en la materia que se pueden aplicar muchas modificaciones, tanto a materiales como a métodos, sin apartarse del alcance de la presente divulgación. Siempre que sea posible, se utilizarán los mismos números de referencia a lo largo de los dibujos para referirse a las mismas o partes similares.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Producción de anticuerpos anti-FZD

Producción de antígenos

Se generaron fragmentos de polipéptidos recombinantes del dominio extracelular de receptores FZD humanos como antígenos para la producción de anticuerpos. Se utilizó tecnología de ADN recombinante estándar para aislar los polinucleótidos que codifican los aminoácidos 1-227 de FZD10 (SEQ ID NO: 1), los aminoácidos 1-255 de FZD7 (SEQ ID NO: 2), los aminoácidos 1-233 de FZD5 (SEQ ID NO: 3), los aminoácidos 1-207 de FZD6 (SEQ ID NO: 4), los aminoácidos 1-224 de FZD4 (SEQ ID NO: 5) y los aminoácidos 1-158 de FZD8 (SEQ ID NO: 6). Estos polinucleótidos se ligaron en el marco N-terminal a una etiqueta de Fc o etiqueta de histidina humanas y se clonaron en un vector de plásmido de transferencia para la expresión mediada por baculovirus en células de insecto. Se usaron protocolos estándar de transfección, infección y cultivo celular para producir células de insecto recombinantes que expresan los polipéptidos FZD correspondientes (O'Reilly et al., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

La escisión de la secuencia señal endógena de receptores FZD humanos se aproximó utilizando el software de predicción de escisión SignalP 3.0, sin embargo el punto de escisión real *in vivo* puede diferir en un par de aminoácidos en cualquier dirección. La escisión predicha de FZD10 está entre los aminoácidos 20 y 21, por lo tanto, la proteína antígeno FZD10 comprende aproximadamente desde el aminoácido 21 hasta el aminoácido 227. La escisión predicha de FZD7 se encuentra entre los aminoácidos 31 y 32, por lo tanto, la proteína antígeno FZD7 comprende aproximadamente los aminoácidos 32 a 255. La escisión predicha de FZD5 se encuentra entre los aminoácidos 26 y 27, por lo tanto, la proteína antígeno FZD5 comprende aproximadamente desde el aminoácido 27 hasta el aminoácido 233. La escisión predicha de FZD6 se encuentra entre los aminoácidos 17 y 18, por lo tanto, la proteína antígeno FZD6 comprende aproximadamente desde el aminoácido 18 hasta el aminoácido 207. La escisión predicha de FZD4 se encuentra entre los aminoácidos 39 y 40, por lo tanto, la proteína antígeno FZD4 comprende aproximadamente desde el aminoácido 40 hasta el aminoácido 224. La escisión predicha de FZD8 se encuentra entre los aminoácidos 27 y 28, por lo tanto, la proteína antígeno FZD8 comprende aproximadamente desde el aminoácido 28 hasta el aminoácido 158.

La proteína antígeno se purificó a partir de un medio acondicionado de células de insecto usando cromatografía de afinidad de proteína A y quelato Ni<sup>2+</sup>. La proteína antígeno purificada se dializó frente a PBS (pH = 7), se concentró hasta aproximadamente 1 mg/ml y se filtró estérilmente para su preparación para la inmunización.

Inmunización

Se inmunizaron ratones (n = 3) con proteína antígeno FZD10, FZD7, FZD5, FZD6, FZD4 y FZD8 purificada (Antibody Solutions, Mountain View, CA) usando técnicas estándar. La sangre de ratones individuales se rastreó aproximadamente 70 días después de la inmunización inicial para el reconocimiento de antígeno usando análisis ELISA y FACS (descrito con detalle más adelante). Los dos animales con los títulos de anticuerpos más altos se seleccionaron en cuanto al refuerzo de antígeno final después de lo cual se aislaron células de bazo para la producción de hibridomas. Las células de hibridoma se sembraron en placas a razón de 1 célula por pocillo en placas de 96 pocillos y el sobrenadante de cada pocillo se examinó mediante análisis ELISA y FACS contra la proteína antígeno. Se seleccionaron varios hibridomas con un alto título de anticuerpos y se aumentó de escala en un cultivo de matraz estático. Los anticuerpos se purificaron a partir del sobrenadante de hibridoma usando cromatografía de agarosa con proteína A o proteína G. Los anticuerpos monoclonales purificados se probaron de nuevo mediante FACS y se isotiparon para seleccionar anticuerpos IgG e IgM.

15 Cartografía de epítomos

Para identificar anticuerpos que reconocen regiones específicas del dominio extracelular de FZD incluyendo el dominio rico en cisteína, se realiza la cartografía de los epítomos. Los vectores plásmidos de expresión en mamífero que comprenden un promotor de CMV en dirección 5' de polinucleótidos que codifican fragmentos del dominio FZD extracelular se generan usando tecnología de ADN recombinante estándar. Las proteínas recombinantes se expresan a continuación en células de mamífero cultivadas mediante transfección transitoria. De 24 a 48 horas después de la transfección, se recogen las células y se separa la proteína de lisado celular en geles de acrilamida SDS-PAGE para la transferencia Western usando anticuerpos de ratones inmunizados con el antígeno FZD. Los anticuerpos que reconocen el dominio de unión al ligando de FZD pueden analizarse adicionalmente para determinar la unión competitiva con proteínas Wnt mediante ELISA.

Para identificar epítomos específicos dentro de los dominios extracelulares reconocidos por un anticuerpo contra FZD se utiliza el sistema SPOTs (Sigma Genosys, The Woodlands, TX). Se sintetizan una serie de péptidos lineales de 10 restos que se superponen por un aminoácido y que cubren todo el dominio extracelular de FZD y se unen covalentemente a una membrana de celulosa mediante la técnica de síntesis SPOT. La membrana se preincuba durante 8 horas a temperatura ambiente con tampón de bloqueo y se hibrida con anticuerpo durante la noche a 4 °C. A continuación se lava la membrana, se incuba con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ), se vuelve a lavar y se visualiza con solución de desarrollo de señal que contiene 3-amino-9-etilcarbazol. Se determinan así los epítomos específicos reconocidos por un anticuerpo.

Análisis FACS

Para seleccionar los anticuerpos monoclonales producidos por clones de hibridomas que reconocen la proteína FZD nativa de la superficie celular, se utilizó el análisis FAC. Se transfectaron células HEK293 con un vector de expresión que codifica un clon de ADNc de longitud completa del FZD correspondiente, solo (FZD10) o co-transfectado con un vector que expresa GFP (FZD7, FZD5, FZD6, FZD4 y FZD8). En el caso de los vectores de expresión FZD10, FZD7, FZD6 y FZD4, se introdujo la etiqueta de epítopo Flag en el extremo amino, lo que permitió la verificación de la expresión de los receptores FZD etiquetados en la superficie celular. Veinticuatro a 48 horas después de la transfección, las células se recogieron en suspensión y se incubaron en hielo con anticuerpos anti-FZD, anticuerpos anti-FLAG, suero inmune (para células que expresan FZD5) o IgG de control para detectar la unión de anticuerpos de fondo. Las células se lavaron y se detectaron anticuerpos primarios con anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados con un cromóforo fluorescente. Las células marcadas se clasificaron entonces mediante FACS para identificar los anticuerpos anti-FZD que reconocen específicamente la expresión en la superficie celular del correspondiente receptor FZD. Se identificaron los anticuerpos que reconocen FZD10 (Fig. 1A); FZD7 (Fig. 1B); FZD5 (Fig. 1C); FZD6 (Fig. 1D); FZD4 (Fig. 1E) y FZD8 (Fig. 1F). Los anticuerpos que reconocen FZD1, FZD2, FZD3 y FZD9 se generan de forma similar usando la unión del ligando extracelular como antígeno para la inmunización de ratones.

55 Anticuerpos quiméricos

Después de que se identifican anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente un receptor FZD, estos anticuerpos se modifican para superar la respuesta inmunitaria de anticuerpo anti-ratón (HAMA) humano cuando se usan anticuerpos de roedor como agentes terapéuticos. Las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal seleccionado se aíslan por RT-PCR a partir de células de hibridoma y se ligan en el marco de lectura con regiones constantes de la cadena pesada y de la cadena ligera kappa de la IgG1 humana respectivamente en vectores de expresión de mamíferos. Como alternativa, se utiliza un vector de expresión de Ig humana tal como TCAE 5.3 que contiene los genes de la región constante de la cadena pesada y de la cadena ligera kappa de la IgG1 humana en el mismo plásmido (Preston et al., 1998, Infection & Immunity 66: 4137-42). Los vectores de expresión que codifican cadenas pesadas y ligeras quiméricas se co-transfectan a continuación en células de ovario de hámster chino (CHO) para la producción de anticuerpos quiméricos. La inmunorreactividad y

afinidad de los anticuerpos quiméricos se comparan con los anticuerpos murinos parentales por ELISA y FACS.

#### Anticuerpos humanizados

- 5 Como agentes terapéuticos de anticuerpos quiméricos que todavía son frecuentemente antigénicos, produciendo una respuesta inmunitaria anti-anticuerpo quimérico humano (HACA), los anticuerpos quiméricos contra un receptor FZD pueden someterse a una posterior humanización. Para generar anticuerpos humanizados, los aspectos clave de los motivos determinantes de la especificidad del anticuerpo, incluyendo potencialmente elementos de las tres secuencias hipervariables cortas, o regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y/o las regiones
- 10 estructurales requeridas para posicionar correctamente las regiones CDR de los dominios variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo descritos anteriormente, se manipulan usando tecnología de ADN recombinante en las secuencias de ADN germinal de genes de anticuerpo de cadena pesada y ligera humana respectivamente, y luego se clonan en un vector de expresión de mamífero para expresión en células CHO. La inmunorreactividad y afinidad de los anticuerpos humanizados se comparan con los anticuerpos quiméricos parentales por ELISA y
- 15 FACS. Adicionalmente, se puede usar mutagénesis dirigida o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc. del anticuerpo humanizado.

#### Anticuerpos humanos

- 20 En algunas realizaciones, los anticuerpos humanos que reconocen específicamente el dominio extracelular de un receptor FZD se aíslan usando la tecnología de presentación en fagos. Se examina una biblioteca de anticuerpos de presentación en fagos que contiene dominios variables de anticuerpos humanos presentados como dominios Fv de cadena única o como dominios Fab para el reconocimiento específico y de alta afinidad de un antígeno de receptor FZD descrito anteriormente. Las secuencias de anticuerpo de dominio variable identificadas se reformatean a
- 25 continuación en un vector de expresión de Ig que contiene cadena pesa y cadena ligera kappa de IgG1 humana para la expresión de anticuerpos humanos en células CHO.

#### Ejemplo 2

- 30 Producción de anticuerpos que reconocen múltiples miembros de la familia FZD

Para dirigir más de un receptor FZD humano, se generan anticuerpos que reconocen específicamente múltiples miembros de la familia de receptores FZD. Las proteínas solubles que comprenden los dominios N-terminal de unión a ligandos de Frizzled o Fri de FZD4, FZD5 y FZD8 fusionados a Fc humano se unen a e impiden la señalización de

35 todas las clases de ligandos de Wnt que señalan mediante mecanismos que incluyen la estabilización de beta catenina incluyendo Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a y Wnt7b (Fig. 2). Específicamente, las células HEK 293 transfectadas de forma estable con el indicador 8xTCF-luciferasa se incubaron con cantidades crecientes de receptores solubles de FZD Fc en presencia de diferentes ligandos de Wnt incluyendo Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a y Wnt7b. Las proteínas de fusión FZD4 Fc, FZD5 Fc y FZD8 Fc inhibieron la señalización de Wnt mediada por los

40 cinco ligandos de Wnt (Fig. 2). Así, en ciertas realizaciones, se producen anticuerpos que reconocen específicamente dos o más de los receptores FZD4, FZD5 y FZD8.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos se generan como se describe en detalle en el Ejemplo 1 mediante la inmunización de ratones con uno o más de los antígenos del receptor FZD. Los anticuerpos generados contra cada

45 receptor FZD se someten a continuación a una prueba de reactividad cruzada con otros receptores FZD. Los anticuerpos que reconocen específicamente FZD2 y FZD6; FZD7 y FZD10; FZD4 y FZD5; FZD4 y FZD8; FZD5 y FZD8 y FZD4, FZD5 y FZD8 se identifican a continuación y se ensayan en cuanto a la capacidad para prevenir el crecimiento de células tumorales como se describe con detalle a continuación.

50 En ciertas realizaciones, se utiliza una biblioteca de presentación en fagos para identificar anticuerpos que reconocen múltiples miembros de la familia FZD. Una región de alta homología entre los dominios N-terminales extracelulares de los receptores FZD humanos se utiliza para cribar la biblioteca de fagos mostrando un dominio de unión al antígeno que reconoce específicamente dos o más receptores FZD. Por ejemplo, una región homóloga de receptores FZD humanos se expresa como una proteína FZD-Fc y la proteína recombinante se recubre en una

55 superficie apropiada a 10 µg/ml. Una biblioteca de fagos humanos se filtra entonces a través de dos rondas de enriquecimiento (Véase, por ejemplo, Griffiths et al., EMBO J. 12:715-34). Los genes que codifican el dominio de unión al antígeno se recuperan después del fago y se usan para construir una molécula completa de anticuerpo humano uniendo el dominio de unión al antígeno con regiones constantes para la expresión en una línea celular hospedadora adecuada. En ciertas realizaciones, los anticuerpos que reconocen FZD2 y FZD6; FZD7 y FZD10;

60 FZD4 y FZD5; FZD4 y FZD8; FZD5 y FZD8 y FZD4, FZD5 y FZD8 se identifican y se ensayan en cuanto a la capacidad para prevenir el crecimiento de células tumorales como se describe con detalle a continuación.

En ciertas realizaciones, se desarrollan anticuerpos que antagonizan la vía de señalización de Wnt interfiriendo con la señalización a través de la vía de señalización canónica Wnt. Por ejemplo, los anticuerpos que reconocen

65 específicamente dos o más de FZD4, FZD5 y FZD8 se identifican mediante la presentación en fagos. En ciertas realizaciones, se desarrollan anticuerpos que antagonizan la vía de señalización Wnt mediante la activación de la vía

de señalización antagónica no canónica Wnt. Por ejemplo, los anticuerpos que reconocen específicamente FZD6 y FZD2 se identifican mediante la presentación en fagos.

### Ejemplo 3

5 Ensayos *in vitro* para evaluar anticuerpos contra un receptor FZD

En este ejemplo se describen ensayos *in vitro* representativos para probar la actividad de anticuerpos generados contra un receptor FZD sobre la proliferación celular, la activación de la vía y la citotoxicidad.

10 Ensayo de proliferación

La expresión de un receptor FZD por diferentes líneas celulares de cáncer se cuantifica usando el análisis Taqman. Las líneas celulares identificadas como que expresan un receptor FZD se siembran a una densidad de 104 células por pocillo en microplacas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se dejan extender durante 24 horas. Posteriormente, las células se cultivan durante 12 horas adicionales en DMEM fresco con FCS al 2 %, punto en el que se añaden anticuerpos anti-FZD frente a anticuerpos de control al medio de cultivo en presencia de BrdU 10  $\mu\text{mol/l}$ . Después del marcado con BrdU, se eliminan los medios de cultivo y se fijan las células a temperatura ambiente durante 30 minutos en etanol y se hacen reaccionar durante 90 minutos con anticuerpo monoclonal anti-BrdU conjugado con peroxidasa (clon BMG 6H8, fragmentos Fab). El sustrato se desarrolla en una solución que contiene tetrametilbenzidina y se detiene después de 15 minutos con 25  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol/l. La reacción de color se mide con un lector de placas ELISA automático usando un filtro de 450 nm (UV Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Todos los experimentos se realizan por triplicado. Se determina la capacidad de los anticuerpos anti-FZD para inhibir la proliferación celular en comparación con los anticuerpos de control.

25 Ensayo de activación de la vía

En ciertas realizaciones, la capacidad de los anticuerpos contra un receptor FZD para bloquear la activación de la vía de señalización Wnt se determina *in vitro*. Por ejemplo, las células HEK 293 cultivadas en DMEM suplementado con antibióticos y FCS al 10 % se cotransfectan con 1) vectores de expresión Wnt7B y FZD10 para activar la vía de señalización Wnt; 2) un vector indicador de tipo silvestre o mutante TCF/Luc que contiene tres u ocho copias del dominio de unión a TCF en dirección 5' de un gen indicador de luciferasa de luciérnaga para medir los niveles de señalización Wnt canónica (Gazit et al., 1999, Oncogene 18:5959-66) y 3) un indicador luciferasa de *Renilla* (Promega, Madison, WI) como un control interno para la eficacia de la transfección. A continuación, se añaden anticuerpos anti-FZD10 y de control al medio de cultivo celular. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se miden los niveles de luciferasa usando un kit de ensayo de luciferasa doble (Promega, Madison, WI) con actividad luciferasa de luciérnaga normalizada para luciferasa de *Renilla*. Se realizan tres experimentos independientes por triplicado. De este modo se determina la capacidad de los anticuerpos FZD10 para inhibir la activación de la vía Wnt.

40 En algunas realizaciones, la capacidad de los anticuerpos contra el receptor FZD10 humano de interferir con la unión del ligando Wnt se determina *in vitro*. Por ejemplo, las células HEK 293 se transfectaron con el indicador de luciferasa Wnt sensible TOPFLASH (Upstate Group LLC, N.º catálogo 21-170) y un vector de expresión de Wnt3A para activar la señalización Wnt endógena en células transfectadas. Se añadió FZD5 Fc soluble que contenía el dominio extracelular (aminoácidos 1-233) de FZD5 unido en el marco de lectura a IgG1 Fc humana al medio de cultivo de células transfectadas para unir Wnt3A bien solo (Fig. 3; Wnt3A con medio HT, barra derecha) o en presencia de varios anticuerpos generados contra FZD5 (Fig. 1C; 44M1-32). En ausencia de anticuerpos anti-FZD5, FZD5 Fc eliminó completamente la señalización de Wnt en células transfectadas, medida por la actividad luciferasa, mientras que la adición de anticuerpos anti-FZD5 que interfieren con la unión del ligando por FZD5 Fc a Wnt3A, restauró la señalización Wnt (Fig. 3).

55 En algunas realizaciones se determina *in vitro* la capacidad de los anticuerpos que se unen específicamente a dos o más receptores FZD humanos (p. FZD2 y FZD6) para antagonizar la señalización canónica Wnt mediada por FZD, por ejemplo, actuando como un agonista de la señalización Wnt no canónica. Por ejemplo, las células HEK 293 se transfectan con el indicador de luciferasa Wnt sensible TOPFLASH. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se añaden al medio de cultivo anticuerpos que reconocen específicamente FZD2 humano y FZD6 o un control de isotipo junto con un ligando Wnt tal como, por ejemplo, Wnt-3a. La activación de la señalización Wnt canónica en presencia y ausencia de anticuerpos se determina a continuación midiendo la actividad luciferasa.

60 Ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento

En ciertas realizaciones, se usan líneas celulares de cáncer que expresan un receptor FZD o células madre de cáncer aisladas de una muestra de paciente pasada como un xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos (como se describe en detalle más adelante) para medir la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediada por un anticuerpo contra un FZD. Las células se suspenden en 200  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con antibióticos y FBS al 5 % a razón de  $10^6$  células/ml. Las células suspendidas se mezclan entonces con 200  $\mu\text{l}$  de

suero o suero inactivado por calor con anticuerpos contra un receptor FZD o anticuerpos de control por triplicado. Las mezclas de células se incuban durante 1 a 4 horas a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células tratadas se recogen a continuación, se resuspenden en 100 µl de anexina V marcada con FITC diluida en medio de cultivo y se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añaden cien microlitros de una solución de yoduro de propidio (25 µg/ml) diluida en HBSS y se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se recogen, se resuspenden en medio de cultivo y se analizan por citometría de flujo. La citometría de flujo de células teñidas con FITC proporciona recuentos celulares totales y la captación de yoduro de propidio por células muertas como porcentaje del número total de células se usa para medir la muerte celular en presencia de suero y anticuerpos frente a un FZD comparado con anticuerpos séricos y de control inactivados por calor. Por lo tanto, se determina la capacidad de los anticuerpos anti-FZD frente a la citotoxicidad dependiente del complemento.

#### Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

En ciertas realizaciones, se utilizan líneas celulares de cáncer que expresan un receptor FZD o células madre de cáncer aisladas de una muestra de pacientes pasadas como un xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos (como se describe en detalle más adelante) para medir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por un anticuerpo contra un receptor FZD. Las células se suspenden en 200 µl de medio de cultivo RPMI 1640 libre de rojo de fenol suplementado con antibióticos y FBS al 5 % a razón de 10<sup>6</sup> células/ml. Se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre periférica heparinizada mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Paque para su uso como células efectoras. Las células diana (T) se mezclan a continuación con células efectoras de PBMC (E) a relaciones E/T de 25:1, 10:1 y 5:1 en placas de 96 pocillos en presencia de al menos un anticuerpo del receptor FZD o un anticuerpo control. Los controles incluyen la incubación de células diana solo y células efectoras solo en presencia de anticuerpo. Las mezclas de células se incuban durante 1 a 6 horas a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. La lactato deshidrogenasa (LDH) liberada, una enzima citosólica estable liberada tras la lisis celular, se mide a continuación mediante un ensayo colorimétrico (CytoTox96 Non-radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, Madison, WI). Los datos de absorbancia a 490 nm se recogen con un lector de placas estándar de 96 pocillos y se corrigen para el ruido de fondo. El porcentaje de citotoxicidad específica se calcula de acuerdo con la fórmula: % de citotoxicidad = 100 x (liberación de LDH experimental - liberación de LDH espontánea efectora - liberación de LDH espontánea diana) / (liberación máxima de LDH diana - liberación de LDH espontánea diana). De este modo se determina la capacidad de los anticuerpos frente a un receptor FZD frente a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

#### Ejemplo 4

Prevenición del crecimiento tumoral *in vivo* utilizando anticuerpos anti-receptor FZD

Este ejemplo describe el uso de anticuerpos anti-receptor FZD para prevenir el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto. En ciertas realizaciones, se preparan células tumorales de una muestra de paciente (biopsia de tumor sólido o derrame pleural) que han sido pasadas como un xenoinjerto en ratones para volver a pasar en animales de experimentación. El tejido tumoral se elimina en condiciones estériles, se corta en trozos pequeños, se corta completamente usando cuchillas estériles y se obtienen suspensiones de células individuales mediante digestión enzimática y rotura mecánica. Específicamente, las células de derramen pleural o los cortes tumorales resultantes se mezclan con colagenasa III ultrapura en medio de cultivo (200-250 unidades de colagenasa por ml) y se incuban a 37 °C durante 3-4 horas con pipeteo ascendente y descendente en una pipeta de 10 ml cada 15-20 minutos. Las células digeridas se filtran a través de una malla de nylon de 45 µm, se lavan con RPMI/FBS al 20 % y se lavan dos veces con HBSS. Las células tumorales disociadas se inyectan entonces subcutáneamente en las almohadillas de grasa mamaria de ratones NOD/SCID para provocar el crecimiento del tumor.

En ciertas realizaciones, las células tumorales disociadas se clasifican primero en células tumorigénicas y no tumorigénicas basadas en marcadores de superficie celular antes de la inyección en animales de experimentación. Específicamente, las células tumorales disociadas como se ha descrito anteriormente se lavan dos veces con solución salina tamponada Hepes (HBSS) que contiene 2 % de suero de ternera inactivado por calor (HICS) y se resuspenden a razón de 10<sup>6</sup> células por 100 µl. Se añaden los anticuerpos y las células se incuban durante 20 minutos sobre hielo seguido de dos lavados con HBSS/HICS al 2 %. Los anticuerpos incluyen anticuerpos anti-ESA (Biomedica, Foster City, CA), anti-CD44, anti-CD24 y marcadores de linaje anti-CD2, -CD3, -CD10, -CD16, -CD18, -CD31, -CD64 y -CD140b (denominados colectivamente Lin, PharMingen, San José, CA). Los anticuerpos se conjugan directamente a fluorocromos para seleccionar positivamente o negativamente las células que expresan estos marcadores. Las células de ratón se eliminan seleccionando frente a las células H2Kd+ y las células muertas se eliminan usando el colorante de viabilidad 7AAD. La citometría de flujo se realiza en un FACSVantage (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Se utilizan perfiles de dispersión lateral y dispersión hacia adelante para eliminar los aglomerados de células. Las células tumorigénicas ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin- aisladas se inyectan a continuación subcutáneamente en ratones NOD/SCID para provocar el crecimiento del tumor.

En ciertas realizaciones se analizaron los anticuerpos anti-FZD6 y anti-FZD5 para determinar su capacidad para reducir el crecimiento de células tumorales de colon de UM-C4. Se inyectaron subcutáneamente células UM-C4 disociadas (10.000 por animal) en la región lateral de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. Dos días

después de la inyección de las células tumorales, los animales se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) con 10 mg/kg de anticuerpos anti-FZD6 o anti-FZD5 dos veces por semana. Se controló el crecimiento tumoral semanalmente hasta que se detectó el crecimiento, después de lo cual se midió el crecimiento tumoral dos veces por semana durante un total de 8 semanas. El tratamiento de animales con anticuerpo anti-FZD6 23M2 y anticuerpo anti-FZD5 44M13 redujo significativamente el crecimiento tumoral en comparación con los controles inyectados con PBS (Fig. 4).

### Ejemplo 5

#### 10 Tratamiento *in vivo* de tumores utilizando anticuerpos anti-receptor FZD

Este ejemplo describe el uso de anticuerpos anti-receptor FZD para tratar el cáncer en un modelo de xenoinjerto. En ciertas realizaciones, se preparan células tumorales de una muestra de paciente (biopsia de tumor sólido o derrame pleural) que han sido pasadas como un xenoinjerto en ratones para volver a pasar en animales de experimentación. Se extrae el tejido tumoral, se corta en trozos pequeños, se corta completamente usando cuchillas estériles y se obtienen suspensiones de células individuales mediante digestión enzimática y rotura mecánica. Las células tumorales disociadas se inyectan a continuación subcutáneamente en las almohadillas de grasa mamaria, en el caso de los tumores de mama, o en el lateral, en el caso de los tumores no mamaros, de ratones NOD/SCID para provocar el crecimiento del tumor. Como alternativa, se aíslan células tumorales tumorigénicas ESA+, CD44+, CD24-/bajo, lin como se ha descrito en detalle anteriormente y se inyectan.

Después de la inyección de células tumorales, se controla el crecimiento tumoral de los animales. Una vez que los tumores alcanzan un tamaño promedio de aproximadamente 150 a 200 mm, comienza el tratamiento con anticuerpos. Cada animal recibe i.p. 100 µg de anticuerpos anti-receptor FZD o anticuerpos de control de dos a cinco veces por semana durante un total de 6 semanas. El tamaño del tumor se evalúa dos veces por semana durante estas 6 semanas. De este modo se determina la capacidad de los anticuerpos anti-receptor FZD para prevenir el crecimiento tumoral adicional o para reducir el tamaño del tumor en comparación con los anticuerpos de control.

En el punto final del tratamiento con anticuerpos, los tumores se recogen para un análisis posterior. En algunas realizaciones, una porción del tumor se analiza por inmunofluorescencia para evaluar la penetración del anticuerpo en el tumor y la respuesta del tumor. Una porción de cada tumor cosechado de ratones tratados con anticuerpo anti-FZD y tratados con anticuerpo de control se congela en fresco en nitrógeno líquido, embebido en O.C.T., y se corta en un criostato en forma de cortes de 10 µm en portaobjetos de vidrio. En algunas realizaciones, una porción de cada tumor está fijada en formalina, embebida en parafina y cortada en un microtomo en forma de corte de 10 µm sobre portaobjetos de vidrio. A continuación se fijan los cortes y se incuban con anticuerpos marcados con cromóforo que reconocen específicamente los anticuerpos inyectados para detectar el anticuerpo anti-receptor FZD o los anticuerpos de control presentes en la biopsia del tumor. Además, los anticuerpos que detectan diferentes tipos de células tumorales y reclutadas por el tumor tales como, por ejemplo, anticuerpos anti-cadherina VE (CD144) o anti-PECAM-1 (CD31) para detectar células endoteliales vasculares, anticuerpos anti-alfa-actina de músculo liso para detectar células de músculo liso vasculares, anticuerpos anti-Ki67 para detectar células en proliferación, ensayos TUNEL para detectar células moribundas, anticuerpos anti-β-catenina para detectar la señalización Wnt y anticuerpos anti-fragmento del dominio intracelular (ICD) Notch utilizado para detectar la señalización Notch, se pueden usar para evaluar los efectos del tratamiento con anticuerpos sobre, por ejemplo, la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la morfología tumoral.

En ciertas realizaciones, se evalúa también el efecto del tratamiento con anticuerpos anti-receptor FZD en la expresión de genes de células tumorales. El ARN total se extrae de una porción de cada tumor cosechado de ratones tratados con anticuerpo anti-FZD y tratados con anticuerpo de control y se usan para la RT-PCR cuantitativa. Los niveles de expresión de los receptores FZD, componentes de la vía de señalización Wnt que incluyen, por ejemplo, Wnt1 y β-catenina, así como marcadores de células madre de cáncer de adición previamente identificados (por ej., CD44) se analizan en relación con el gen constitutivo GAPDH como control interno. Por lo tanto, se determinan los cambios en la expresión génica de las células tumorales tras el tratamiento con anticuerpos anti-receptor FZD.

Además, se evalúa el efecto del tratamiento con anticuerpos anti-receptor FZD sobre la presencia de células madre de cáncer en un tumor. Las muestras de tumores de ratones tratados con FZD frente a anticuerpo de control se cortan en trozos pequeños, se trituran completamente usando cuchillas estériles y se obtienen suspensiones de células individuales mediante digestión enzimática y rotura mecánica. Las células tumorales disociadas se analizan a continuación mediante análisis FACS para determinar la presencia de células madre de cáncer tumorigénicas basándose en la expresión del marcador de células superficial ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin- como se ha descrito con detalle anteriormente.

A continuación, puede evaluarse la tumorigenicidad de las células aisladas basándose en la expresión de ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin- tras el tratamiento con anticuerpos anti-FZD. Las células madre de cáncer ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin- aisladas de ratones tratados con anticuerpo anti-FZD frente a anticuerpo de control se reinyectan subcutáneamente en las almohadillas de grasa mamaria de ratones NOD/SCID. A continuación se determina la

tumorigenicidad de las células madre de cáncer basándose en el número de células inyectadas requeridas para la formación de tumores consistentes.

### Ejemplo 6

5

Tratamiento del cáncer humano usando anticuerpos anti-receptor FZD

Este ejemplo describe métodos para tratar el cáncer usando anticuerpos anti-receptor FZD para dirigir tumores que comprenden células madre de cáncer y/o células tumorales en las que se ha detectado la expresión del receptor FZD. La presencia de la expresión de marcadores de células madre de cáncer puede determinarse primero a partir de una biopsia de tumor. Las células tumorales de una biopsia de un paciente diagnosticado con cáncer se separan en condiciones estériles. En algunas realizaciones la biopsia de tejido se congela en fresco en nitrógeno líquido, se embebe en O.C.T., y se corta en un criostato en forma de cortes de 10 µm sobre portaobjetos de vidrio. En algunas realizaciones, la biopsia de tejido está fijada en formalina, embebida en parafina y se corta en un microtomo en forma de cortes de 10 µm sobre portaobjetos de vidrio. Los cortes se incuban con anticuerpos anti-receptor FZD para detectar la expresión de la proteína.

También se puede determinar la presencia de células madre de cáncer. Las muestras de biopsia de tejido se cortan en trozos pequeños, se trituran completamente usando cuchillas estériles y las células se someten a digestión enzimática y rotura mecánica para obtener una suspensión de células individuales. Las células tumorales disociadas se incuban a continuación con anticuerpos anti-ESA, -CD44, -CD24, -Lin y FZD para detectar células madre de cáncer y la presencia de células madre tumorales ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin-, FZD+ se determina por citometría de flujo como se ha descrito con detalle anteriormente.

Los pacientes de cáncer cuyos tumores se diagnostican como que expresan un receptor FZD se tratan con anticuerpos anti-receptor FZD. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-FZD monoclonales humanizados o humanos generados como se ha descrito anteriormente se purifican y formulan con un vehículo farmacéutico adecuado para inyección. En algunas realizaciones, los pacientes son tratados con los anticuerpos anti-FZD al menos una vez al mes durante al menos 10 semanas. En algunas realizaciones, los pacientes se tratan con los anticuerpos anti-FZD al menos una vez a la semana durante al menos aproximadamente 14 semanas. Cada administración del anticuerpo debe ser una dosis farmacéuticamente eficaz. En algunas realizaciones, se administra entre aproximadamente 2 a aproximadamente 100 mg/ml de un anticuerpo anti-FZD. En algunas realizaciones se administra entre aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mg/ml de un anticuerpo anti-FZD. El anticuerpo puede administrarse antes, simultáneamente con, o después de regímenes de radioterapia o regímenes de quimioterapia convencionales usando uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como oxaliplatino, fluorouracilo, leucovorina o estreptozocina. Los pacientes son controlados para determinar si dicho tratamiento ha dado como resultado una respuesta antitumoral, por ejemplo, basándose en la regresión del tumor, reducción en la incidencia de nuevos tumores, menor expresión de antígenos tumorales, disminución del número de células madre de cáncer u otros medios de evaluación del pronóstico de la enfermedad.

40

Otras realizaciones de la divulgación serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la consideración de la memoria descriptiva y práctica de la invención descrita en la presente memoria.

### LISTADO DE SECUENCIAS

45

<110> OncoMed Pharmaceuticals, Inc.

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

50

<130> HMK/FP6810618

<140> EP

<141> 31-10-2006

55

<150> EP 06844236.7

<151> 31-10-2006

<150> PCT/US2006/042375

<151> 31-10-2006

60

<150> US 60/812.966

<151> 13-06-2006

<150> US 60/731.468

65

<151> 31-10-2005



<160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

5

<210> 1

<211> 226

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> dominio extracelular N-terminal de FZD10 humano recombinante

<400> 1

ES 2 641 087 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Phe  
 225

<210> 2  
 <211> 255

ES 2 641 087 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> dominio extracelular N-terminal de FZD7 humano recombinante

<400> 2

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

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

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

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

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

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

ES 2 641 087 T3

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

<210> 3  
 <211> 233  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> dominio extracelular N-terminal de FZD5 humano recombinante

10 <400> 3

ES 2 641 087 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Phe Ser Ala Asp Glu Arg Thr  
225 230

<210> 4  
<211> 207  
<212> PRT

ES 2 641 087 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio extracelular N-terminal de FZD6 humano recombinante

5

<400> 4

Met Glu Met Phe Thr Phe Leu Leu Thr Cys Ile Phe Leu Pro Leu Leu  
1 5 10 15

Arg Gly His Ser Leu Phe Thr Cys Glu Pro Ile Thr Val Pro Arg Cys  
20 25 30

Met Lys Met Ala Tyr Asn Met Thr Phe Phe Pro Asn Leu Met Gly His  
35 40 45

Tyr Asp Gln Ser Ile Ala Ala Val Glu Met Glu His Phe Leu Pro Leu  
50 55 60

Ala Asn Leu Glu Cys Ser Pro Asn Ile Glu Thr Phe Leu Cys Lys Ala  
65 70 75 80

Phe Val Pro Thr Cys Ile Glu Gln Ile His Val Val Pro Pro Cys Arg  
85 90 95

Lys Leu Cys Glu Lys Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr  
100 105 110

Phe Gly Ile Arg Trp Pro Glu Glu Leu Glu Cys Asp Arg Leu Gln Tyr  
115 120 125

Cys Asp Glu Thr Val Pro Val Thr Phe Asp Pro His Thr Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Pro Gln Lys Lys Thr Glu Gln Val Gln Arg Asp Ile Gly Phe Trp  
145 150 155 160

Cys Pro Arg His Leu Lys Thr Ser Gly Gly Gln Gly Tyr Lys Phe Leu  
165 170 175

Gly Ile Asp Gln Cys Ala Pro Pro Cys Pro Asn Met Tyr Phe Lys Ser  
180 185 190

Asp Glu Leu Glu Phe Ala Lys Ser Phe Ile Gly Thr Val Ser Ile  
195 200 205

10

<210> 5

<211> 224

ES 2 641 087 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> dominio extracelular N-terminal de FZD4 humano recombinante

<400> 5

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

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

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

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

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

Gln Leu Thr Thr Phe Thr Pro Leu Ile Gln Tyr Gly Cys Ser Ser Gln  
85 90 95

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

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

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

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

Cys Met Glu Gly Pro Gly Asp Glu Glu Val Pro Leu Pro His Lys Thr  
165 170 175

Pro Ile Gln Pro Gly Glu Glu Cys His Ser Val Gly Thr Asn Ser Asp  
180 185 190

Gln Tyr Ile Trp Val Lys Arg Ser Leu Asn Cys Val Leu Lys Cys Gly  
195 200 205

Tyr Asp Ala Gly Leu Tyr Ser Arg Ser Ala Lys Glu Phe Thr Asp Ile  
210 215 220

10

<210> 6

ES 2 641 087 T3

<211> 158  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> dominio Fri de FZD8 humano recombinante

<400> 6

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1

10



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal aislado que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno que se une específicamente al dominio extracelular de FZD5 humano y FZD8 humano, interfiere con la unión entre Wnt3a y la proteína de fusión FZD5-Fc soluble que comprende los restos de dominio extracelular 1 a 233 de FZD5 humano unido en el marco de lectura al Fc de la IgG1 humana, e inhibe el crecimiento de células tumorales.
2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
- 10 3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.
4. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de FZD5 humano y FZD8 humano.
- 15 5. Una célula hospedadora que contiene un vector que comprende polinucleótidos que codifican cadenas pesadas y ligeras adecuadas para la expresión de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un método de tratamiento del cáncer, comprendiendo el método administrar el anticuerpo en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de células tumorales.
7. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo está conjugado con un resto citotóxico.
- 25 8. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el método comprende administrar al menos un agente terapéutico adicional apropiado para administrar la terapia de combinación.
- 30 9. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde las células tumorales se seleccionan de un tumor de mama, tumor colorrectal, tumor pulmonar, tumor pancreático, tumor de próstata y un tumor de cabeza y cuello.

Anticuerpos anti-FZD10

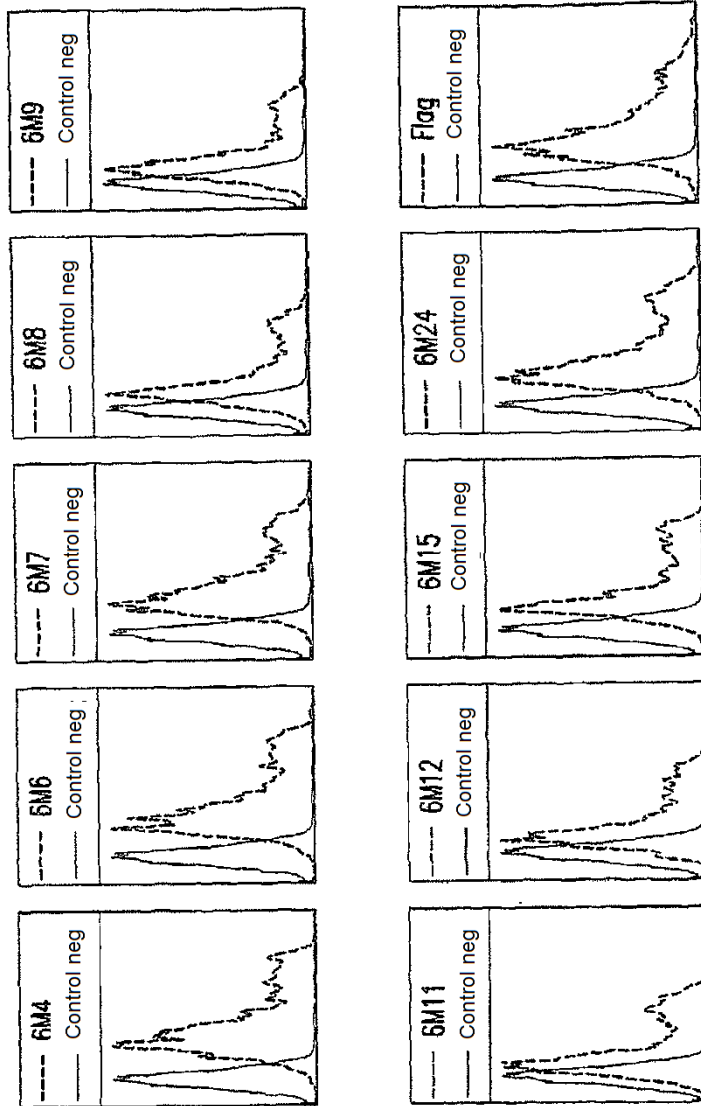
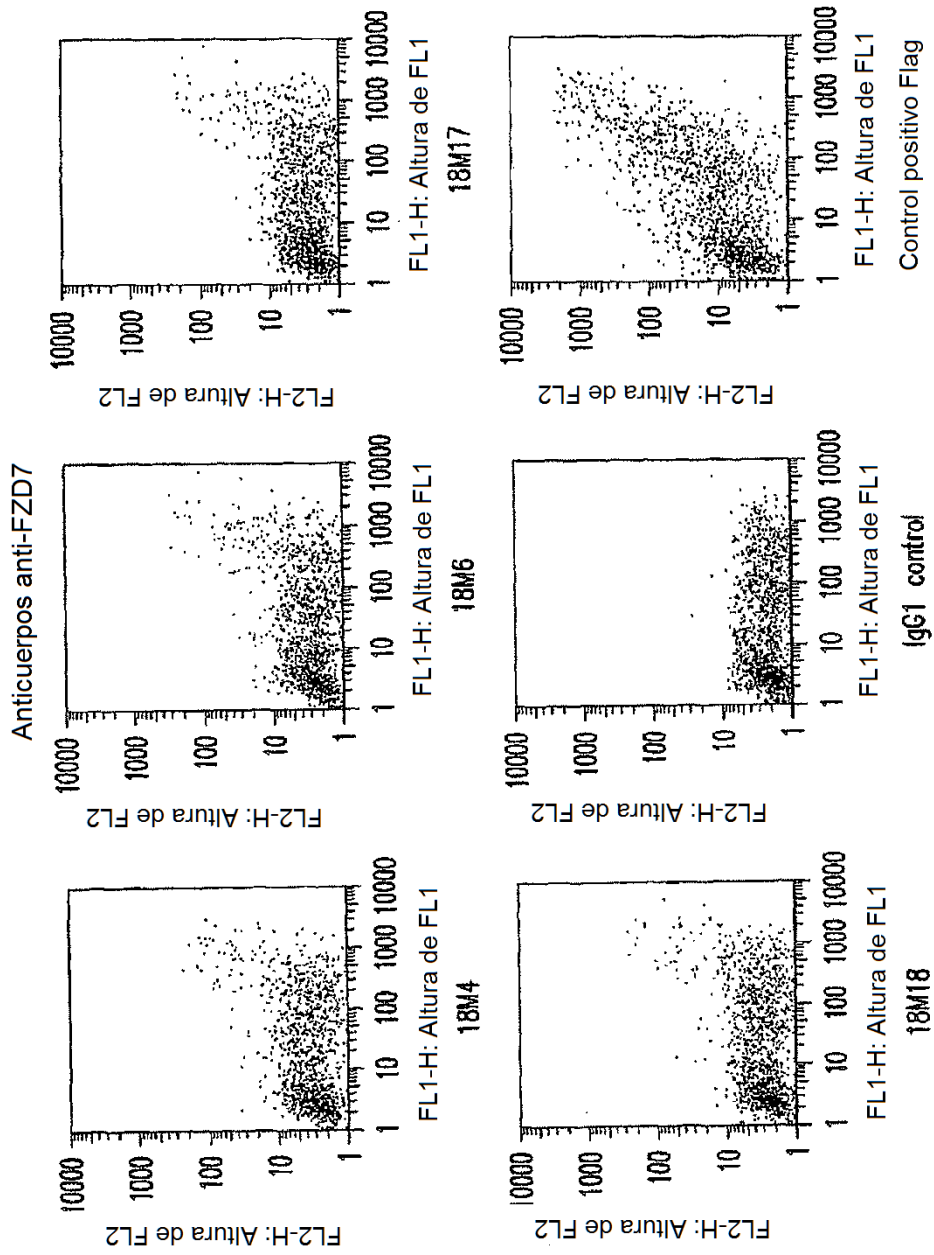


FIG.1A



**FIG.1B**

Anticuerpos anti-FZD5

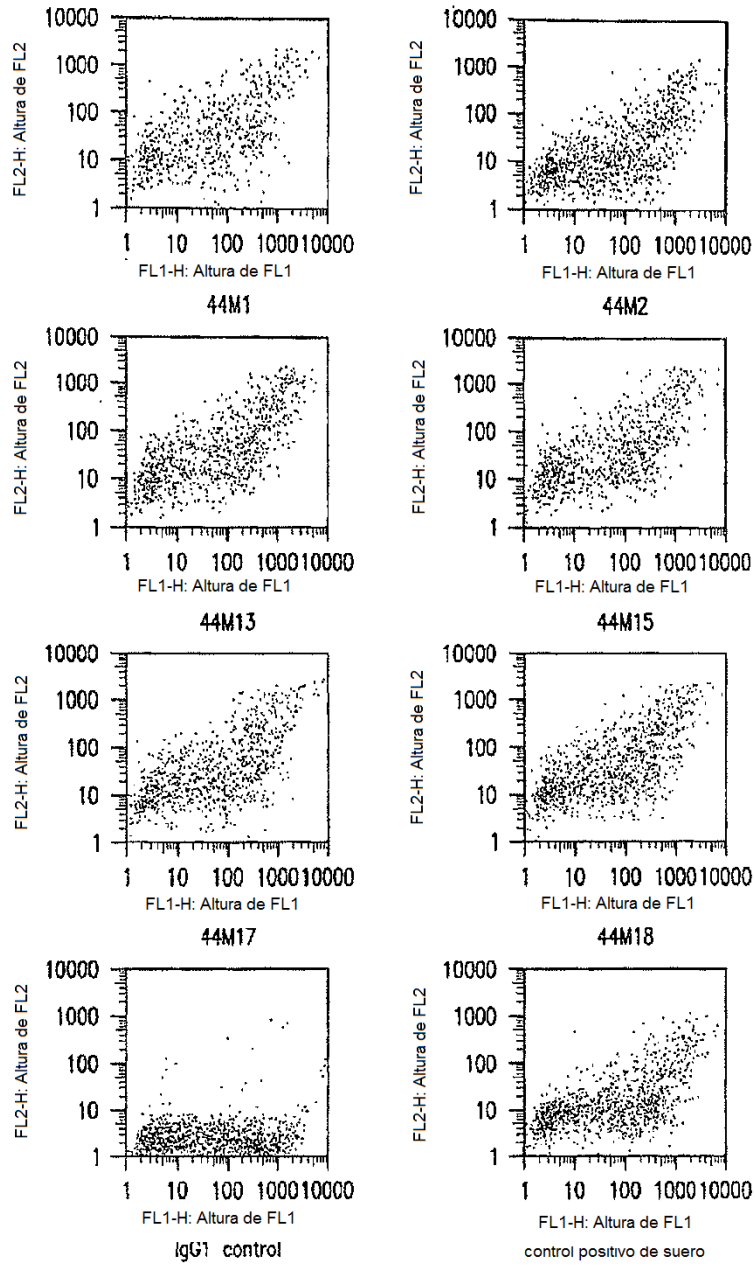


FIG. 1C

Anticuerpos anti-FZD6

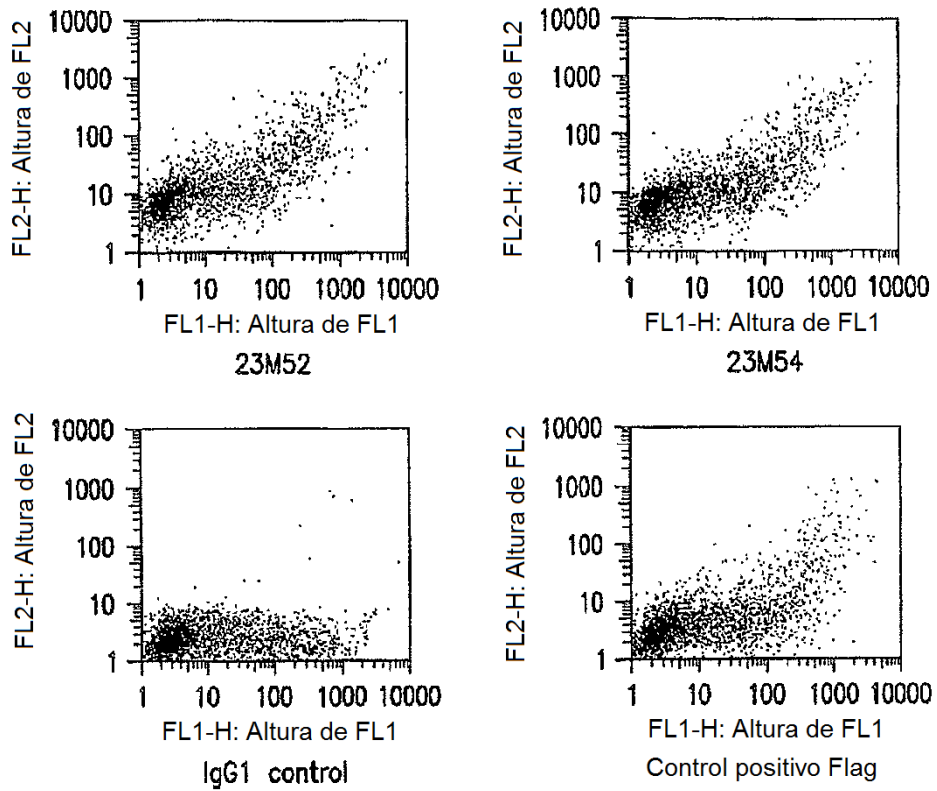


FIG. 1 D

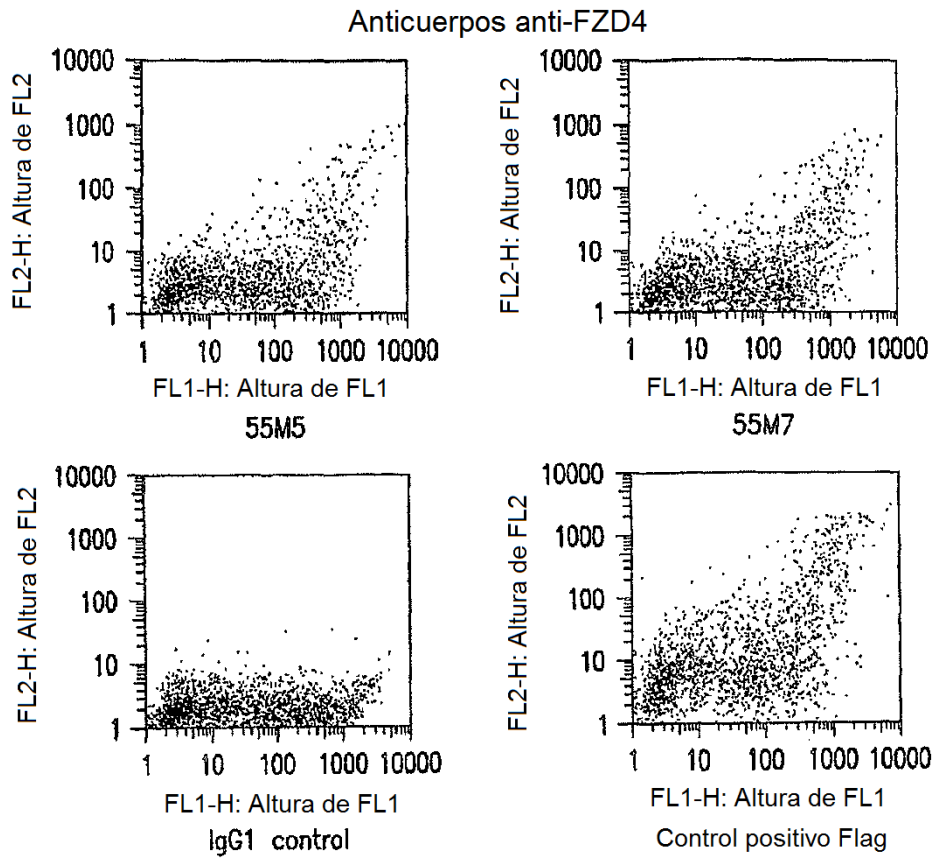


FIG. 1E

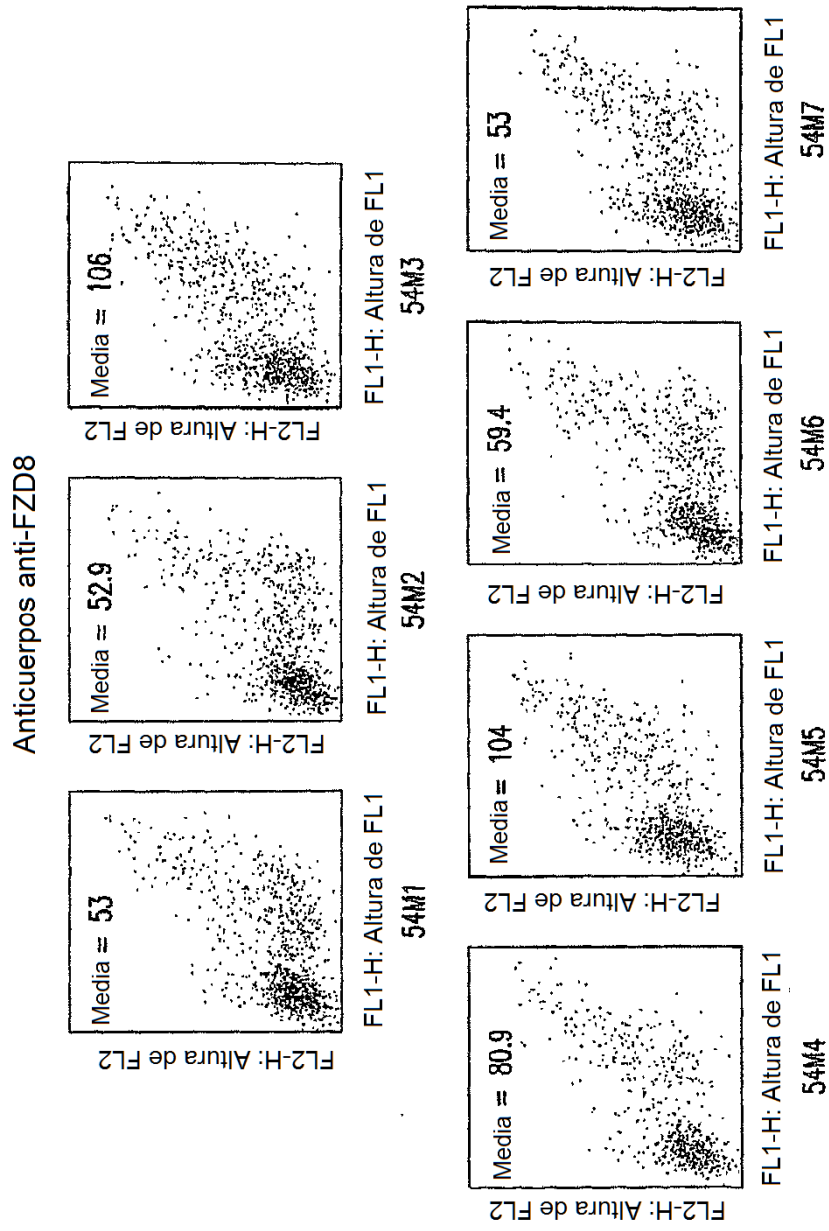


FIG. 1F

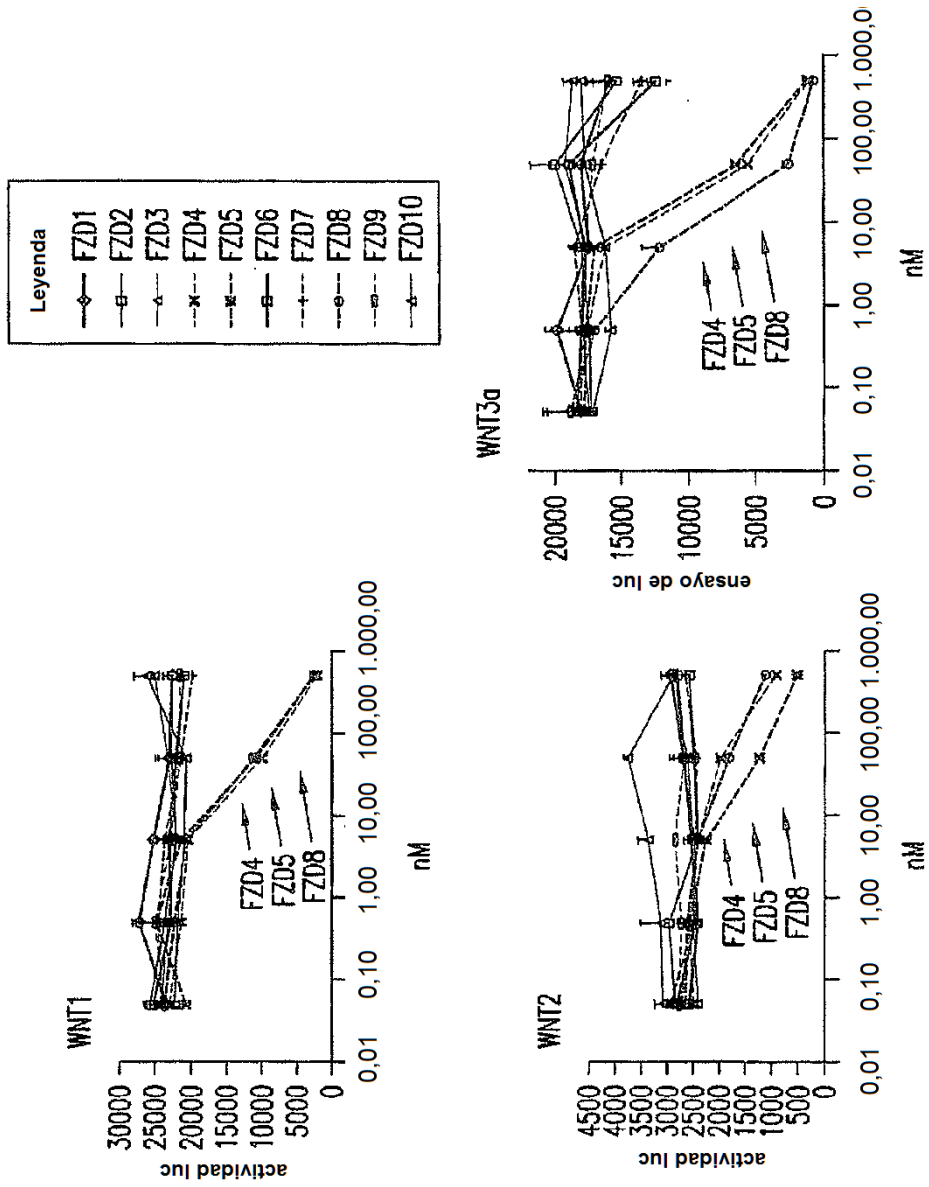


FIG.2A



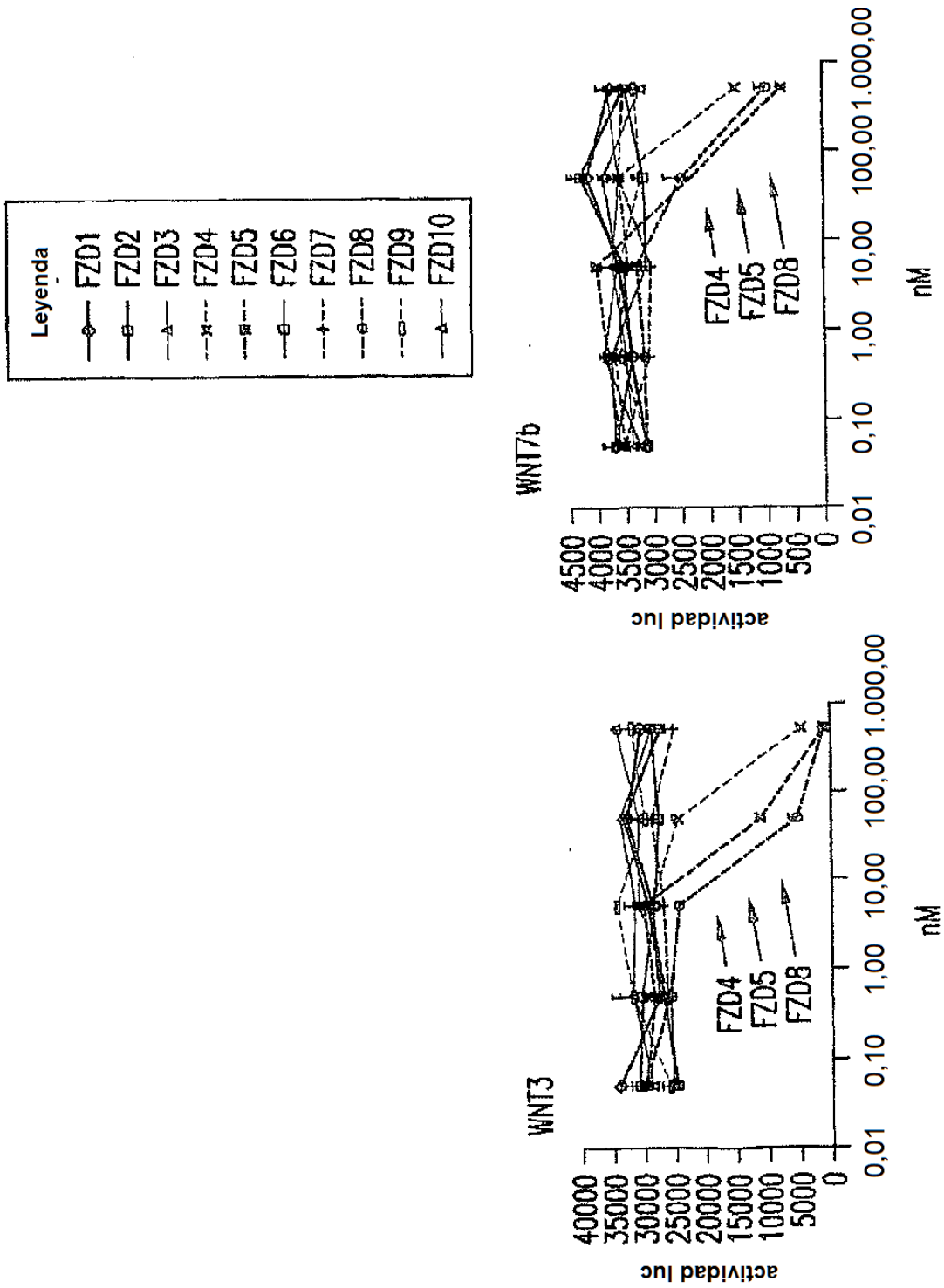
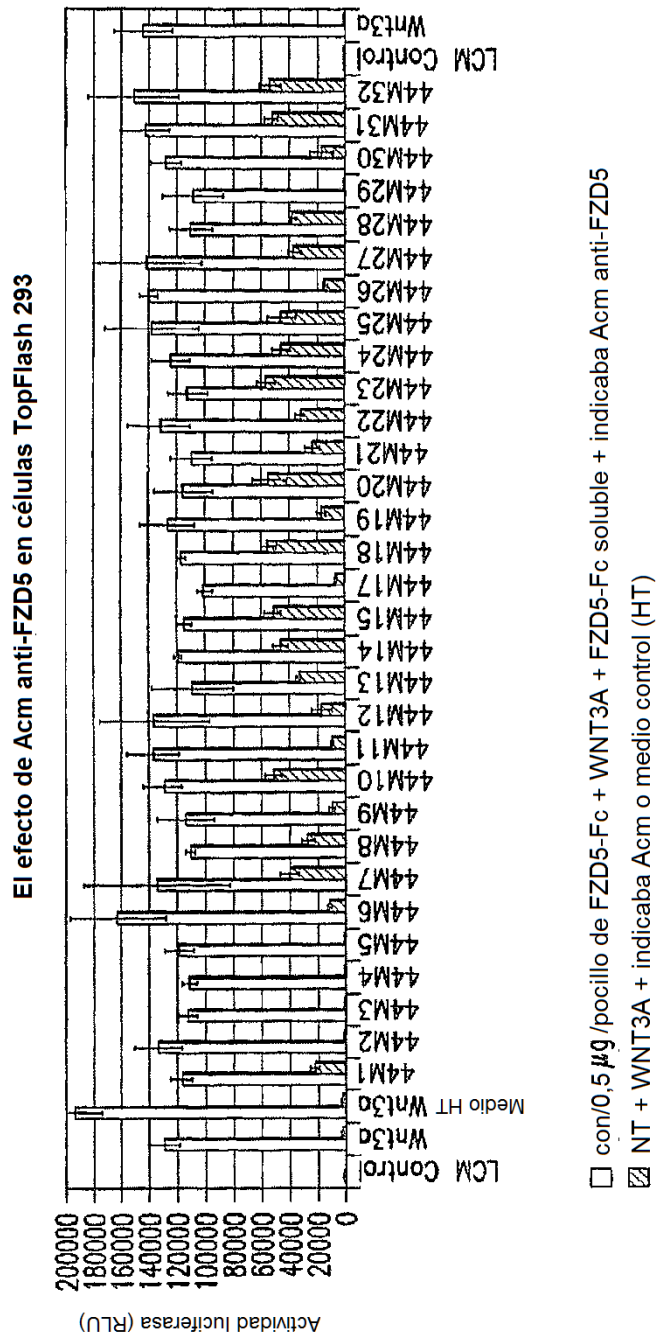


FIG.2B



**FIG.3**

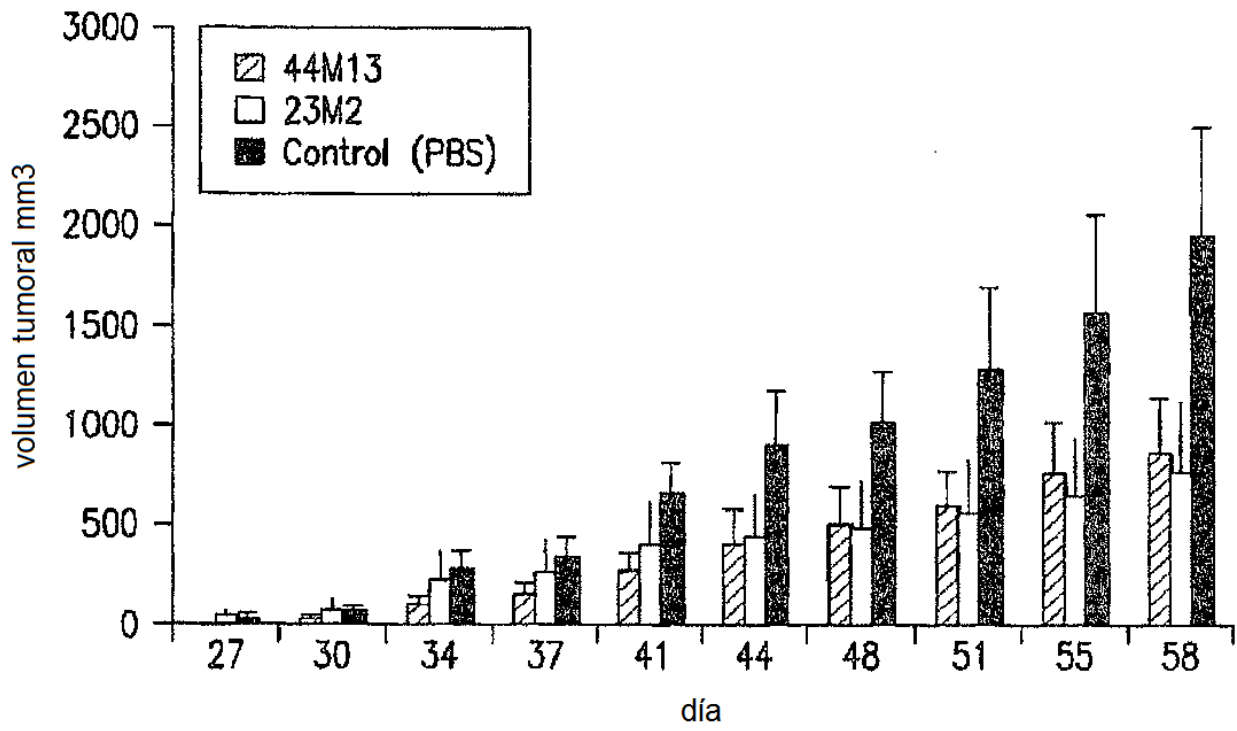


FIG.4