



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 663 536**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2009 PCT/US2009/058635**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **01.04.2010 WO10037041**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2009 E 09817004 (6)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2331136**

⑮ Título: **Agentes que se unen a receptores frizzled y usos de los mismos**

⑩ Prioridad:

**26.09.2008 US 100639 P**  
**12.01.2009 US 144058 P**  
**08.05.2009 US 176741 P**  
**13.01.2009 US 144284 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.04.2018**

⑮ Titular/es:

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

⑮ Inventor/es:

**GURNEY, AUSTIN, L.;**  
**SATO, AARON, KEN;**  
**AXELROD, FUMIKO, TAKADA;**  
**HOEY, TIMOTHY, CHARLES;**  
**SATYAL, SANJEEV, H. y**  
**MITRA, SATYAJIT, SUJIT, KUMAR**

⑮ 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 2 663 536 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

Agentes que se unen a receptores *frizzled* y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

El campo de esta invención se relaciona, en general, con anticuerpos y otros agentes que se unen a uno o a varios receptores *frizzled* humanos, así como con métodos de uso de los anticuerpos u otros agentes para el tratamiento de enfermedades tales como cáncer.

10

**Antecedentes de la invención**

El cáncer es una de las causas principales de muerte en el mundo desarrollado, con más de un millón de personas a las que se les diagnostica cáncer y 500.000 muertes al año únicamente en los Estados Unidos. En general se calcula que más de una de tres personas desarrollarán alguna forma de cáncer a lo largo de su vida. Existen más de 200 tipos diferentes de cáncer, cuatro de los cuales - mama, pulmón, colorrectal y próstata - constituyen más de la mitad de todos los casos nuevos (Jemal et al., 2003, Cáncer *J. Clin.* 53: 5-26).

20 La vía de señalización Wnt se ha identificado como una posible diana para el tratamiento del cáncer. La vía de señalización Wnt es uno de los diversos reguladores críticos de la formación del patrón embrionario, del mantenimiento del tejido posembionario y de la biología de las células madre. De manera más específica, la señalización Wnt juega un papel importante en la generación de polaridad celular y especificación del destino celular que incluye la autorregeneración por poblaciones de células madre. La activación no regulada de la vía Wnt se asocia a numerosos cánceres humanos en el que puede alterar el destino del desarrollo de las células tumorales 25 manteniéndolas en un estado indiferenciado y proliferativo. Por lo tanto, la carcinogénesis puede avanzar al usurpar los mecanismos homeostáticos que controlan el desarrollo normal y la reparación tisular por células madre (revisado en Reya y Clevers, 2005, *Nature* 434:843; Beachy et al., 2004, *Nature* 432:324).

30 La vía de señalización Wnt se explicó por primera vez en el mutante áptero *wg* (del inglés *wingless*) evolutivo de *Drosophila* y a partir del protooncogén murino *int-1*, ahora *Wnt1* (Nusse y Varmus, 1982, *Cell* 31:99-109; Van Ooyen y 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 por lípidos, secretadas, de las cuales 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 5 o 6 relacionada con un receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL, *low-density lipoprotein*), (LRP5/6). Los receptores Fzd son proteínas con siete dominios transmembrana de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés *G-protein coupled receptor*) y contienen un dominio de unión a ligando N terminal extracelular grande con 10 cisteínas conservadas, conocido como dominio rico en cisteína (DRC) o dominio Fri. Existen diez receptores FZD humanos: FZD1-10. Los diferentes DRC (dominios ricos en cisteína) de Fzd tienen afinidades de unión diferentes por las vías Wnt específicas (Wu y Nusse, 2002, *J. Biol. Chem.* 277:41762-9) y los receptores Fzd se han agrupado en los que activan la vía  $\beta$ -catenina canónica y los que activan vías no canónicas descritas más adelante (Miller et al., 1999, *Oncogene* 18:7860-72). Para formar el complejo receptor que se une a los ligandos de FZD, los receptores FZD interaccionan con LRP5/6, proteínas transmembrana de un solo paso, con cuatro dominios extracelulares, similares a los del EGF, separados por seis repeticiones de aminoácidos YWTD (Johnson et al., 2004, *J. Bone Mineral Res.* 19:1749).

45 La vía de señalización Wnt canónica activada tras la unión al receptor está mediada por la proteína citoplasmática *Dishevelled* (Dsh) que interacciona directamente con el receptor Fzd y produce la estabilización citoplasmática y la acumulación de  $\beta$ 3-catenina. En ausencia de una señal Wnt, la  $\beta$ 3-catenina se localiza en un complejo de destrucción citoplasmática que incluye las proteínas supresoras de tumores de la poliposis adenomatosa colónica (PAC) y axina. Estas proteínas actúan como armazones críticos para permitir que la glucógeno sintasa quinasa (GSK)-3 $\beta$  se una y fosforile la  $\beta$ 3-catenina, marcándola para la degradación mediante la vía de ubiquitina/proteasoma. La activación de la proteína Dsh produce la fosforilación de la GSK3 $\beta$  y la disociación del complejo de destrucción. La  $\beta$ 3-catenina citoplasmática acumulada se transporta después al núcleo donde interacciona con las proteínas que se unen al ADN de la familia Tcf/Lef para activar la transcripción.

55 Además de la vía de señalización canónica, los ligandos Wnt también activan vías independientes de  $\beta$ -catenina (Veeman et al., 2003, *Dev. Cell.* 5:367-77). La señalización Wnt no canónica se ha implicado en numerosos procesos pero más convincentemente en los movimientos de gastrulación a través de un mecanismo similar al de la vía de polaridad celular planar (PCP) de *Drosophila*. Otros posibles mecanismos de señalización Wnt no canónica incluyen flujo de calcio, JNK y proteínas G tanto pequeñas como heterotriméricas. Con frecuencia se observa antagonismo entre las vías canónica y no canónica y algunas pruebas indican que la señalización no canónica puede suprimir la formación de cáncer (Olson y Gibo, 1998, *Exp. Cell Res.* 241:134; Topol et al., 2003, *J. Cell Biol.* 162:899-908). Por tanto, en algunos 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 mediante la vía TAK1-NLK (Golan et al., 2004, *JBC* 279:14879- 88). De manera similar, Fzd2 antagoniza la señalización Wnt canónica en presencia de Wnt-5a a través de la cascada TAK1-NLK MAPK (Ishitani

et al., 2003, *Mol. Cell Biol.* 23:131-9).

- La vía de señalización Wnt canónica también juega un papel importante en el mantenimiento de poblaciones de células madre en el intestino delgado y en el colon, y la activación inadecuada de esta vía juega un papel prominente en los cánceres colorrectales (Reya y Clevers, 2005, *Nature* 434:843). El epitelio absorbente del intestino se dispone en vellosidades y criptas. Las células madre residen en las criptas y se dividen lentamente para producir células que proliferan rápidamente lo que da lugar a todas las poblaciones de células diferenciadas que se desplazan hacia fuera de las criptas para ocupar las vellosidades intestinales. La cascada de señalización Wnt juega un papel dominante en el control de los destinos celulares a lo largo del eje cripta-vellosidad y es esencial para el mantenimiento de la población de células madre. La alteración de la señalización Wnt, ya sea por pérdida genética de *Tcf7/2* por recombinación homóloga (Korinek et al., 1998, *Wat. Genet.* 19:379) o por sobreexpresión de *Dickkopf-1* (*Dkk1*), un fuerte 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), produce el empobrecimiento de poblaciones de células madre intestinales.
- El cáncer colorrectal se inicia más comúnmente por mutaciones de activación en la cascada de señalización Wnt. Aproximadamente el 5-10 % de todos los cánceres colorrectales son hereditarios, siendo una de las formas principales la poliposis adenomatosa familiar (PAF), una enfermedad dominante autosómica en la cual aproximadamente el 80 % de las personas afectadas contienen una mutación de línea germinal en el gen de la poliposis adenomatosa colónica (PAC). También se han identificado mutaciones en otros componentes de la vía Wnt que incluyen axina y  $\beta$ -catenina. Los adenomas individuales son excrecencias clónicas de células epiteliales que contienen un segundo alelo inactivado, y la gran cantidad de adenomas PAC da lugar inevitablemente al desarrollo de adenocarcinomas mediante la adición de mutaciones en oncogenes y/o genes supresores de tumores. Además, la activación de la vía de señalización Wnt, que incluye mutaciones de ganancia de función en el gen de la PAC y de la  $\beta$ -catenina, puede 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).

- Primero se descubrió un papel para la señalización Wnt en el cáncer con la identificación de *Wnt1* (originalmente *int1*) como un oncogén en tumores mamarios transformados por la inserción cercana de un virus murino (Nusse y Varmus, 1982, *Cell* 31:99-109). Desde entonces se han acumulado pruebas adicionales del papel de la señalización Wnt en cáncer de mama. Por ejemplo, la sobreexpresión transgénica de la  $\beta$ -catenina en las glándulas mamarias produce hiperplasias y adenocarcinomas (Imbert et al., 2001, *J. Cell Biol.* 153:555-68; Michaelson y Leder, 2001, *Oncogene* 20:5093-9) mientras que la pérdida de señalización Wnt interrumpe el desarrollo normal de las glándulas mamarias (Tepera et al., 2003, *J. Cell Sci.* 116:1137-49; Hatsell et al., 2003, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 8:145-58). Más recientemente, se ha demostrado que las células madre mamarias se activan a través de la señalización Wnt (Liu et al., 2004, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 101:4158). En cáncer de mama humano, la acumulación de  $\beta$ 3-catenina implica señalización Wnt activada en más del 50 % de los carcinomas y a través de mutaciones específicas aún no identificadas, se ha observado regulación por aumento de la expresión del receptor frizzled (Brennan & Brown, 2004, *J. Mammary Gland Neoplasia* 9:119-31; Malovanovic et al., 2004, *Int. J. Oncol.* 25:1337-42).
- Los receptores FZD10, FZD8, FZD7, FZD4 y FZD5 son cinco de los diez receptores de Wnt humanos identificados. Fzd10 se coexpresa con *Wnt7b* en los pulmones y los estudios de transfección celular han demostrado que el coreceptor Fzd10/LRP5 activa la vía de señalización Wnt canónica en respuesta a *Wnt7b* (Wang et al., 2005, *Mol. Cell Biol.* 25:5022-30). El ARNm de FZD10 se regula por aumento en numerosas líneas celulares de cancer, que incluyen las líneas celulares de cáncer cervicouterino, gástrico y glioblastoma, y en cánceres primarios que incluyen aproximadamente el 40 % de los cánceres gástricos primarios, cáncer 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). FZD8 se regula por aumento en varias líneas celulares de cáncer humano, principalmente cánceres gástricos 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). FZD7 se expresa a lo largo del tubo digestivo y se regula por aumento en uno de seis casos de cáncer gástrico primario humano (Kirikoshi et al., 2001, *Int. J. Oncol.* 19:111-5). La expresión de ectodomio de FZD7 por una línea celular de cáncer de colon indujo cambios morfológicos y una disminución del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto (Vincan et al., 2005, *Differentiation* 73:142-53). FZD5 juega un papel esencial en la angiogénesis del saco vitelino y placentario (Ishikawa et al., 2001, *Dev.* 128:25-33) y se regula por aumento en carcinomas renales junto con la activación de la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina (Janssens et al., 2004, *Tumor Biology* 25:161-71). FZD4 se expresa de manera elevada en células epiteliales de la cripta intestinal y es uno de los diversos factores que muestra expresión diferencial en tejido normal en comparación con tejido neoplásico (Gregorieff et al., 2005, *Gastroenterology* 129:626-38). Por tanto, la identificación de los receptores FZD como marcadores de células madre cancerosas hace que estas proteínas sean dianas ideales para tratamientos terapéuticos contra el cáncer.

### Sumario de la invención

- Un aspecto de la invención proporciona un anticuerpo monoclonal como se establece en la reivindicación 1. La presente divulgación proporciona agentes novedosos que se unen a uno o más receptores frizzled (FZD) humanos, que incluyen, pero sin limitación, anticuerpos u otros agentes que se unen a dos o más receptores frizzled humanos,

5 y métodos de uso de los agentes. La presente divulgación proporciona adicionalmente polipéptidos novedosos, tales como anticuerpos que se unen a uno o más receptores frizzled humanos, fragmentos de dichos anticuerpos y otros polipéptidos relacionados con dichos anticuerpos. En determinadas realizaciones, el agente, los anticuerpos, otros polipéptidos o agentes que se unen a FZD, se unen a una región de FZD que en el presente documento recibe el nombre de sitio de unión biológica (SUB) que los inventores han identificado ahora por primera vez como una diana para inhibir la señalización Wnt y/o el crecimiento tumoral. También se proporcionan anticuerpos y otros polipéptidos que comprenden un sitio de unión a antígeno que une más de un FZD. También se proporcionan polinucleótidos que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos, así como vectores que comprenden los polinucleótidos. Adicionalmente se proporcionan células que comprenden a los polipéptidos y/o los polinucleótidos de la divulgación. También se proporcionan composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que comprenden los agentes o anticuerpos novedosos que unen a FZD. Adicionalmente, también se proporcionan métodos de elaboración y uso de los agentes o anticuerpos novedosos que se unen a FZD, tales como métodos de uso de los agentes o anticuerpos novedosos que unen a FZD para inhibir el crecimiento tumoral y/o tratar el cáncer.

10 15 Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona un agente que se une específicamente a un receptor frizzled humano. En determinadas realizaciones, el agente inhibe la unión de un ligando (por ejemplo, un Wnt) en el sitio de unión biológica (SUB) del receptor frizzled humano. En determinadas realizaciones, el agente se une a al menos parte del sitio de unión biológica (SUB) dentro del receptor frizzled humano. En determinadas realizaciones, la unión del agente con el SUB produce la inhibición de la señalización Wnt y/o del crecimiento del tumor. En determinadas 20 realizaciones, el receptor frizzled humano es FZD8 y el agente se une a al menos una parte de: (a) un epítopo conformacional de FZD8 formado por los aminoácidos 72(F), 74-75 (PL), 78(1), 92(Y), 121-122(LM) y 129-132 (WPDR (SEQ ID NO: 70)); (b) una región de FZD8 que consiste en la secuencia QDEAGLEVHQFWPL (SEQ ID NO: 67); y/o (c) una región de FZD8 que consiste en la secuencia QYGFA (SEQ ID NO: 66). En determinadas 25 realizaciones, el receptor frizzled humano se selecciona del grupo que consiste en FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 o FZD8 y el agente se une a al menos parte de la secuencia Q/DE/ED)AGLEVHQF(Y/W)PL (SEQ ID NO: 24) dentro del receptor frizzled humano. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el receptor frizzled humano es FZD8 y el agente se une a al menos parte de la secuencia QDEAGLEVHQFWPL (SEQ ID NO: 67) dentro de FZD8. En determinadas 30 realizaciones, el agente se une a al menos parte de la secuencia GLEVHQ (SEQ ID NO: 25). En determinadas realizaciones, el receptor frizzled humano es FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD9 o FZD10 y el agente se une a al menos parte de una región del receptor frizzled humano que corresponde a la región de FZD8 que consiste en QDEAGLEVHQFWPL (SEQ ID NO: 67). En determinadas realizaciones, el agente se une a al menos parte de una secuencia (K/Q) (F/Y)GF(Q/A) (SEQ ID NO: 69) dentro de FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y/o FZD8. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el receptor frizzled humano es FZD8 y el agente se une a al menos parte de una secuencia QYGFA (SEQ ID NO: 66) dentro de FZD8. En determinadas 35 realizaciones alternativas, el receptor frizzled humano es FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD9 o FZD10, y el agente se une a al menos parte de una región del receptor frizzled humano que corresponde a la región de FZD8 que consiste en QYGFA (SEQ ID NO: 66). En determinadas realizaciones, el agente se une específicamente a dos o más, tres o más, o cuatro o más, receptores frizzled humanos. En determinadas realizaciones, el agente se une específicamente a receptores frizzled humanos que comprenden FZD5 y FZD8.

40 45 En otro aspecto, la divulgación proporciona un agente que compite por la unión específica a un receptor frizzled humano con un anticuerpo (por ejemplo, en un análisis de unión competitiva *in vitro*), en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 14. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 14. En determinadas realizaciones, el agente compite por la unión específica a dos o más, tres o más, o cuatro o más, receptores frizzled humanos. En determinadas realizaciones, el agente compite por la unión específica a FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 o FZD8.

50 55 En otro aspecto, la divulgación proporciona un agente que compite por la unión específica a un FZD5 y/o FZD8 humano con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 85 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 86.

60 65 En otro aspecto, la divulgación proporciona un agente que se une específicamente a dos o más receptores frizzled humanos. En determinadas realizaciones, los dos o más receptores frizzled comprenden: (a) FZD1 y un segundo receptor frizzled seleccionado del grupo que consiste en FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8; (b) FZD2 y un segundo receptor frizzled seleccionado del grupo que consiste en FZD5, FZD7 y FZD8; (c) FZD5 y FZD7; o (d) FZD7 y FZD8. En determinadas realizaciones, el agente se une específicamente a tres o más (es decir, 3, 4 o 5) receptores frizzled humanos, en el que los tres o más receptores frizzled humanos comprenden FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y/o FZD8. En determinadas realizaciones, los tres o más receptores humanos comprenden FZD5 y FZD8. En determinadas realizaciones, los tres o más receptores frizzled humanos comprenden además FZD3, FZD4, FZD6, FZD9 y/o FZD10.

65 En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un polipéptido que se une específicamente a un receptor frizzled humano, en el que el polipéptido comprende una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSHYTLS (SEQ ID NO: 1), o una variante de la misma que comprende 1, 2,

- 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; y/o (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende NFIKYVFAN (SEQ ID NO: 3), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, el polipéptido se une específicamente a 1, 2, 3 o 4 receptores frizzled humanos que incluyen FZD5 y FZD8. En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservativas.
- 5 FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y/o FZD8. En determinadas realizaciones, el polipéptido se une específicamente a dos o más receptores frizzled humanos que incluyen FZD5 y FZD8. En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservativas.
- 10 En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un polipéptido que se une específicamente a un receptor frizzled humano, en el que el polipéptido comprende una región variable de cadena ligera que comprende: (a) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDKLGKKYAS (SEQ ID NO: 4) o SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7) o una variante de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7 que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; (b) una CDR2 de cadena ligera que comprende EKDNRPSG (SEQ ID NO: 5) o DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8), o una variante de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 8 que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; y/o (c) una CDR3 de cadena ligera que comprende SSFAGNSLE (SEQ ID NO: 6) o QSYANTLSL (SEQ ID NO: 9) o una variante de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 9 que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, el polipéptido se une específicamente a FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y/o FZD8. En determinadas realizaciones, el polipéptido se une específicamente a dos o más receptores frizzled humanos que incluyen FZD5 y FZD8. En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservativas.
- 15 20 En otro aspecto, la invención divulgación proporciona un polipéptido que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSHYTLS (SEQ ID NO: 1), una CDR2 de cadena pesada que comprende VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), y una CDR3 de cadena pesada que comprende NFIKYVFAN (SEQ ID NO: 3) ; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDKLGKKYAS (SEQ ID NO: 4) o SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7), una CDR2 de cadena ligera que comprende EKDNRPSG (SEQ ID NO: 5) o DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8), y una CDR3 de cadena ligera que comprende SSFAGNSLE (SEQ ID NO: 6) o QSYANTLSL (SEQ ID NO: 9). En determinadas realizaciones, el polipéptido se une específicamente a un receptor frizzled humano. En determinadas realizaciones el polipéptido se une específicamente a dos o más (por ejemplo, al menos FZD5 y FZD8), tres o más, o cuatro o más, receptores frizzled humanos.
- 25 30 En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo que une específicamente a un receptor frizzled humano seleccionado del grupo que consiste en FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSHYTLS (SEQ ID NO: 1), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; una CDR2 de cadena pesada que comprende VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; y una CDR3 de cadena pesada que comprende NFIKYVFAN (SEQ ID NO: 3), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDKLGKKYAS (SEQ ID NO: 4), SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7), o una variante ya sea de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7 que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; CDR2 de cadena ligera que comprende EKDNRPSG (SEQ ID NO: 5), DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8), o una variante de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 8 que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y una CDR3 de cadena ligera que comprende SSFAGNSLE (SEQ ID NO: 6), QSYANTLSL (SEQ ID NO: 9) o una variante de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 9 que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSHYTLS (SEQ ID NO: 1), una CDR2 de cadena pesada que comprende VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) y una CDR3 de cadena pesada que comprende NFIKYVFAN (SEQ ID NO: 3); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDKLGKKYAS (SEQ ID NO: 4) o SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7), una CDR2 de cadena ligera que comprende EKDNRPSG (SEQ ID NO: 5) o DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8) , y una CDR3 de cadena ligera que comprende SSFAGNSLE (SEQ ID NO: 6) o QSYANTLSL (SEQ ID NO: 9). En determinadas realizaciones el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSHYTLS (SEQ ID NO: 1), una CDR2 de cadena pesada que comprende VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) y una CDR3 de cadena pesada que comprende NFIKYVFAN (SEQ ID NO: 3) y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7), una CDR2 de cadena ligera que comprende DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QSYANTLSL (SEQ ID NO: 9).
- 35 40 45 50 55 En otro aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido que comprende (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 14. En determinadas realizaciones la divulgación proporciona un polipéptido que comprende (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14. En determinadas realizaciones, el polipéptido se une específicamente a un receptor frizzled humano. En determinadas realizaciones, el polipéptido se une específicamente a dos o más, tres o más, o cuatro o más receptores frizzled humanos. En determinadas realizaciones, uno o varios receptores frizzled humanos se seleccionan del grupo que consiste en FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8.
- 60 65 En otro aspecto adicional, la divulgación proporciona un agente, tal como un anticuerpo que se une específicamente

5 a FZD5 y/o FZD8 humano, en el que el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSSYYIT (SEQ ID NO: 77), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; una CDR2 de cadena pesada que comprende TISYSSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 78) , o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y una CDR3 de cadena pesada que comprende SIVFDY (SEQ ID NO: 79), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDALGNRYVY (SEQ ID NO: 80), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; una CDR2 de cadena ligera que comprende SG (SEQ ID NO: 81) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y una CDR3 de cadena ligera que comprende GSWDTRPYPKY (SEQ ID NO: 82), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSSYYIT (SEQ ID NO: 77), una CDR2 de cadena pesada que comprende TISYSSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 78) y una CDR3 de cadena pesada que comprende SIVFDY (SEQ ID NO: 79); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDALGNRYVY (SEQ ID NO: 80) , una CDR2 de cadena ligera que comprende SG (SEQ ID NO: 81) y una CDR3 de cadena ligera que comprende GSWDTRPYPKY (SEQ ID NO: 82).

20 En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un polipéptido que se une específicamente a FZD5 y/o FZD8, en el que el polipéptido comprende: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 85; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 86.

25 En un aspecto más, la divulgación proporciona un agente que compite por la unión específica a FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y/o FZD8 humanos con uno cualquiera de los siguientes anticuerpos de IgG: 18R8, 18R5, 18R4605 y 18R4805.

30 En otro aspecto adicional, la divulgación proporciona un agente que compite por la unión específica a FZD5 y/o FZD8 humano con el anticuerpo de IgG dirigido contra FZD, 44R24.

35 En determinadas realizaciones de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como de otros aspectos descritos en el presente documento, el agente o polipéptido es un anticuerpo. En determinadas realizaciones alternativas, el agente no es un anticuerpo.

40 En determinadas realizaciones de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como de otros aspectos descritos en el presente documento, el agente o polipéptido o anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular (DEC) del receptor (o receptores) frizzled humano al que se une. En determinadas realizaciones, de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como de otros aspectos descritos en el presente documento, el agente o polipéptido o anticuerpo se une específicamente al dominio Fri (Fri) del receptor (o receptores) frizzled humano al que se une.

45 En determinadas realizaciones de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como de otros aspectos descritos en cualquier otra parte de este documento, un sitio de unión a antígeno individual del anticuerpo u otro polipéptido se une específicamente (o es capaz de unirse) a más de un receptor frizzled humano.

50 En determinadas realizaciones de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como de otros aspectos descritos en el presente documento, el agente o polipéptido o anticuerpo inhibe la unión de un ligando con el receptor(es) frizzled humano(s). En determinadas realizaciones el ligando es un Wnt.

55 En determinadas realizaciones de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como de otros aspectos descritos en el presente documento, el agente o polipéptido o anticuerpo que se une a uno o varios FZD es un antagonista de uno o varios FZD.

60 En determinadas realizaciones de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así de como otros aspectos descritos en el presente documento, el agente o polipéptido o anticuerpo inhibe la señalización Wnt. En determinadas realizaciones, la señalización Wnt que se inhibe es señalización Wnt canónica. En determinadas realizaciones, la señalización Wnt que se inhibe por el agente de unión a FZD es señalización Wnt no canónica. En determinadas realizaciones, la señalización Wnt es señalización Wnt no canónica.

65 En determinadas realizaciones de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como de otros aspectos descritos en el presente documento, el agente o polipéptido o anticuerpo de unión a FZD inhibe el crecimiento tumoral. La divulgación proporciona adicionalmente los anticuerpos 18R8, 18R5, 184R4605, 44R24 y 18R4805, así como fragmentos de los mismos.

La divulgación proporciona además composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que comprenden un agente o anticuerpo de unión a FZD.

Se proporcionan métodos de inhibición de la señalización Wnt (por ejemplo, señalización Wnt canónica) y/o inhibición del crecimiento tumoral en un individuo, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del agente o polipéptido o anticuerpo de unión a FZD.

5 También se proporcionan métodos de reducción de la tumorigenidad de un tumor que comprende células madre cancerosas. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden administrar a un individuo que comprende el tumor, una cantidad terapéuticamente eficaz del agente o polipéptido o anticuerpo de unión a FZD. En determinadas realizaciones, la frecuencia de las células madre cancerosas en el tumor se reduce por administración del anticuerpo. En determinadas realizaciones, la administración del agente de unión a FZD produce la diferenciación de 10 células tumorigénicas en el tumor a un estado no tumorigénico.

También se proporcionan métodos de inducción de células en un tumor en un individuo para diferenciar, comprendiendo dichos métodos administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz del agente, polipéptido o anticuerpo de unión a FZD.

15 15 Adicionalmente se proporcionan métodos para tratar cáncer en un individuo, que comprenden administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, polipéptido o anticuerpo de unión a FZD.

20 Además, también se proporcionan métodos para reducir la activación de miofibroblastos en el estroma de un tumor sólido, que comprenden poner en contacto el estroma con una cantidad eficaz de un agente, polipéptido o anticuerpo de unión a FZD.

25 En determinadas realizaciones, los métodos que comprenden la administración del agente, polipéptido o anticuerpo de unión a FZD comprenden además administrar al individuo un segundo agente anticanceroso (por ejemplo, un agente quimioterapéutico). En determinadas realizaciones, el segundo agente es gemcitabina, irinotecán o paclitaxel. En determinadas realizaciones, el segundo agente es un inhibidor de la angiogénesis y/o un inhibidor de la señalización Notch.

30 30 En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10-15. De igual manera se proporcionan polipéptidos que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 85-86. También se proporcionan polinucleótidos que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican dichos polipéptidos.

35 35 En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 17-22. Se proporcionan adicionalmente polinucleótidos que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 87-90, 92 y 94-95.

40 40 En otro aspecto adicional, la divulgación proporciona un polinucleótido que comprende un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 17, 19, 21, 87-90, 92 y 94-95, o un polinucleótido que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 12, 14 y 85-86 en condiciones de alta rigurosidad. En determinadas realizaciones, la divulgación comprende un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de las SEQ ID NO: 17, 19 o 21, o un polinucleótido que codifica las SEQ ID NO: 10, 12 o 14 en condiciones de alta rigurosidad.

45 45 En determinadas realizaciones de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como de otros aspectos descritos en el presente documento, se aísla el agente, polipéptido, anticuerpo o polinucleótido. En determinadas realizaciones, el agente o polipéptido o anticuerpo o polinucleótido es sustancialmente puro.

50 50 La presente divulgación proporciona además una firma del gen Wnt útil para la identificación de tumores y/o pacientes susceptibles a responder al tratamiento con un agente de unión a FZD (por ejemplo, un antagonista de un receptor frizzled humano y/o un inhibidor de señalización Wnt) u otros inhibidores de señalización Wnt. También se proporcionan métodos de uso de la firma del gen Wnt para seleccionar pacientes para el tratamiento con un agente de unión a FZD u otro inhibidor de señalización Wnt. En determinadas realizaciones, los métodos implican la determinación del nivel de uno o más genes en la firma del gen Wnt. También se proporcionan métodos de exploración de candidatos farmacológicos contra tumores identificados utilizando la firma del gen Wnt. También se proporcionan matrices, Kits y otras composiciones útiles en los métodos.

55 60 La presente divulgación también proporciona métodos de exploración de posibles candidatos farmacológicos u otros agentes. Estos métodos incluyen, pero sin limitación métodos que comprenden comparar los niveles de uno o más marcadores de diferenciación en un primer tumor sólido que se ha expuesto al agente en relación a los niveles de uno o más marcadores de diferenciación en un segundo tumor sólido que no se ha expuesto al agente. En determinadas realizaciones, estos métodos incluyen comprender (a) exponer al agente un primer tumor sólido, pero no un segundo tumor sólido; (b) determinar los niveles de uno o más marcadores de diferenciación en el primer y segundo tumores sólidos; y (c) comparar los niveles de uno o más marcadores de diferenciación en el primer y segundo tumores sólidos.

**Breve descripción de las figuras**

- Figura 1. 18R8 se une a múltiples receptores frizzled humanos. El análisis por FACS demuestra que 18R8 se une a secuencias de FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8 en células HEK293 transfectadas de manera transitoria. Se muestran gráficas FACS para la unión de 18R8 a células HEK 293 transfectadas con vectores de expresión que codifican el FZD indicado y un vector de expresión para GFP (del inglés *Green Fluorescent Protein*, que significa proteína verde fluorescente). La unión de 18R8 se indica por tinción elevada dentro de la población de células cotransfectadas (positivas a GFP). Las gráficas FACS para FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8 se encuadran con una línea gruesa para resaltar los FZD que muestran unión a 18R8.
- Figura 2. El anticuerpo 18R5, dirigido contra FZD, se une a múltiples receptores frizzled humanos en células. El análisis por FACS demuestra que, al igual que 18R8, 18R5 se une a secuencias de FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8 en células. Los anticuerpos 18R8 y 18R5 se incubaron a una serie de concentraciones con las células HEK293 que sobreexpresan el FZD indicado, y la unión de los anticuerpos se determinó por citometría de flujo. Aunque tanto 18R8 como 18R5 se unen a FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8, 18R5 se une con mayor afinidad.
- Figura 3. Se llevaron a cabo análisis de indicador de luciferasa en células STF293 que expresan de manera estable el elemento promotor 8xTCF unido a luciferasa. Las células se trataron con medio acondicionado que contenía Wnt3A, así como con una serie de concentraciones de 18R8 y 18R5 y posteriormente se analizaron 18 horas más tarde utilizando el sistema indicador de análisis de luciferasa Dual-Glo (Promega). Los resultados demuestran que tanto 18R8 como 18R5 inhiben la señalización Wnt y que 18R5 se une con mayor afinidad que 18R8.
- Figura 4. El anticuerpo 18R8 bloquea la señalización de TCF por Wnt múltiples. Se llevaron a cabo análisis de indicador de luciferasa en células STF293 que expresan de manera estable el elemento promotor 8xTCF unido a luciferasa. Utilizando Fugene 6 (Roche) se generaron diversas células que sobreexpresan Wnt al transfectar células HEK293 (ATCC) con vectores de expresión que codifican las proteínas Wnt indicadas. Las células STF293 se trataron con 18R8 y se añadieron células HEK293 que sobreexpresan Wnt y se analizaron durante 18 horas después utilizando el sistema indicador de análisis de luciferasa Dual-Glo.
- Figura 5. El anticuerpo 18R8 inhibe directamente la unión de Wnt con FZD. Se llevaron a cabo análisis de indicador de luciferasa en células STF293 que expresan de manera estable el elemento promotor 8xTCF. Una mezcla que contenía medio acondicionado con Wnt3A, purificado con FZD8-Fc y/o 18R8, como se indica, se coincubó durante 2 h a 4 °C con/sin esferas de proteína A Sepharose. Después de la incubación, las esferas de proteína A Sepharose se retiraron y se añadieron a células STF293. Las células STF293 tratadas se analizaron 18 horas después utilizando el sistema indicador de análisis de luciferasa Dual-Glo. Este experimento muestra que en ausencia de 18R8, Fzd8-Fc puede inhibir la capacidad de Wnt3A para estimular la señalización, pero que 18R8 puede bloquear la capacidad de FZD8 para unirse a Wnt3A, como se pone de manifiesto por el restablecimiento de la señalización cuando se utilizan las esferas de Sepharose A para retirar el FZD8-Fc (y 18R8) de la co-incubación.
- Figura 6. Análisis por FACS de la unión del anticuerpo 18R8 a FZD8 mutante en comparación con FZD8 natural (*wild-type*). Para determinar el epítopo de 18R8 en FZD, se realizaron estudios de mapeo epítópico. Se utilizó una construcción de expresión que permite la expresión del dominio Fri de FZD8 humano con una etiqueta FLAG en el extremo N y un dominio transmembrana CD4 en el extremo C y se utilizó un dominio intracelular en estudios de transfección transitoria junto con un vector de expresión que codifica la proteína verde fluorescente, GFP. También se prepararon variantes de este vector de expresión que contienen sustituciones seleccionadas de aminoácidos dentro de la secuencia FZD8 para codificar los aminoácidos en la posición correspondiente dentro del dominio Fri de otros FZD particulares no unidos por 18R8. Después se determinó por citometría de flujo la capacidad de 18R8 para unirse a estas secuencias de FZD8 variantes. Se descubrió que algunas posiciones, que incluyen los aminoácidos 66-71 y 126-127 de FZD8, eran necesarias para la unión a 18R8, como lo indica la tinción reducida con la población de células cotransfectadas (positivas a GFP). La región de la gráfica FACS que muestra la unión de 18R8 con la población de células cotransfectadas, se resalta con un recuadro y dicho recuadro se muestra con líneas gruesas para aquellas sustituciones de aminoácidos que muestran una unión notablemente reducida con 18R8.
- Figura 7. Se muestra que 18R5 y 18R8 tienen un epítopo de unión similar en el FZD8 humano. A través de citometría de flujo se demostró la capacidad de 18R5 para unirse a un epítopo similar como 18R8, utilizando una serie de variantes de aminoácidos que anteriormente se mostró que alteraba la unión de 18R8. Se descubrió que las posiciones que incluyen los aminoácidos 66-71 y 126-127 de FZD8, son necesarias para la unión tanto de 18R8 como de 18R5, como lo indica la tinción reducida dentro de la población de células cotransfectadas (positivas a GFP). La región de la gráfica FACS que muestra la unión de 18R8 con la población de células cotransfectadas, se resalta con un recuadro y dicho recuadro se muestra con líneas gruesas para aquellas sustituciones de aminoácidos que muestran una unión notablemente reducida con 18R8 y 18R5.
- Figura 8. Comparación de las secuencias de aminoácidos de partes de las secuencias del dominio Fri de los receptores frizzled humanos. Los sitios de los restos conservados están sombreados en negro; los sitios con restos aminoácidos similares están sombreados en gris. El epítopo FZD de 18R8 y 18R5 contienen las regiones subrayadas y marcadas como "borde superior" y "borde inferior". Las expresiones "borde superior" y "borde inferior" reflejan el reconocimiento, basado en el examen de la estructura cristalina del dominio Fri, de que estas regiones flanquean una hendidura sobre la superficie de la proteína FZD. Esta hendidura contiene restos múltiples muy conservados. Los aminoácidos que comprenden esta hendidura se resaltan mediante símbolos con forma de zanahoria encima de cada una de las posiciones correspondientes dentro de la alineación.

Anteriormente a esta región no se la había asignado una función específica. El descubrimiento de anticuerpos que se unen a esta región y el descubrimiento de que estos anticuerpos inhiben la unión de Wnt y la señalización Wnt, así como nuestra identificación de la naturaleza conservada de esta hendidura, nos ha permitido identificar esta región como un aspecto funcional clave de las proteínas FZD.

- 5 Figura 9. Sitio de unión biológica (SUB) de FZD. Se muestran imágenes de la estructura de un dominio fri de Fzd. Las imágenes se basan en el análisis de la estructura cristalina de FZD8 de ratón anteriormente descrita (Dann CE et. Al., *Nature* 412 (6842) 86-90, 2001) y en el análisis realizado utilizando el programa informático Pymol. En la imagen izquierda superior se muestra una vista en superficie del dominio Fri de FZD comprendiendo la región de la proteína Fzd el sitio de unión biológica (SUB) que los inventores han descubierto (rodeada con círculo blanco). Esta es la región unida por los anticuerpos 18R8 y 18R5. Esta región contiene elementos estructurales que denominamos "borde superior", "borde inferior" y "hendidura". Cada uno de estos se resalta con una coloración más oscura en la superficie en imágenes distintas en la parte inferior del panel. La imagen derecha superior resalta, con una coloración más oscura en la superficie, los restos que están conservados en nueve o diez de los diez miembros de la familia de Fzd humano y resalta el reconocimiento de que dentro del centro de la región "hendidura" flanqueada por el epítopo que une anticuerpos, se produce un agrupamiento distinto de estos restos que inhiben la función de Fzd.
- 10 Figura 10. Prevención del crecimiento tumoral dependiente de Wnt por el anticuerpo monoclonal, mAb, dirigido contra FZD. Ratones NOD/SCID recibieron inyección de 50.000 células derivadas de tumor WNT1 de VTMM (virus de tumor mamario murino) y el crecimiento tumoral se controló semanalmente hasta que se detectó el crecimiento y después el crecimiento tumoral se midió dos veces por semana. Diez ratones con tumores establecidos se trataron ya sea con 18R8 o, como control, con un anticuerpo de control. El crecimiento tumoral en animales tratados con 18R8 se eliminó prácticamente en comparación con el observado en animales tratados con el anticuerpo de control.
- 15 Figura 11. Reducción de crecimiento tumoral de xenoinjerto OMP-C28 por tratamiento combinado de 18R5 e irinotecán. Ratones NOD/SCID recibieron inyección de 10.000 células de tumor de colon OMP-C28 y, el día 24, los ratones que tenían tumores con un volumen promedio de 129 mm<sup>3</sup> se distribuyeron al azar y se iniciaron los tratamientos indicados. El crecimiento tumoral se controló semanalmente. El crecimiento tumoral en los animales tratados 18R5 se redujo significativamente. Además, la combinación de 18R5 e irinotecán se redujo de manera significativa durante el tratamiento con cualquiera de los agentes solos.
- 20 Figura 12. Reducción del crecimiento tumoral de xenoinjerto OMP-PN4 por tratamiento combinado de 18R5 y gemcitabina. Ratones NOD/SCID recibieron inyección de 50.000 células tumorales pancreáticas OMP-PN4 y, el día 38, los ratones que tenían tumores con un volumen promedio de aproximadamente 120 mm<sup>3</sup> se distribuyeron al azar y, dos días después, se iniciaron los tratamientos indicados. El crecimiento tumoral en los animales tratados con la combinación de 18R5 y gemcitabina se redujo significativamente durante el tratamiento solo con gemcitabina.
- 25 Figura 13. Secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera para 18R8 y 18R5, que incluyen secuencias VH y VL.
- 30 Figura 14. Secuencias de nucleótidos que codifican la cadena pesada y secuencias VH de 18R8 y 18R5.
- 35 Figura 15. Secuencias de nucleótidos que codifican la cadena ligera y secuencias VL de 18R8 y 18R5.
- 40 Figura 16. Secuencia de aminoácidos de la proteína Fc del DEC de FZD7 y secuencia de nucleótidos que la codifica.
- 45 Figura 17. Secuencias de aminoácidos de FZD1 humano (SEQ ID NO: 26), el dominio extracelular (DEC) de FZD1 (SEQ ID NO: 27, se muestra como aminoácidos subrayados 1-321 de la SEQ ID NO: 26), y el dominio Fri de FZD1 (SEQ ID NO: 28).
- 50 Figura 18. Secuencias de aminoácidos de FZD2 humano (SEQ ID NO: 30), el dominio extracelular (DEC) de FZD2 (SEQ ID NO: 31, se muestra como aminoácidos subrayados 1-250 de la SEQ ID NO: 30) y el dominio Fri de FZD2 (SEQ ID NO: 32).
- 55 Figura 19. Secuencia de nucleótidos que codifica el FZD1 humano.
- 60 Figura 20. Secuencia de nucleótidos que codifica el FZD2 humano.
- 65 Figura 21. Secuencias de aminoácidos de FZD3 humano (SEQ ID NO: 34), el dominio extracelular (DEC) de FZD3 (SEQ ID NO: 35, se muestra como aminoácidos subrayados 1-204 de la SEQ ID NO: 34) y el dominio Fri de FZD3 (SEQ ID NO: 36).
- 70 Figura 22. Secuencias de aminoácidos de FZD4 humano (SEQ ID NO: 38), el dominio extracelular (DEC) de FZD4 (SEQ ID NO: 39, se muestra como aminoácidos subrayados 1-224 de la SEQ ID NO: 38) y el dominio Fri de FZD4 (SEQ ID NO: 40).
- 75 Figura 23. Secuencia de nucleótidos que codifica el FZD3 humano.
- 80 Figura 24. Secuencia de nucleótidos que codifica el FZD4 humano.
- 85 Figura 25. Secuencias de aminoácidos de FZD5 humano (SEQ ID NO: 42), el dominio extracelular (DEC) de FZD5 (SEQ ID NO: 43, se muestra como aminoácidos subrayados 1-233 de la SEQ ID NO: 42) y el dominio Fri de FZD5 (SEQ ID NO: 44).
- 90 Figura 26. Secuencias de aminoácidos de FZD6 humano (SEQ ID NO: 46), el dominio extracelular (DEC) de FZD6 (SEQ ID NO: 47, se muestra como aminoácidos subrayados 1-207 de la SEQ ID NO: 46) y el dominio Fri de FZD6 (SEQ ID NO: 48).
- 95 Figura 27. Secuencia de nucleótidos que codifica el FZD5 humano.
- 100 Figura 28. Secuencia de nucleótidos que codifica el FZD6 humano.
- 105 Figura 29. Secuencias de aminoácidos de FZD7 humano (SEQ ID NO: 50), el dominio extracelular (DEC) de

- 5 FZD7 (SEQ ID NO: 51, se muestra como aminoácidos subrayados 1-255 de la SEQ ID NO: 50) y el dominio Fri de FZD7 (SEQ ID NO: 52).
- Figura 30. Secuencias de aminoácidos de FZD8 humano (SEQ ID NO: 54), el dominio extracelular (DEC) de FZD8 (SEQ ID NO: 55, se muestra como aminoácidos subrayados 1-277 de la SEQ ID NO: 54) y el dominio Fri de FZD8 (SEQ ID NO: 56).
- Figura 31. Secuencia de nucleótidos que codifica el FZD7 humano.
- Figura 32. Secuencia de nucleótidos que codifica el FZD8 humano.
- 10 Figura 33. Secuencias de aminoácidos de FZD9 humano (SEQ ID NO: 58), el dominio extracelular (DEC) de FZD9 (SEQ ID NO: 59, se muestra como aminoácidos subrayados 1-230 de la SEQ ID NO: 58) y el dominio Fri de FZD9 (SEQ ID NO: 60).
- Figura 34. Secuencias de aminoácidos de FZD10 humano (SEQ ID NO: 62), el dominio extracelular (DEC) de FZD10 (SEQ ID NO: 63, se muestra como aminoácidos subrayados 1-227 de la SEQ ID NO: 62) y el dominio Fri de FZD10 (SEQ ID NO: 64).
- 15 Figura 35. Secuencia de nucleótidos que codifica el FZD9 humano.
- Figura 36. Secuencia de nucleótidos que codifica el FZD10 humano.
- Figura 37. Reducción del crecimiento tumoral de mama PE-13 con tratamiento combinado de anticuerpo 18R5 y paclitaxel. Ratones NOD/SCID recibieron inyección de 10.000 células de tumor de mama PE-13 y, el día 22, los ratones que tenían tumores con un volumen promedio de aproximadamente 120 mm<sup>3</sup> se distribuyeron al azar. Despues, los ratones se trajeron bien con un anticuerpo de control ("Ab control"), anticuerpo 18R5 ("anti FZD"), paclitaxel ("taxol"), o una combinación de anticuerpo 18R5 y paclitaxel ("anti FZD+Taxol"). El tratamiento con anticuerpo 18R5 en combinación con paclitaxel produjo actividad antitumoral.
- 20 Figura 38. Crecimiento tumoral de mama en animales individuales tratados con la combinación de anticuerpo 18R5 y paclitaxel. El tratamiento con anticuerpo 18R5 en combinación con paclitaxel produjo la regresión de tumores de mama establecidos.
- 25 Figura 39. Análisis de citometría de flujo de células tumorales colorrectales después de tratamiento con anticuerpo de control, anticuerpo 18R5, irinotecán o con anticuerpo 18R5 e irinotecán.
- Figura 40. Crecimiento tumoral en ratones después de la implantación de 30, 90, 270 u 810 células tumorales obtenidas de ratones que han sido tratados durante 41 días ya sea con anticuerpo de control ("control"), anticuerpo 18R5 ("anti FZD"), gemcitabina ("Gemcitabina"), o la combinación de 18R5 y gemcitabina ("Combinación").
- 30 Figura 41. Frecuencia de células madre cancerosas (CMC) en tumores pancreáticos PN-4 después de tratamiento con anticuerpo de control ("Ab control"), anticuerpo 18R5 solo ("anti FZD"), gemcitabina sola ("Gemcitabina") o la combinación de anticuerpo 18R5 y gemcitabina ("Combinación"), determinada por análisis de dilución limitante.
- 35 Figura 42. Cromatograma de expresión génica en células tumorales pancreáticas que han sido tratadas con anticuerpo de control ("LZ-1"), anticuerpo 18R5 solo ("18R5"), gemcitabina sola ("Gem") o una combinación de gemcitabina y 18R5 ("Combinación").
- 40 Figura 43. El tratamiento con el anticuerpo 18R5, dirigido contra FZD (anti FZD), promueve la diferenciación de células tumorales en células mucinosas no proliferativas. Ratones NOD/SCID recibieron inyección de 50.000 células tumorales pancreáticas OMP-PN13 y, el día 23, los ratones que tenían tumores con un volumen promedio de aproximadamente 107 mm<sup>3</sup> se distribuyeron al azar, y 4 días después se inició el tratamiento con anticuerpo de control o con 18R5. Despues de 20 días, los tumores se extirparon y se seccionaron. Las secciones de tumor de los ratones tratados con el anticuerpo 18R5 o con anticuerpo de control, se tiñeron con azul alcán para mostrar las células mucinosas y por inmunohistoquímica con anticuerpo contra ki67 para mostrar las células proliferativas. Las células mucinosas y las células proliferativas a modo de ejemplo se resaltan con flechas.
- 45 Figura 44. El anticuerpo 18R5, anti FZD, solo y en combinación con Taxol® (paclitaxel) inhibe el crecimiento tumoral de xenoinjerto OMP-LU24. Ratones portadores de tumores de pulmón humano OMP-LU24 se trajeron bien con anticuerpo de control ("Ab control"), anticuerpo 18R5, anti FZD, ("18R5"), Taxol® ("Taxol") o con la combinación de 18R5 y Taxol® ("18R5+Taxol").
- 50 Figura 45. El anticuerpo 18R5, anti FZD, solo y en combinación con Avastin® (bevacizumab), inhibe el crecimiento tumoral de xenoinjerto OMP-LU33. Ratones portadores de tumores de pulmón humano OMP-LU33 se trajeron bien con anticuerpo de control (cuadrados), Avastin® (triángulos con la punta hacia arriba) y 18R5 anti FZD (triángulos con la punta hacia abajo), o con la combinación de 18R5 y Avastin® (círculos).
- 55 Figura 46. La combinación de anticuerpo 18R5, anti FZD, con Herceptin® (trastuzumab) inhibe el crecimiento tumoral de xenoinjerto T3. Los ratones que llevan tumores de mama humano T3 se trajeron bien con anticuerpo de control (cuadrados), 18R5 anti FZD (triángulos), Herceptin® (círculos negros), o con la combinación de 18R5 y Herceptin® (círculos blancos).
- 60 Figura 47. Perfiles de unión a Fzd de 18R5 y 44R24. La curva de respuesta a dosis representa la unión de cada mAb con Fzd 1, 2, 5, 7 y 8.
- Figura 48. Inhibición de la actividad indicadora inducida por Wnt3a en células madre embrionarias por 18R5 y 44R24 (curvas de respuesta a dosis).
- Figura 49. Inhibición de nivel basal de la expresión del gen axin2 por 18R5 y 44R24.
- 65 Figura 50. Detección mediante inmunohistoquímica, HIQ, de Muc16 en tumores OMP-PN13 tratados con 18R5 y 44R24.
- Figura 51. Inhibición de actina de músculo liso en tumor pancreático tratado con 18R5. La Figura 51A muestra

niveles de expresión del gen ACTA2, detectados mediante micromatriz. La Figura 51B muestra la detección de actina de músculo liso, AML, en tumores OMP-PN4 tratados con mAb de control (panel superior) y con 18R5 (panel inferior).

Figura 52. Prueba de tumorigenidad de células OMP-PN13 Muc16+ inducidas por 18R5. La Figura 52A muestra una gráfica FACS de células tumorales OMP-PN13 desprovistas de Lin<sup>-</sup> tenidas para Muc16. Las dos poblaciones clasificadas se rodean con un círculo. La Figura 52B muestra imágenes representativas de tumores resultantes de la inyección de células Muc16- (panel superior) y Muc16+ (panel inferior). La Figura 52C muestra curvas de crecimiento tumoral.

Figura 53. Inhibición de recidiva de tumor por el mAb 18R5, anti FZD, en xenoinjerto de tumor de mama PE13.

Figura 54. Reducción de la frecuencia de células madre de cáncer de mama por el mAb 18R5, anti FZD.

Figura 55. Inhibición de recidiva de tumor por el mAb 18R5, anti FZD, en xenoinjerto de tumor pancreático PN4.

Figura 56. Inhibición de crecimiento tumoral por el mAb 44R24, anti FZD, en combinación con gemcitabina en xenoinjerto de tumor pancreático PN4.

Figura 57. Análisis por FACS de la unión del mAb 44R24, anti FZD, con FZD8 mutante en relación con FZD8 natural. La región de la gráfica FACS muestra la unión de 44R24 con la población de células cotransfектadas y se resalta con un recuadro. El recuadro de las sustituciones de aminoácidos que muestran unión a 44R24 notablemente reducida se marca con una flecha.

Figura 58. Actividad antitumoral de los anticuerpos 44R24 y 18R5, anti FZD, en xenoinjertos de tumor de colon C28.

Figura 59. Inducción de expresión de citoqueratina 7 en xenoinjertos de tumor de colon C28 tratados con los anticuerpos 44R24 o 18R5, anti FZD.

#### Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona agentes novedosos que incluyen, pero sin limitación, polipéptidos tales como anticuerpos, que se unen a uno o más receptores frizzled (FZD) humanos. También se proporcionan los polipéptidos y polinucleótidos relacionados, las composiciones que comprenden los agentes de unión a FZD y los métodos de preparación de los agentes de unión a FZD. Adicionalmente se proporcionan métodos de uso de los nuevos agentes de unión a FZD, tales como métodos para inhibir el crecimiento tumoral y/o para tratar cáncer.

La divulgación se basa, en parte, en la identificación de una región dentro de los receptores frizzled humanos que es una diana adecuada para agentes anticancerosos que se unen a FZD. Se encontraron dos anticuerpos anti FZD, 18R8 y 18R5, que se unían específicamente a FZD7, pero que también reaccionaban en cruzado con FZD1, FZD2, FZD5 y FZD8 (Ejemplos 1 y 2, más adelante). Los experimentos *in vitro* con el anticuerpo 18R8 indican que el anticuerpo es capaz de inhibir la señalización Wnt (Ejemplo 3, más adelante) y de inhibir la unión de ligandos de Wnt con FZD8 (Ejemplo 4 más adelante). También ha demostrado que el anticuerpo 18R5 es del mismo modo capaz de inhibir la señalización Wnt en análisis basados en células (Ejemplos 3 y 20, más adelante). Los experimentos *in vivo* con el anticuerpo 18R5 demuestran que el anticuerpo es capaz de inhibir el crecimiento tumoral o la recidiva tumoral (Ejemplos 7, 17 y 23, más adelante). Los inventores también han demostrado que el anticuerpo 18R5, anti FZD, es capaz de reducir la frecuencia de células madre cancerosas en tumores (Ejemplos 8 y 23, más adelante) y de inducir la diferenciación y/o reducir la tumorigenidad de las células tumorales (Ejemplos 16, 21, 22 y 25, más adelante). Los experimentos de mapeo epítópico con estos anticuerpos 18R8 y 18R5 activos, indican que ambos anticuerpos se unen a al menos parte de la secuencia GLEVHQ (SEQ ID NO: 25) y a al menos parte de la secuencia YGFA (SEQ ID NO: 74) dentro de FZD8 (Ejemplo 5, más adelante). A la luz de la actividad biológica demostrada de estos dos anticuerpos, se analizó la estructura cristalina de Frizzled 8 de ratón (Dann et al., *Nature*, 412: 86-90 (2001)) y por primera vez se identificó una región extracelular de proteínas frizzled que comprendía estas secuencias a la que anteriormente no se la había asignado ninguna función específica, desempeñando un papel funcional importante en la biología FZD y la señalización Wnt (Ejemplo 6). Esta región de receptores frizzled humanos, denominada sitio de unión biológica (SUB), es una diana adecuada para tratamientos contra el cáncer.

Además, se descubrió que un tercer anticuerpo, 44R24, se unía específicamente a los receptores FZD5 y FZD8 humanos (véase el Ejemplo 19, más adelante). También se ha demostrado que este anticuerpo es capaz de inhibir la señalización Wnt en análisis basados en células (Ejemplo 20, más adelante) y de eficacia antitumoral *in vivo* (Ejemplos 23 y 25, más adelante). Al igual que el tratamiento con los anticuerpos 18R8 y 18R5, anti FZD, el tratamiento de un tumor con 44R24 produjo niveles aumentados de un marcador de diferenciación en el tumor (Ejemplo 25, más adelante). El mapeo epítópico también ha demostrado que el epítopo del anticuerpo 44R24, anti FZD, se superpone con el de los anticuerpos 18R8 y 18R5, anti FZD. De manera más específica, se ha demostrado que el anticuerpo 44R24 se une a al menos parte de la región YGFA (SEQ ID NO: 74) en el SUB (Ejemplo 24, más adelante).

#### I. Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente divulgación, a continuación se definen diversos términos y frases.

El término "anticuerpo" significa una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, polipéptido, péptido, hidrato de carbono, polinucleótido, lípido o combinaciones de los

- anteriores, a través de al menos un sitio de reconocimiento antigenólico dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpo (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 y Fv) , mutantes Fv de cadena sencilla (scFv, por sus siglas en inglés), anticuerpos multiespecíficos tales como 5 anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una parte de determinación de antígeno de un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento antigenólico siempre que los anticuerpos presenten la actividad biológica deseada. Un anticuerpo 10 puede ser cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), en función de la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen diferentes estructuras subunitarias y configuraciones tridimensionales 15 muy conocidas. Los anticuerpos pueden estar marcados (*naked*) o conjugados con otras moléculas tales como toxinas, radioisótopos, etc.
- 15 15 La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables de determinantes antigenóicos de un anticuerpo intacto. Como ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos que se forman a partir de fragmentos de anticuerpo.
- 20 20 Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogénea involucrada en el reconocimiento altamente específico y en la unión de un solo determinante antigenólico o epítopo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales que por lo general incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigenóicos. La expresión "anticuerpo monoclonal" abarca anticuerpos monoclonales intactos y de longitud completa así como 25 fragmentos de anticuerpo (tales como Fab, Fab', F(ab')2, Fv), mutantes de cadena sencilla (scFv), proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda un sitio de reconocimiento antigenólico. Además, "anticuerpo monoclonal" se refiere a dichos anticuerpos creados en cualquier cantidad de maneras, que incluye, pero sin limitación, hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante y animales transgénicos.
- 30 30 La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son cadenas de inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas o fragmentos de las mismas que contienen secuencias no humanas (por ejemplo, murinas) mínimas. Por lo general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las cuales los restos de la región determinante de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) se sustituyen por restos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, 35 hámster) que tienen 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). En algunos casos, los restos de la región estructural (FR, por sus siglas en inglés) Fv de una inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. El anticuerpo humanizado se puede modificar adicionalmente por la sustitución de restos 40 adicionales, ya sea 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. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad o al menos uno y por lo general dos o tres dominios variables que contienen la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina 45 humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una parte de una región constante o dominio (Fc) de inmunoglobulina, por lo general el de una inmunoglobulina humana. En la patente de Estados Unidos 5.225.539 se describen ejemplos de métodos utilizados para generar anticuerpos humanizados.
- 50 50 La expresión "anticuerpo humano" significa un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a un anticuerpo producido por un ser humano creado utilizando 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 de cadena pesada humana.
- 55 55 La expresión "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina procede de dos o más especies. Por lo general, la región variable de las cadenas tanto ligera como pesada corresponde a la región variable de los anticuerpos procedentes de una especie de mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas mientras que las regiones 60 constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos procedentes de otra especie (habitualmente ser humano) para evitar suscitar una respuesta inmunitaria en esa especie.
- 65 65 El término "epítopo" o la expresión "determinante antigenólico" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a la parte de un antígeno que puede reconocer un anticuerpo y con la que puede unirse específicamente un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, se pueden formar epítopos a partir de aminoácidos tanto contiguos como no contiguos, yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados

a partir de aminoácidos contiguos por lo general se conservan después de la desnaturalización de la proteína, mientras que los epítopes formados por plegamiento terciario por lo general se pierden después de la desnaturalización de la proteína. Un epítopo por lo general incluyen al menos tres, y de manera más habitual, al menos 5 o de 8 a 10 aminoácidos en una conformación espacial única.

5 Que un anticuerpo "se une específicamente" a un epítopo o a una proteína, significa que el anticuerpo reacciona o se asocia más frecuentemente, con mayor rapidez, con mayor duración, con mayor afinidad, o con alguna combinación de lo anterior, a un epítopo o proteína que con sustancias alternativas, incluyendo proteínas no relacionadas. En determinadas realizaciones, "se une específicamente" significa, por ejemplo, que un anticuerpo se une a una proteína con una  $K_D$  de aproximadamente 0,1 mM o menor, pero de manera más habitual menor de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$ . En determinadas realizaciones, "se une específicamente" significa que un anticuerpo se une a una proteína a veces con una  $K_D$  de al menos aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$  o menor, y otras veces a al menos aproximadamente 0,01  $\mu\text{M}$  o menor. Debido a la identidad de secuencia entre proteínas homólogas en especies diferentes, la unión específica puede incluir un anticuerpo que reconoce una proteína particular, tal como un receptor 10 frizzled, en más de una especie. Del mismo modo, debido a la homología entre receptores FZD diferentes (por ejemplo FZD5 y FZD8) en determinadas regiones de las secuencias polipeptídicas de los receptores, la unión específica puede incluir un anticuerpo (u otro polipéptido o agente) que reconozca más de un receptor frizzled. Se entiende que un anticuerpo o una parte de unión que se une específicamente a una primera diana, puede unirse 15 específicamente, o no, a una segunda diana. Por tanto, la expresión "unión específica" no requiere necesariamente 20 (aunque puede incluir) unión excluyente, es decir, unión a una sola diana. Por tanto, en determinadas realizaciones, un anticuerpo se puede unir específicamente a más de una diana (por ejemplo FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y/o FZD8 humano). En determinadas realizaciones, múltiples dianas se pueden unir al mismo sitio de unión al antígeno en el 25 anticuerpo. Por ejemplo, en determinadas circunstancias, un anticuerpo puede comprender dos sitios idénticos de unión a antígeno, cada uno de los cuales se une específicamente a dos o más receptores de frizzled humanos (por ejemplo, FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y/o FZD8 humanos). En determinadas realizaciones alternativas, un anticuerpo puede ser biespecífico y comprender al menos dos sitios de unión al antígeno con especificidades diferentes. Como 30 ejemplo no limitante, un anticuerpo biespecífico puede comprender un sitio de unión a antígeno que reconoce un epítopo en un receptor frizzled, tal como FZD5 humano y comprende además un segundo sitio de unión a antígeno, diferente, que reconoce un epítopo diferente en un segundo receptor frizzled, tal como FZD8 humano. De manera general, aunque no necesariamente, la referencia a unión significa unión específica.

35 Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que se "aísla" es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está en una forma que no se encuentra en la naturaleza. Los polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células o composiciones aislados incluyen los que se han purificado hasta tal punto de que ya no están en una forma en la que se encuentra en la naturaleza. En determinadas realizaciones, un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que se aísla, es sustancialmente puro(a).

40 Como se utiliza en el presente documento, "sustancialmente puro" se refiere a un material que tiene una pureza de al menos 50 % (es decir, sin contaminantes), de manera más preferible una pureza de al menos 90 %, de manera mucho más preferida una pureza de al menos 95 %, de manera mucho más preferida una pureza de al menos 98 %, de manera más preferida una pureza de al menos 99 %.

45 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica de mamíferos en la cual una población de células se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Como ejemplos de cáncer se incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Como ejemplos más particulares de estos 50 cánceres se incluyen cánceres de células escamosas, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervicouterino, cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de las vías respiratorias y digestivas altas.

55 Los términos "tumor" y "neoplasma" se refieren a cualquier masa de tejido resultante de crecimiento o proliferación celulares excesivos, ya sea benigno (no canceroso) o maligno (canceroso) incluyendo lesiones precancerosas.

60 Las expresiones "célula madre cancerosa", "célula madre tumoral" o "célula madre de tumor sólido", se utilizan de manera indistinta en el presente documento y se refieren a una población de células de un tumor sólido que: (1) tienen gran capacidad proliferativa; (2) son capaces de realizar la división celular asimétrica para generar una o más 65 clases de descendencia diferenciada con potencial proliferativo o de desarrollo reducido; y (3) son capaces de realizar divisiones celulares simétricas para su autorrenovación o automantenimiento. Estas propiedades de las "células madre cancerosas", "células madre tumorales" o "células madre de tumor sólido" confieren a las células madre cancerosas la capacidad de formar tumores palpables al realizar trasplante en serie en ratones inmunocomprometidos, en comparación con la mayor parte de las células tumorales que no forman tumores. Las células madre cancerosas experimentan autorrenovación frente a diferenciación de una manera caótica para formar tumores con tipos de células anómalas que pueden cambiar con el tiempo conforme se producen mutaciones.

- Las expresiones "célula cancerosa", "célula tumoral" y equivalentes gramaticales se refieren a la población total de células procedentes de un tumor o una lesión precancerosa, que incluyen células no tumorigénicas, que comprenden el volumen de la población de células tumorales, así como células madre tumorigénicas (células madre cancerosas). Como se utiliza en el presente documento, la expresión "célula tumoral" se modificará por la expresión "no tumorigénica" cuando se refiera únicamente a aquellas células tumorales que carecen de la capacidad de renovarse y diferenciarse para distinguir a estas células tumorales de las células madre cancerosas.
- 5
- El término "tumorigénico" se refiere a características funcionales de una célula madre de tumor sólido incluyendo las 10 propiedades de autorrenovación (lo que da lugar a células madre cancerosas tumorigénicas adicionales) y proliferación para generar las restantes células tumorales (lo que genera células tumorales indiferenciadas y por lo tanto no tumorigénicas) que permiten que las células madre de tumor sólidos formen un tumor. Estas propiedades de autorrenovación y proliferación para generar las restantes células tumorales confieren a las células madre cancerosas la capacidad de formar tumores palpables tras un trasplante en serie en un ratón inmunocomprometido 15 en comparación con células tumorales no tumorigénicas que no pueden formar tumores tras un trasplante en serie. Se ha observado que las células tumorales no tumorigénicas pueden formar un tumor después de un trasplante primario en un ratón inmunocomprometido después de obtener las células tumorales de un tumor sólido, pero las células tumorales no tumorigénicas no producen un tumor después de un trasplante en serie.
- 20
- El término "individuo" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero) que incluye, pero que no se limita a seres humanos, primates no humanos, roedores y similares, que serán los receptores de un tratamiento particular. Habitualmente, los términos "individuo" y "paciente" se utilizan indistintamente en el presente documento con referencia a un individuo humano.
- 25
- Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de un compuesto que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto precursor.
- 30
- Un "excipiente, transportador o adyuvante farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente, transportador o adyuvante que se puede administrar a un individuo, junto con al menos un anticuerpo de la presente divulgación y que no destruye la actividad farmacológica del mismo y no es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para suministrar una cantidad terapéutica del compuesto.
- 35
- Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o transportador con el cual se administra al menos un anticuerpo de la presente divulgación.
- 40
- La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido o polinucleótido, molécula orgánica pequeña u otro fármaco, eficaz para "tratar" una enfermedad o un trastorno en un individuo o mamífero. En el caso de 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 a órganos periféricos que incluye, por ejemplo, la propagación del cáncer a tejido blando y huesos; inhibir y detener la metástasis tumoral; inhibir y detener el crecimiento del tumor; aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas 45 asociados al cáncer; reducir la morbilidad y mortalidad; mejorar la calidad de vida, disminuir la tumorigenidad, la frecuencia tumorigénica o la capacidad tumorigénica de un tumor; reducir el número o frecuencia de células madre cancerosas en un tumor; diferenciar células tumorigénicas a un estado no tumorigénico; o una combinación de estos efectos. En la medida en que el fármaco impida el crecimiento y/o elimine las células cancerosas existentes, se le puede denominar citostático y/o citotóxico.
- 50
- Las expresiones tales como "tratar" o "tratamiento" o "para tratar" o "aliviar" o "para aliviar", se refieren tanto a: 1) medidas terapéuticas que curan, frenan, disminuyen los síntomas y/o detienen el progreso de una afección o trastorno patológico diagnosticado y 2) medidas profilácticas o preventivas que evitan y/o frenan el desarrollo de una afección o trastorno patológico diana. De esta manera, las personas que necesitan tratamiento incluyen lo ya mencionado con el trastorno; las que son propensas a presentar el trastorno y las personas en quienes se debe evitar el trastorno. En determinadas realizaciones, un individuo se "trata" satisfactoriamente contra el cáncer, de acuerdo con los métodos de la presente divulgación, si el paciente muestra uno o más de lo siguiente: una reducción 55 en la cantidad, o la ausencia completa, de células cancerosas; una reducción en el tamaño del tumor; una inhibición, o ausencia, de infiltración de células cancerosas a órganos periféricos que incluyen, por ejemplo, la propagación del cáncer a 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 al cáncer específico; la morbilidad y mortalidad reducidas; la mejora de la calidad de vida; la reducción de la tumorigenidad, frecuencia tumorigénica o capacidad tumorigénica; 60 la reducción en el número o frecuencia de células madre cancerosas en un tumor; la diferenciación de células tumorigénicas a un estado no tumorigénico o alguna combinación de efectos.
- 65
- El término "polinucleótido" o la expresión "ácido nucleico", tal como se utilizan de manera indistinta en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases y/o sus análogos o cualquier sustrato que se puede incorporar en un polímero por una polimerasa de ADN o de ARN. Un polinucleótido puede

comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación de la estructura nucleotídica se puede impartir antes o después del ensamblado del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de polimerización, por ejemplo por conjugación con un componente marcador.

5 Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "caperuzas protectoras", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural por un análogo, modificaciones internucleotídicas, tales como, por ejemplo, las que tienen enlaces si carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosforiésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.) y con carga (por ejemplo, fósforotioatos, fósforoditioatos, etc.), las que contienen partes colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), la que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), las que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), las que contienen alquiladores, las que tienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.) así como formas no modificadas de uno o varios polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo habitualmente presentes en los azúcares se pueden sustituir, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar, o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o se pueden conjugar con soportes sólidos. Un OH terminal 5' y 3' se puede fosforilar o sustituir con aminas o con partes de grupos de caperuzas protectoras orgánicas o con de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que se conocen en general en la técnica y que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metilo-, 2'-O-alilo, 2'-fluor- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares alfa anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosa o lixosa, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosa, análogos acíclicos y análogos nucleosídicos abásicos, tales como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos enlazadores alternativos. Estos grupos enlazadores alternativos incluyen pero sin limitación realizaciones en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR<sub>2</sub> ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH<sub>2</sub> ("formacetal"), siendo cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (de 1 a 20 átomos de carbono) que opcionalmente contiene un enlace éter (–O–) arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido han de ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

El término "vector" significa una construcción que es capaz de suministrar y preferentemente expresar uno o más genes o secuencias de interés en una célula hospedadora. Como ejemplos de vectores se incluyen, pero sin limitación, vectores víricos, vectores de expresión de ADN o ARN no marcados, plásmidos, cósmidos o vectores de fagos, vectores de expresión de ADN o de ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucariotas tales como células productoras.

En el presente documento, los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan de manera indistinta para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede interrumpirse por sustancias diferentes de aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de manera natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlace disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente marcador. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los polipéptidos de la presente divulgación se basan en anticuerpos, en determinadas realizaciones, los polipéptidos se pueden presentar como cadenas sencillas o asociadas.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje específico de nucleótidos o restos aminoácidos que son los iguales cuando se comparan y alinean (introduciendo huecos, si fuera necesario) para obtener una correspondencia máxima, sin tener en cuenta ninguna de las sustituciones conservativas de aminoácidos como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad se puede medir utilizando un programa informático o algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual. En la técnica se conocen varios algoritmos y programas informáticos que se pueden utilizar para obtener alineaciones de secuencias de aminoácidos o de nucleótidos. Un ejemplo no limitante de un algoritmo de alineación de secuencias

es el algoritmo descrito en Karlin et al., 1990, *Proc. Nati. Acad. Sci.*, 87:2264-2268, modificado en Karlin et al., 1993, *Proc. Nati. Acad. Sci.*, 90:5873-5877, e incorporado en los programas NBLAST y XBLAST (Altschul et al., 1991, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402). En determinadas realizaciones, se puede utilizar BLAST con huecos (*Gapped*) como se describe en Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. De manera adicional, están disponibles públicamente programas informáticos BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul et al., 1996, *Methods in Enzymology*, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) o Megalign (DNASTAR) que se pueden utilizar para alinear secuencias. En determinadas realizaciones, el porcentaje identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina utilizando el programa GAP en el paquete informático GCG (por ejemplo, utilizando la matriz NWGapDNA.CMP y una ponderación de hueco de 40, 50, 60, 70 o 90 y una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6). En determinadas realizaciones alternativas, el programa GAP en el paquete informático GCG, el cual incorpora el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) se puede utilizar para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos (por ejemplo, utilizando la matriz BLOSUM 62 o la matriz PAM250 y una ponderación de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4 o 5). De manera alternativa, en determinadas realizaciones, el porcentaje de identidad entre secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Myers y Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)). Por ejemplo, el porcentaje de identidad se puede determinar utilizando el programa ALIGN (versión 2.0) y utilizando un PAM120 con una Tabla de restos, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Un experto en la materia puede determinar los parámetros apropiados para alineación máxima a través de un programa informático de alineación particular. En determinadas realizaciones se utilizan los parámetros por defecto del programa informático de alineación. En determinadas realizaciones, el porcentaje de identidad "X" de una primera secuencia de aminoácidos con respecto a una segunda secuencia de aminoácidos se calcula como  $100 \times (Y/Z)$ , siendo Y el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas en la alineación de la primera y segunda secuencias (alineadas por inspección visual o mediante un programa de alineación de secuencia particular) y Z el número total de restos en la segunda secuencia. Si la longitud de una primera secuencia es mayor que la de la segunda secuencia, el porcentaje de identidad de la primera secuencia con respecto al de la segunda secuencia será más mayor que el porcentaje de identidad de la segunda secuencia con respecto a la primera secuencia.

Como un ejemplo no limitante, en algunas realizaciones se puede determinar si cualquier polinucleótido particular tiene un determinado porcentaje de identidad de secuencia (por ejemplo, es al menos 80 % idéntico, al menos 85 % idéntico, al menos 90 % idéntico y en algunas realizaciones, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico) con una secuencia de referencia, utilizando el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 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 utiliza 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 manera que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia de nucleótidos de referencia y se permiten huecos en homología de hasta un 5 % del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

En algunas realizaciones, dos ácidos nucleicos o polipéptidos de la divulgación son sustancialmente idénticos, lo que significa que tienen al menos 70 %, al menos 75 %, preferentemente al menos 80 %, de manera más preferente al menos 85 %, de manera más preferente al menos 90 % y en algunas realizaciones, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de restos de aminoácidos o de nucleótidos, cuando se comparan y se alinean para obtener una correspondencia máxima, medida utilizando un algoritmo de comparación de secuencia o por inspección visual. Preferentemente, existe identidad sobre una región de las secuencias que tiene una longitud de al menos aproximadamente 10, de manera preferente de aproximadamente 20, de manera más preferente de aproximadamente 40-60 restos o cualquier valor integral entre los mismos, preferentemente sobre una región más larga de 60-80 restos, de manera más preferente al menos aproximadamente 90-100 restos y de manera más preferente las secuencias son sustancialmente idénticas sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan, tal como, por ejemplo, la región codificante de una secuencia de nucleótidos.

Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es una en la cual un resto de aminoácido se reemplaza por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han identificado familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, que incluyen, cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisterna), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservadora. Preferentemente, las sustituciones conservativas en las secuencias de los polipéptidos y anticuerpos de la divulgación no anulan la unión del polipéptido o anticuerpo, que contiene la secuencia de aminoácidos, con uno o más antígenos, es decir, el uno o más receptores frizzled humanos con los cuales se une el polipéptido o anticuerpo. En la técnica se conocen bien métodos de identificación de sustituciones conservativas de nucleótidos y aminoácidos, que no eliminan la unión con el antígeno, (véase, por ejemplo, Brummell et al., *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12 (10): 879-884 (1999); y Burks et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. EUA* 94:412-417 (1997)).

Como se utiliza en la presente divulgación y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "uno(a)", "el" y "la" incluye las formas plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

5 Se entiende que siempre que las realizaciones se describan en este documento con el lenguaje "que comprende", de otro modo se proporcionan también realizaciones análogas descritas en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

10 El término "y/o", tal y como como se utiliza en el presente documento una frase tal como "A y/o B", pretende incluir tanto "A como B", "A o B", "A" y "B". Del mismo modo, el término "y/o", como se utiliza en una frase tal como "A, B y/o C" pretende incluir cada una de las siguientes modalidades: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (únicamente); B (únicamente); y C (únicamente).

15 Las "condiciones de alta rigurosidad", se pueden identificar por aquellas que: (1) emplean una baja fuerza iónica y alta temperatura de lavado, por ejemplo, cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecilsulfato de sodio 0,1 % a 50 °C; (2) durante hibridación emplean un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón de fosfato de sodio 50 mM a un pH de 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C; o (3) emplean formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,75 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1 %, solución de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmón sometido a ultrasonido (50 µg/ml), SDS al 0,1 % y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C con lavados a 42 °C en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y formamida al 50 % a 55 °C seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55 °C.

25 II. Agentes que se unen a FZD

La presente divulgación proporciona agentes que se unen específicamente a uno o más receptores frizzled humanos (FZD). Estos agentes se denominan en el presente documento "agentes de unión a FZD". En determinadas realizaciones, los agentes se unen específicamente a dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez receptores frizzled. El receptor, o los receptores, frizzled humanos unidos por el agente se pueden seleccionar del grupo que consiste en FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9 y FZD10. En determinadas realizaciones, el uno o más receptores frizzled humanos comprenden FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y/o FZD8. En determinadas realizaciones, el uno o más receptores frizzled humanos comprenden FZD7. En determinadas realizaciones, el uno o más receptores frizzled humanos comprenden FZD5 y/o FZD8. En determinadas realizaciones, el agente se une específicamente a FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8. Las secuencias de longitud completa de aminoácidos (aa) y de nucleótidos (nt) para FZD11-10 se conocen en la técnica y también se proporcionan en el presente documento como SEQ ID NO: 26 (FZD1 aa), SEQ ID NO: 30 (FZD2 aa), SEQ ID NO: 34 (FZD3 aa), SEQ ID NO: 38 (FZD4 aa), SEQ ID NO: 42 (FZD5 aa), SEQ ID NO: 46 (FZD6 aa) , SEQ ID NO: 50 (FZD7 aa) , SEQ ID NO: 54 (FZD8 aa) , SEQ ID NO: 58 (FZD9 aa) , SEQ ID NO: 62 (FZD10 aa) , SEQ ID NO: 29 (FZD1 nt) , SEQ ID NO: 33 (FZD2 nt) , SEQ ID NO: 37 (FZD3 nt) , SEQ ID NO: 41 (FZD4 nt) , SEQ ID NO: 45 (FZD5 nt) , SEQ ID NO: 49 (FZD6 nt) , SEQ ID NO: 53 (FZD7 nt) , SEQ ID NO: 57 (FZD8 nt) , SEQ ID NO: 61 (FZD9 nt) y SEQ ID NO: 65 (FZD10 nt) .

45 En determinadas realizaciones, el anticuerpo u otro polipéptido o agente descrito en el presente documento se une específicamente a FZD7. Adicionalmente, en determinadas realizaciones, ése anticuerpo, polipéptido o agente puede unirse específicamente o reaccionar en cruzado con uno o más receptores frizzled humanos adicionales.

50 En determinadas realizaciones, el anticuerpo u otro polipéptido o agente descrito en el presente documento se une específicamente a FZD5. Adicionalmente, en determinadas realizaciones, ése anticuerpo, polipéptido o agente puede unirse específicamente o reaccionar en cruzado con uno o más receptores frizzled humanos adicionales.

55 En determinadas realizaciones, el agente se une específicamente a dos o más receptores frizzled humanos. En determinadas realizaciones, los dos o más receptores frizzled humanos se seleccionan del grupo que consiste en FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8. En determinadas realizaciones, los dos o más receptores frizzled comprenden FZD1 y un segundo receptor frizzled seleccionado del grupo que consiste en FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8. En determinadas realizaciones, los dos o más receptores frizzled comprenden FZD2 y un segundo receptor frizzled seleccionado del grupo que consiste en FZD1, FZD5, FZD7 y FZD8. En determinadas realizaciones, los dos o más receptores frizzled comprenden FZD5 y un segundo receptor frizzled seleccionado del grupo que consiste en FZD1, FZD5, FZD7 y FZD8. En determinadas realizaciones, los dos o más receptores frizzled comprenden tanto FZD5 como FZD8. En determinadas realizaciones, los dos o más receptores frizzled comprenden FZD7 y un segundo receptor frizzled seleccionado del grupo que consiste en FZD1, FZD5, FZD7 y FZD8.

65 En determinadas realizaciones, el agente se un específicamente a tres o más receptores frizzled humanos. En determinadas realizaciones, los tres o más receptores frizzled humanos tres o más receptores frizzled seleccionados del grupo que consiste en FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8. En determinadas realizaciones, el agente adicional se une específicamente a uno o más receptores frizzled humanos adicionales.

- En determinadas realizaciones, el agente o anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular (DEC) dentro del uno o más receptores frizzled humanos con los que se une. En la técnica se conocen las secuencias del dominio extracelular de cada uno de los receptores frizzled humanos y también se proporcionan como SEQ ID NO: 27 (DEC de FZD1), SEQ ID NO: 31 (DEC de FZD2), SEQ ID NO: 35 (DEC de FZD3), SEQ ID NO: 39 (DEC de FZD4), SEQ ID NO: 43 (DEC de FZD5), SEQ ID NO: 47 (DEC de FZD6), SEQ ID NO: 51 (DEC de FZD7), SEQ ID NO: 55 (DEC de FZD8), SEQ ID NO: 59 (DEC de FZD9) y SEQ ID NO: 63 (DEC de FZD10).
- En determinadas realizaciones, el agente o anticuerpo se une específicamente al dominio Fri (FRI) (también conocido como el dominio rico en cisteína (DRC)), dentro de uno o varios receptores frizzled humanos con los que se une. En la técnica se conocen las secuencias del dominio Fri de cada uno de los receptores frizzled humanos y también se proporcionan como SEQ ID NO: 28 (FRI de FZD1), SEQ ID NO: 32 (FRI de FZD2), SEQ ID NO: 36 (FRI de FZD3), SEQ ID NO: 40 (FRI de FZD4), SEQ ID NO: 44 (FRI de FZD5), SEQ ID NO: 48 (FRI de FZD6), SEQ ID NO: 52 (FRI de FZD7), SEQ ID NO: 56 (FRI de FZD8), SEQ ID NO: 60 (FRI de FZD9) y SEQ ID NO: 64 (FRI de FZD10).
- En determinadas realizaciones, un sitio de unión a antígeno individual de un anticuerpo o polipéptido que une a FZD descrito en el presente documento, es capaz de unirse (o se une) a uno, dos, tres, cuatro o cinco (o más) receptores frizzled humanos. En determinadas realizaciones, un sitio de unión a antígeno individual del anticuerpo o polipéptido que une FZD es capaz de unirse específicamente a uno, dos, tres, cuatro o cinco receptores frizzled humanos seleccionados del grupo que consiste en FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8. En determinadas realizaciones, un sitio de unión individual del anticuerpo o polipéptido se une específicamente a al menos FZD5 y FZD8.
- En determinadas realizaciones, el agente o anticuerpo de unión a FZD, se une a uno o más receptores frizzled humanos (por ejemplo dos o más, tres o más o cuatro o más) con una constante de disociación ( $K_D$ ) de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  o menor, aproximadamente 100  $\text{mM}$  o menor, aproximadamente 40  $\text{nM}$  o menor, aproximadamente 20  $\text{nM}$  o menor, o aproximadamente 10  $\text{nM}$  o menor. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un agente o anticuerpo de unión a FZD descrito en el presente documento que se une a más de un FZD, se une a aquellos FZD que tienen una  $K_D$  de aproximadamente 100  $\text{nM}$  o menor, aproximadamente 20  $\text{nM}$  o menor, o aproximadamente 10  $\text{nM}$  o menor. En determinadas realizaciones, el agente o anticuerpo de unión a FZD se une a cada uno de uno o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5) de los siguientes FZD con una constante de disociación de aproximadamente 40  $\text{nM}$  o menor: FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8. En determinadas realizaciones, el agente o anticuerpo de unión a FZD se une a cada uno de uno o más de los siguientes FZD con una constante de disociación de aproximadamente 10  $\text{nM}$  o menor: FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8. En determinadas realizaciones, el agente o anticuerpo de unión a FZD se une a cada uno de los siguientes FZD con una constante de disociación de aproximadamente 10  $\text{nM}$  o menor: FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8. En determinadas realizaciones, la constante de disociación del agente o anticuerpo de unión a un FZD particular, es la constante de disociación determinada utilizando una proteína de fusión FZD-Fc que comprende el dominio extracelular de FZD o el dominio Fri inmovilizado en una microplaca Biacore.
- En determinadas realizaciones, el agente o anticuerpo de unión a FZD se une a uno o más (por ejemplo, dos o más, tres o más o cuatro o más) receptores frizzled humanos con una  $\text{CE}_{50}$  de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  o menor, aproximadamente 100  $\text{nM}$  o menor, aproximadamente 40  $\text{nM}$  o menor, aproximadamente 20  $\text{nM}$  o menor, aproximadamente 10  $\text{nM}$  o menor o aproximadamente 1  $\text{nM}$  o menor. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un agente o anticuerpo de unión a FZD descrito en el presente documento que se une a más de un FZD tiene una  $\text{CE}_{50}$  de aproximadamente 40  $\text{nM}$  o menor, aproximadamente 20  $\text{nM}$  o menor, o aproximadamente 10  $\text{nM}$  o menor con respecto a los de FZD. En determinadas realizaciones, el agente o anticuerpo que une FZD tiene una  $\text{CE}_{50}$  de aproximadamente 2 0  $\text{nM}$  o menos con respecto a uno o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5) de los siguientes FZD: FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8. En determinadas realizaciones, el agente o anticuerpo de unión a FZD tiene una  $\text{CE}_{50}$  de aproximadamente 10  $\text{nM}$  o menor con respecto a uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) de los siguientes FZD: FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8. En determinadas realizaciones, el agente o anticuerpo de unión a FZD tiene una  $\text{CE}_{50}$  de aproximadamente 40  $\text{nM}$  o menor o de 20  $\text{nM}$  o menor con respecto a la unión de FZD5 y/o FZD8.
- En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD (por ejemplo, anticuerpo) se une al mismo epítopo, o se une a un epítopo, que se superpone con el epítopo de un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 14 (por ejemplo, el anticuerpo de IgG 18R5 o 18R8). En determinadas realizaciones, el agente o anticuerpo de unión a FZD se une al mismo epítopo, o se une a un epítopo, que se superpone con el epítopo de un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 13 o la SEQ ID NO: 15. En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD se une al mismo epítopo, o se une a un epítopo, que se superpone con el epítopo de un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 85 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 86 (por ejemplo, el anticuerpo de IgG 44R24).
- En determinadas realizaciones, en un ensayo de unión competitiva, el agente de unión a FZD compite por la unión específica a un receptor frizzled humano con un anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende una región variable

- de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 14. En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD compite por la unión específica a un receptor frizzled humano con un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15. En determinadas realizaciones, el anticuerpo con el cual compite el agente por la unión específica con el receptor frizzled humano es un anticuerpo de IgG 18R5. En determinadas realizaciones alternativas, el anticuerpo es un anticuerpo de IgG 18R8.
- En determinadas realizaciones, en un ensayo de unión competitiva, el agente de unión a FZD compite por la unión específica a un receptor frizzled humano con un anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 85 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 86.
- En determinadas realizaciones, el agente o anticuerpo de unión a FZD se une a al menos parte de una región de un receptor frizzled humano que los inventores denominaron sitio de unión biológica (SUB) (Figura 9, Ejemplo 6). En el FZD8 humano (SEQ ID NO: 54), el SUB consiste en: (a) un epítopo conformacional que consiste en los aminoácidos 72(F), 74-75(PL), 78(1), 92(Y), 121-122(LM) y 129-132 (WPDR (SEQ ID NO: 70)) (la "hendidura" del SUB que se muestra en las Figura 8 y 9); (b) una región de FZD8 que consiste en la secuencia GLEVHQ (SEQ ID NO: 25) (el "borde superior" del SUB que se muestra en las Figuras 8 y 9); y (c) una región de FZD8 que consiste en la secuencia YGFA (SEQ ID NO: 74) (el "borde inferior" del SUB que se muestra en las Figuras 8 y 9). Los restos correspondientes del SUB en FZD1-7, FZD9 y FZD10 se identifican a continuación en la Tabla 1 y en la Figura 8. En determinadas realizaciones, un agente que bloquea la unión de un ligando (por ejemplo, un Wnt) con el FZD inhibe la unión del ligando con el SUB. Se entiende que, en determinadas realizaciones, los agentes que se unen a al menos parte del SUB también se pueden unir a una o más regiones en otra parte (es decir, fuera del SUB) en el receptor frizzled humano. En otras palabras, en determinadas realizaciones, el epítopo al cual se une el agente o anticuerpo de unión a FZD, es una región dentro del dominio extracelular del receptor FZD que se superpone con el SUB, pero que no está completamente incluida dentro del SUB. En determinadas realizaciones alternativas, el epítopo al cual se une el agente o anticuerpo de unión a FZD, está completamente incluido dentro del SUB (es decir, el SUB comprende todo el epítopo al cual se une el anticuerpo u otro agente de unión a FZD).

30

Tabla 1. Sitios de unión biológica (SUB) de los receptores FZD

Receptor frizzled humano (secuencia de aa)	Restos de aminoácidos que forman el sitio de unión biológica (SUB)
FZD1 (SEQ ID NO: 26)	147-153(GLEVHQF), 155-156(PL), 159(V), 173(Y), 201-202(LM), 205- 212 (FGFQWPDT)
FZD2 (SEQ ID NO: 30)	70-76(GLEVHQF), 78-79(PL), 82(V), 96(Y), 124-125(LM), 128-135 (FGFQWP PER)
FZD3 (SEQ ID NO: 34)	59-65 (ALAMEPF), 67-68(PM), 71(L), 85(Y), 113-114(LM), 117-124 (FGVPWPED)
FZD4 (SEQ ID NO: 38)	79-85(ELQLTTF), 87-88(PL), 91(Y), 105(Y), 134-135(VL), 138-145(FGFAWPES)
FZD5 (SEQ ID NO: 42)	64-70(GLEVHQF), 72-73(PL), 76(1), 90(Y), 119-120(LM), 123-130(YGFAWP PER)
FZD6 (SEQ ID NO: 46)	55-61(AVEMEHF), 63-64(PL), 81(F), 109-110(LI), 113-120(FGIRWPEE)
FZD7 (SEQ ID NO: 50)	80-86(GLEVHQF), 88-89(PL), 92(V), 106(Y), 134-135 (LM) , 138-145(FGFQWP PER)
FZD8 (SEQ ID NO: 54)	66-72(GLEVHQF), 74-75(PL), 78(1), 92(Y) , 121-122(LM) y 125-132(YGFAWPDR)
FZD9 (SEQ ID NO: 58)	70-76(AAELAEF), 78-79(PL), 82(Y), 96(Y), 125-126(IM), 129-136(FNFGWPDS)
FZD10 (SEQ ID NO: 62)	65-71(AIQLHEF), 73-74(PL), 77(Y), 91(Y), 120-121(IM), 124-131(FNFKWPDS)

- Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se considera que el SUB comprende un posible sitio de unión a ligando, tal como un sitio de unión para Wnt. En FZD8, este posible sitio de unión a ligando comprende el epítopo conformacional formado por los aminoácidos 72(F), 74-75(PL), 78(1), 92(Y), 121-122(LM) y 129-132(WPDR (SEQ ID NO: 70)) (la "hendidura" del SUB que se muestra en las Figuras 8 y 9). Los restos correspondientes del posible sitio de unión a ligando en FZD1-7, FZD9 y FZD10 se muestran en la alineación de secuencias de la Figura 8. En determinadas realizaciones, un agente que bloquea la unión de un ligando (por ejemplo, un Wnt) con el SUB, inhibe la unión de ligando a este epítopo conformacional. Se entiende que, en determinadas realizaciones, los agentes que se unen a al menos parte de este sitio de unión a ligando también se pueden unir a una región en otra parte (por ejemplo, fuera del SUB) en el receptor frizzled humano. En determinadas realizaciones alternativas, el agente no se une a ninguna parte del FZD fuera del epítopo conformacional.

En determinadas realizaciones, el agente se une a al menos parte de la secuencia QDEAGLEVHQFWPL (SEQ ID NO: 67) dentro del receptor frizzled humano, si el receptor frizzled humano es FZD8, o la secuencia correspondiente si el receptor frizzled humano es FZD1-7, FZD9 o FZD10. Esta región en los FZD comprende el "borde superior" del SUB identificado en las Figuras 8 y 9. Las secuencias que corresponden al epítopo QDEAGLEVHQFWPL (SEQ ID NO: 67) de FZD8 en los diversos receptores frizzled se identifican en la Tabla 2, más adelante, y también se ponen de manifiesto en la alineación de la Figura 8. En determinadas realizaciones, el agente se une específicamente a un receptor frizzled humano seleccionado del grupo que consiste en FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8 y el agente se une a al menos parte de la secuencia Q(DE/ED)AGLEVHQF(Y/W)PL (SEQ ID NO: 24) dentro del receptor frizzled humano. En determinadas realizaciones, el agente se une específicamente al menos parte de la secuencia AGLEVHQF (SEQ ID NO: 68) dentro de uno o varios receptores frizzled humanos FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y/o FZD8. En determinadas realizaciones, el agente se une a al menos parte de una secuencia en FZD3, FZD4, FZD6, FZD 9 y/o FZD10 que corresponde a la secuencia AGLEVHQF (SEQ ID NO: 68) en FZD8. En determinadas realizaciones, el agente se une específicamente a al menos parte de la secuencia GLEVHQ (SEQ ID NO: 25) dentro de uno o varios receptores frizzled humanos FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y/o FZD8. Esta secuencia es el "borde superior" del SUB mostrado en la Figura 9. En determinadas realizaciones, el agente se une a al menos parte de la secuencia en FZD3, FZD4, FZD6, FZD9 y/o FZD10 que corresponde a la secuencia GLEVHQ (SEQ ID NO: 25) en FZD8. Las secuencias que corresponden a la secuencia GLEVHQ (SEQ ID NO: 25) de FZD8 están subrayadas en la segunda y tercera columnas de la Tabla 2 a continuación y se ponen de manifiesto en la alineación de secuencias de la Figura 8. En determinadas realizaciones, un agente que se une a al menos parte de la SEQ ID NO: 67 o 68 en FZD8, o a un epítopo correspondiente en otro FZD, inhibe la unión de un ligando (por ejemplo, un Wnt) con el FZD (por ejemplo, con el SUB del FZD). En determinadas realizaciones, los agentes que se unen a las regiones indicadas anteriormente también se pueden unir a regiones adicionales en otra parte (es decir, fuera de las regiones especificadas anteriormente) del receptor frizzled humano.

25 Tabla 2. Regiones correspondientes a receptores frizzled humanos

FZD (secuencia de aa)	aa que corresponden a los aa 62-75 (QDEAGLEVHQFWPL; SEQ ID NO: 67) de FZD8 (SEQ ID NO:54) <sup>a</sup>	aa que corresponden a los aa 65-72 (AGLEVHQF; SEQ ID NO: 68) de FZD8 (SEQ NO:54) <sup>a</sup>	aa que corresponden a los aa 124-128 (QYGFA; SEQ ID NO:66) de FZD (SEQ NO: 54) <sup>a</sup>
FZD1 (SEQ ID NO:26)	143-156 (QEDAGLEVHQFYPL)	146-153 (AGLEVHQF)	204-208 (KFGFQ)
FZD2 (SEQ ID NO: 30)	66-79 (QEDAGLEVHQFYPL)	69-76 (AGLEVHQF)	127-131 (KFGFQ)
FZD3 (SEQ ID NO: 34)	55-68 (QQTAA <u>L</u> AMEPFHPM)	58-65 (AALAMPEF)	116-120 (MFGVP)
FZD4 (SEQ ID NO: 38)	75-88 (QTDAE <u>L</u> QLTTFTPL)	78-85 (AELQLTTF)	137-141 (EFGFA)
FZD5 (SEQ ID NO: 42)	60-73 (QDEAGLEVHQFWPL)	63-70 (AGLEVHQF)	122-126 (QYGFA)
FZD6 (SEQ ID NO: 46)	51-64 (QSIAAVEMEHFLPL)	54-61 (AAVEMEHF)	112-116 (TFGIR)
FZD7 (SEQ ID NO: 50)	76-89 (QEDAGLEVHQFYPL)	79-86 (AGLEVHQF)	137-141 (KFGFQ)
FZD9 (SEQ ID NO: 58)	66-79 (QGEAA <u>E</u> ELAEFAPL)	69-76 (AAEELAEF)	128-132 (QFNFG)
FZD10 (SEQ ID NO: 62)	61-74 (QREAA <u>I</u> QLHEFAPL)	64-71 (AAIQLHEF)	123-127 (QFNFK)

(a): Se subrayan las secuencias que corresponden a los aa 66-71 GLEVHQ (SEQ ID NO: 25) de FZD8 (SEQ ID NO: 54).  
 (b) : Se subrayan las secuencias que corresponden a los aa 125-128 YGFA (SEQ ID NO: 74) de FZD8 (SEQ ID NO: 54)

En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD se une a al menos parte de una región que consiste en la secuencia QYGFA (SEQ ID NO: 66) si el receptor frizzled humano es FZD8, que comprende el "borde inferior" del SUB, o la secuencia correspondiente si el receptor frizzled humano es FZD1-7, FZD9 o FZD10. Las secuencias que corresponden a la región QYGFA (SEQ ID NO: 66) en los diversos receptores frizzled se identifican en la Figura 8 y en la Tabla 2 anterior. En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD se une a al menos parte de una región que consiste en la secuencia YGFA (SEQ ID NO: 74), el "borde inferior" del SUB, si el receptor frizzled humano es FZD8, o la secuencia correspondiente si el receptor frizzled humano es FZD1-7, FZD9 o FZD10. Las secuencias que corresponden a la región YGFA (SEQ ID NO: 74) en los diversos receptores frizzled se identifican en la Figura 8 y se subrayan en la cuarta columna de la Tabla 2 anterior. En determinadas realizaciones, un agente que se une a al menos parte de la SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 74 en FZD8, o a su secuencia correspondiente en otro FZD, inhibe la unión de un ligando (por ejemplo, un Wnt) al FZD (por ejemplo, el SUB del FZD). En determinadas realizaciones, los agentes que se unen a esta región también se pueden unir a uno o más restos de aminoácidos en otra parte (es decir, fuera de esta región) del receptor frizzled humano.

- En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD se une a al menos parte de la región que forma el "borde superior" del SUB, así como a al menos una parte de la región que forma el "borde inferior" del SUB. En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD, que se une a al menos parte de Q(DE/ED)AGLEVHQF(Y/W)PL (SEQ ID NO: 24) dentro de FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y/o FZD8, QDEAGLEVHQFWPL (SEQ ID NO: 67) dentro de FZD8, AGLEVHQF (SEQ ID NO: 68) dentro de FZD8 y/o GLEVHQ (SEQ ID NO: 25) dentro de FZD8 y/o una secuencia que corresponde a cualquiera de estas secuencias en un receptor frizzled humano diferente (como se define en la Tabla 2 anterior) se une adicionalmente a al menos parte de QYGFA (SEQ ID NO: 66) dentro de FZD8 o YGFA (SEQ ID NO: 74) dentro de FZD8, y/o una secuencia que corresponde a una de estas secuencias dentro de FZD1-7, FZD9 o FZD10 (como se define en la Tabla 2 anterior). En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD se une a al menos parte de la secuencia GLEVHQ (SEQ ID NO: 25) dentro de FZD8, así como a al menos parte de la secuencia YGFA (SEQ ID NO: 74) dentro de FZD8. En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD se une a al menos parte de una región de FZD1-7, FZD9 o FZD10 que corresponde a la secuencia GLEVHQ (SEQ ID NO: 25) en FZD8, así como a al menos parte de una región de FZD1-7, FZD9 o FZD10 que corresponde a la secuencia YGFA (SEQ ID NO: 74) en FZD8. En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD que se une a las secuencias indicadas también se une a una o más secuencias en otra parte dentro de uno o varios de los receptores frizzled humanos a los cuales se une. En otras palabras, en determinadas realizaciones, el epítopo al cual se une el agente o anticuerpo que se une a FZD, es una región dentro del dominio extracelular de FZD que se superpone solo parcialmente con las secuencias indicadas anteriormente. En determinadas realizaciones alternativas, el epítopo completo al cual se une el agente de unión a FZD está completamente incluido en las secuencias indicadas anteriormente.
- En determinadas realizaciones, el agente es un polipéptido. En determinadas realizaciones, el agente o polipéptido es un anticuerpo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de IgG1 o un anticuerpo de IgG2. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
- Los anticuerpos u otros agentes de la presente divulgación se pueden analizar para determinar la unión específica por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que se pueden utilizar incluyen, pero sin limitación sistemas de ensayos competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como análisis BIACore, análisis FACS, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitación, reacciones de precipitininas en gel por difusión, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos con fluorescencia e inmunoensayos con proteína A. Dichos ensayos son habituales y muy 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).
- Por ejemplo, la unión específica de un anticuerpo con un receptor frizzled humano se puede determinar utilizando ELISA. Un ensayo de ELISA comprende preparar antígenos, recubrir los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con antígeno, añadir a los pocillos el anticuerpo que se une a FZD u otro agente de unión a FZD conjugado con un compuesto detectable, tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina), incubar durante un período de tiempo y detectar la presencia del antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo o agente de unión a FZD no se conjuga con un compuesto detectable, sino que se añade al pocillo un segundo anticuerpo conjugado que reconoce el anticuerpo o agente de unión a FZD. En algunas realizaciones, en vez de recubrir el pocillo con el antígeno, el pocillo se puede recubrir con el anticuerpo o agente de unión a FZD y puede añadirse un segundo anticuerpo conjugado con un compuesto detectable después de la adición del antígeno al pocillo recubierto. Un experto en la técnica conocerá los parámetros que se pueden modificar para aumentar la señal detectada, así como otras variaciones del ensayo ELISA conocidas 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 11.2.1).
- La afinidad de unión de un anticuerpo u agente con un receptor frizzled humano y la velocidad 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 de un antígeno marcado (por ejemplo, con <sup>3</sup>H o <sup>125</sup>I), o de un fragmento o variante del mismo, con el anticuerpo de interés, en presencia de cantidades cada vez mayores de antígeno no marcado seguido de la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo contra un receptor frizzled y las velocidades de disociación se pueden determinar a partir de los datos por análisis de gráficas Scatchard. En algunas realizaciones, se utiliza el análisis cinético BIACore para determinar las velocidades de formación y eliminación de unión de los anticuerpos o agentes que se unen a uno o más receptores frizzled humanos. El análisis cinético BIACore comprende analizar la unión y disociación de los anticuerpos a partir de microplaca con antígenos FZD inmovilizados en su superficie.
- En determinadas realizaciones, el agente (por ejemplo, anticuerpo) es un antagonista de al menos un receptor frizzled humano (es decir, los FZD 1-10) unidos por el agente. En determinadas realizaciones, el agente inhibe al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos

aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 90 % o aproximadamente 100 % de uno o más de la actividad del receptor frizzled humano unido.

En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD inhibe la unión de un ligando con el al menos un receptor frizzled humano. En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD, inhibe la unión de un ligando con el sitio de unión biológica (SUB) del receptor frizzled humano. En determinadas realizaciones, el ligando es una proteína Wnt humana. Se han identificado diecinueve proteínas Wnt humanas: WNT1, WNT 2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT 9 A (anteriormente WNT14), WNT9B (anteriormente WNT15), WNT10A, WNT10B, WNT11 y WNT16. En determinadas realizaciones, el agente inhibe la unión de WNT3A con FZD8. En determinadas realizaciones, la inhibición de la unión de un ligando particular con una proteína frizzled humana particular proporcionada por el agente de unión a FZD es de al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 95 %. En determinadas realizaciones, un agente que inhibe la unión de un ligando, tal como un Wnt a un FZD, inhibe además la señalización Wnt (por ejemplo, inhibe la señalización Wnt canónica).

En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD inhibe la señalización Wnt. Se entiende que un agente de unión a FZD que inhibe la señalización Wnt, en determinadas realizaciones, puede inhibir la señalización por uno o más Wnt, pero no necesariamente por todos los Wnt. En determinadas realizaciones alternativas, se puede inhibir la señalización por todos los Wnt humanos. En determinadas realizaciones se inhibe la señalización por uno o más Wnt seleccionados del grupo que consiste en WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A (anteriormente WNT14), WNT9B (anteriormente WNT15), WNT10A, WNT10B, WNT11 y WNT16. En determinadas realizaciones, la señalización Wnt que se inhibe es señalización por WNT1, WNT2, WNT3, WNT3A, WNT7a, WNT7b y/o WNT10B. En determinadas realizaciones, el agente inhibe señalización por (al menos) WNT1, WNT3A, WNT7b y WNT10B. En realizaciones particulares, el agente inhibe la señalización por (al menos) WNT3A. En determinadas realizaciones, la inhibición de señalización por un Wnt proporcionado por el agente de unión a FZD es una reducción en el nivel de señalización por el Wnt de al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 95 %. En determinadas realizaciones, la señalización Wnt que se inhibe es señalización Wnt canónica.

En la técnica se conocen ensayos *in vivo* e *in vitro* para determinar si un agente de unión a FZD (o agente candidato de unión a FZD) inhibe la señalización Wnt. Por ejemplo, pueden utilizarse ensayos con indicador luciferasa, basados en células, que utilizan un vector indicador TCF/Luc que contiene copias múltiples del dominio de unión a TCF hacia el extremo 5' de un gen indicador de luciferasa de luciérnaga, para medir los niveles de señalización Wnt canónica *in vitro* (Gazit et al., 1999, Oncogene 18: 5959-66). El nivel de señalización Wnt en presencia de uno o más Wnt (por ejemplo, uno o más Wnt expresados por células transfectadas o que se proporcionan en medios acondicionados para Wnt) con el agente de unión a FZD presente, se compara con el nivel de señalización sin el agente de unión a FZD presente. Más adelante, en los Ejemplos 3 y 11, se proporcionan ejemplos específicos no limitantes del uso de dicho ensayo con el indicador luciferasa para evaluar la inhibición de la señalización Wnt canónica. Además del ensayo con indicador TCF/luc, el efecto de un agente de unión a FZD (o agente candidato) sobre la señalización Wnt canónica se puede medir *in vitro* o *in vivo* midiendo el efecto del agente sobre el nivel de expresión de genes regulados por beta-catenina, tales como c-myc (He et al., Science, 281:1509-12 (1998)), ciclina D1 (Tetsu et al., Nature, 398:422-6 (1999)) y/o fibronectina (Gradl et al. Mol. Cell Biol., 19:5576-87 (1999)). En determinadas realizaciones, el efecto de un agente sobre la señalización Wnt también se puede evaluar midiendo el efecto del agente sobre el estado de fosforilación de Dishevelled-1, Dishevelled-2, Dishevelled-3, LRP5, LRP6 y/o beta-catenina. En otras realizaciones adicionales, el efecto de un agente de unión a FZD sobre la señalización Wnt se determina evaluando el impacto del agente de unión a FZD sobre el nivel de expresión de uno o más genes en una firma Wnt.

En determinadas realizaciones, los agentes que se unen a FZD tienen uno o más de los siguientes efectos: inhibir la proliferación de células tumorales, reducir la tumorigenidad de un tumor al reducir la frecuencia de las células madre cancerosas en el tumor, inhibir el crecimiento de tumor, aumentar la supervivencia, desencadenar la muerte celular de células tumorales, diferenciar células tumorigénicas a un estado no tumorigénico, o impedir metástasis de células tumorales.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos u otros agentes que une específicamente uno o más receptores frizzled humanos desencadenan la muerte celular a través de una toxina conjugada, un agente quimioterapéutico, un radioisótopo u otro agente similar. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un anticuerpo contra un anticuerpo frizzled humano se conjuga con una toxina que es activada en células tumorales que expresan el FZD por internalización de proteínas. En determinadas realizaciones alternativas, el agente o anticuerpo no se conjuga con una toxina, agente quimioterapéutico o radioisótopo.

En determinadas realizaciones, los agentes de unión a FZD son capaces de inhibir el crecimiento tumoral. En determinadas realizaciones, los agentes de unión a FZD son capaces de inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* (por ejemplo, en un modelo de xenoinjerto en ratón y/o en un ser humano que tiene cáncer).

- En determinadas realizaciones, los agentes de unión a FZD son capaces de reducir la tumorigenidad de un tumor. En determinadas realizaciones, el agente o anticuerpo es capaz de reducir la tumorigenidad de un tumor que comprende células madre cancerosas en un modelo animal, tal como un modelo de xenoinjerto en ratón. En 5 determinadas realizaciones, el número o la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor se reduce al menos aproximadamente dos veces, aproximadamente tres veces, aproximadamente cinco veces, aproximadamente diez veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces o aproximadamente 1000 veces. En determinadas realizaciones, la reducción en el número o la frecuencia de células madre cancerosas se determina por ensayo de dilución limitante utilizando un modelo animal. En el Ejemplo 8 más adelante, se proporciona un ejemplo de un 10 ensayo de dilución limitante utilizado para ensayar la eficacia de un anticuerpo anti FZD. Pueden encontrarse ejemplos adicionales y orientaciones con respecto al uso de ensayos de dilución limitante para determinar una reducción en el número o la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, por ejemplo, en la Publicación Internacional Número WO 2008/042236, en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2008/0064049 y en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2008/0178305.
- 15 En determinadas realizaciones, los anticuerpos contra receptores frizzled humanos actúan como mediadores en la muerte celular de una célula que expresa la proteína FZD mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA). La CCDA implica lisis celular por células efectoras que reconocen la parte Fc de un anticuerpo. Muchos linfocitos, monocitos, macrófagos tisulares, granulocitos y eosinófilos, por ejemplo, tienen receptores Fc que actúan 20 como mediadores en la citólisis (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497).
- En determinadas realizaciones, los anticuerpos contra uno o más FZD desencadenan la muerte celular de una célula que expresa una o varias proteínas de FZD activando la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). La CDC implica la unión del complemento en suero a la parte Fc de un anticuerpo y la activación posterior de la cascada de 25 proteínas del complemento, lo que produce daño a la membrana celular y la muerte celular final. Se sabe que la actividad biológica de los anticuerpos que está determinada, hasta cierto punto, por los dominios constantes o la región Fc de la molécula de anticuerpo (Uananue and Benacerraf, Textbook of Immunology, 2<sup>a</sup> edición, Williams & Wilkins, p. 218 (1984)). Los anticuerpos de clases y subclases diferentes difieren a este respecto, al igual que los 30 anticuerpos de la misma subclase pero de diferente especie. De los anticuerpos humanos, la IgM es la clase más eficaz de anticuerpos para unirse al complemento, seguida de la IgG1, IgG3 e IgG2 mientras que la Ig4 parece ser muy deficiente en cuanto a 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 35 estas clases que tienen la actividad biológica deseada.
- Se puede analizar la capacidad de un anticuerpo particular contra uno o más FZD para mediar en la lisis de la célula diana por activación del complemento y/o CCDA. Las células de interés se cultivan y se marcan *in vitro*; el anticuerpo 40 se añade al cultivo celular en combinación ya sea con complemento de suero o con células inmunitarias que pueden activarse mediante complejos de antígeno-anticuerpo. La citólisis de las células diana se detecta, por ejemplo, por la liberación del marcador de las células que han sufrido lisis. De hecho, los anticuerpos se pueden explorar utilizando el suero del propio paciente como una fuente de complemento y/o células inmunitarias. El anticuerpo que tiene las 45 capacidad de activar el complemento o de actuar como mediador en la CCDA en el ensayo *in vitro*, puede utilizarse después terapéuticamente en ese paciente particular.
- La divulgación proporciona polipéptidos que incluyen, pero sin limitación, anticuerpos que se unen específicamente a 50 uno o más receptores frizzled humanos, que comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis de las CDR de 18R5 y/o 18R8 (véase la Tabla 4 del Ejemplo 1 más adelante) con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservativas de aminoácidos por CDR. De esta manera, la divulgación proporciona polipéptidos que incluyen, pero sin limitación, anticuerpos que unen específicamente a uno o más receptores frizzled humanos que comprenden una, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis de las CDR de 18R5 y/o 18R8. En determinadas realizaciones, los polipéptidos 55 comprenden la CDR3 de cadena pesada de 18R8 y/o la CDR3 de cadena ligera de 18R5 o 18R8. En determinadas realizaciones, una o varias CDR de cadena pesada están contenidas dentro de la región variable de cadena pesada y/o una o varias CDR de cadena ligera están contenidas dentro de una región variable de cadena ligera.
- Por ejemplo, la divulgación proporciona un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a un 60 receptor frizzled humano, en el que el polipéptido comprende una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSHYTLS (SEQ ID NO: 1), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; (b) una CDR2 de cadena pesada VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; y/o (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende NFIKYVFAN (SEQ ID NO: 3), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende además una 65 región variable de cadena ligera que comprende: (a) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDKLGKKYAS (SEQ ID NO: 4) o SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7), o una variante de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7 que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; (b) una CDR2 de cadena ligera que comprende EKDNRPSG (SEQ ID NO: 5) o DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8), o una variante de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 8 que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; y/o (c) una CDR3 de cadena ligera que comprende SSFAGNSLE (SEQ ID NO: 6) o QSYANTSL (SEQ ID NO: 9) o una variante de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 9 que comprende 1, 2, 3 o 4

sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservativas.

- 5 Por tanto, la divulgación proporciona polipéptidos o anticuerpos que comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSHYTLS (SEQ ID NO: 1), una CDR2 de cadena pesada que comprende VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende NFIKYVFAN (SEQ ID NO: 3). En determinadas realizaciones, una o varias CDR de cadena ligera están contenidas dentro de una región variable de una cadena pesada de anticuerpo. En determinadas realizaciones, el polipéptido o anticuerpo que comprende la una o más CDR de cadena pesada une específicamente uno o más receptores frizzled humanos. En determinadas realizaciones, una 10 o varias CDR se han modificado con 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos. En determinadas realizaciones, cada una de las CDR de cadena pesada se ha modificado por un máximo de 1-2 sustituciones conservativas de aminoácidos.
- 15 La divulgación también proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un receptor frizzled humano, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSHYTLS (SEQ ID NO: 1), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; y (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende NFIKYVFAN (SEQ ID NO: 3), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 20 sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende además una región variable de cadena ligera que comprende: (a) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDKLGKKYAS (SEQ ID NO: 4) o SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7), o una variante de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7 que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; (b) una CDR2 de cadena ligera que comprende EKDNRPSG (SEQ ID NO: 5) o DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8) , o una variante de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 8 que comprende 1, 2, 3 o 4 25 sustituciones de aminoácidos; y (c) una CDR3 de cadena ligera que comprende SSFAGNSLE (SEQ ID NO: 6) o QSYANTSL (SEQ ID NO: 9) , o una variante de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 9 que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones alternativas, el anticuerpo, en lugar de eso, comprende además una región variable de cadena ligera que comprende: (a) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDKLGKKYAS (SEQ ID NO: 4) o SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7); (b) una CDR2 de cadena ligera que comprende 30 EKDNRPSG (SEQ ID NO: 5) o DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8); y (c) una CDR3 de cadena ligera que comprende SSFAGNSLE (SEQ ID NO: 6) o QSYANTSL (SEQ ID NO: 9). En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y/o FZD8 . En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a dos o más receptores frizzled humanos que incluyen FZD5 y FZD8. En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservativas.
- 35 La divulgación proporciona adicionalmente un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a un receptor frizzled humano, en el que el polipéptido comprende una región variable de cadena ligera que comprende: (a) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDKLGKKYAS (SEQ ID NO: 4) o SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7), o una variante de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7 que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de 40 aminoácidos; (b) una CDR2 de cadena ligera que comprende EKDNRPSG (SEQ ID NO: 5) o DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8), o una variante de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 8 que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; y/o (c) una CDR3 de cadena ligera que comprende SSFAGNSLE (SEQ ID NO: 6) o QSYANTSL (SEQ ID NO: 9) o una variante de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 9 que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservativas.
- 45 También se proporcionan polipéptidos o anticuerpos que comprenden (a) una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia SGD(K/N)(L/I)G(K/S)(K/F)Y(A/V)(S/H) (SEQ ID NO: 71) o la secuencia de la SEQ ID NO: 71 con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservativas de aminoácidos, (b) una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia (E/D)K(D/S)NRPSG (SEQ ID NO: 72) o la secuencia de la SEQ ID NO: 72 con hasta cuatro sustituciones conservativas de aminoácidos y/o (c) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia (S/Q)S(F/Y)A(G/N)(N/T)(sin aa/L)SL(E/sin aa) (indicando "sin aa/L" que es L o sin aminoácido e indicando "E/sin aa" que es E o sin aminoácido); SEQ ID NO: 73) o la secuencia de SEQ ID NO: 73 con hasta cuatro sustituciones conservativas de aminoácidos.
- 55 La divulgación también proporciona polipéptidos o anticuerpos que comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDKLGKKYAS (SEQ ID NO: 4) o SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7), una CDR2 de cadena ligera que comprende EKDNRPSG (SEQ ID NO: 5) o DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8), y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende SSFAGNSLE (SEQ ID NO: 6) o QSYANTSL (SEQ ID NO: 9). En determinadas realizaciones, el polipéptido o anticuerpo comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7), una CDR2 de cadena ligera que comprende DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QSYANTSL (SEQ ID NO: 9). En determinadas realizaciones alternativas, el polipéptido o anticuerpo comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDKLGKKYAS (SEQ ID NO: 4), una CDR2 de cadena ligera que comprende EKDNRPSG (SEQ ID NO: 5), y una CDR3 de cadena ligera que comprende SSFAGNSLE (SEQ ID NO: 6) . En determinadas realizaciones, una o varias CDR de cadena ligera están contenidas dentro de una 60 región variable de una cadena ligera de anticuerpo. En determinadas realizaciones, el polipéptido o anticuerpo se une específicamente a uno o más receptores frizzled humanos. En determinadas realizaciones, el polipéptido o 65

anticuerpo que comprende una o más CDR de cadena ligera une específicamente uno o más receptores frizzled humanos. En determinadas realizaciones, la una o varias CDR se han modificado con 1, 2, 3 o 4 modificaciones conservativas. En determinadas realizaciones, cada una de las CDR de cadena ligera se ha modificado por un máximo de 1-2 sustituciones conservativas de aminoácidos.

- 5 En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSHYTLS (SEQ ID NO: 1), una CDR2 de cadena de cadena pesada que comprende VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) y una CDR3 de cadena pesada que comprende NFIKYVFAN (SEQ ID NO: 3); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDKLGKKYAS (SEQ ID NO: 4) o SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7), una CDR2 de cadena ligera que comprende EKDNRPSG (SEQ ID NO: 5) o DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8) y una CDR3 de cadena ligera que comprende SSFAGNSLE (SEQ ID NO: 6) o QSYANTSL (SEQ ID NO: 9). En determinadas realizaciones el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSHYTLS (SEQ ID NO: 1), una CDR2 de cadena pesada que comprende VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), y una CDR3 de cadena pesada que comprende NFIKYVFAN (SEQ ID NO: 3) ; y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDKLGKKYAS (SEQ ID NO: 4) , una CDR2 de cadena ligera que comprende EKDNRPSG (SEQ ID NO: 5) y una CDR3 de cadena ligera que comprende SSFAGNSLE (SEQ ID NO: 6) . En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSHYTLS (SEQ ID NO: 1), una CDR2 de cadena pesada que comprende VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) y una CDR3 de cadena pesada que comprende NFIKYVFAN (SEQ ID NO: 3) y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7), una CDR2 de cadena ligera que comprende DKSNRPSG (SEQ IDNO: 8) y una CDR3 de cadena ligera que comprende QSYANTSL (SEQ ID NO: 9) . En determinadas realizaciones, una o varias CDR se han modificado con 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos. En determinadas realizaciones, cada una de una o varias CDR se han modificado por un máximo de 1-2 sustituciones conservativas de aminoácidos.
- 10 25 La divulgación proporciona adicionalmente polipéptidos que incluyen, pero sin limitación, anticuerpos que se unen específicamente a uno o más receptores frizzled humanos, que comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis de las CDR del anticuerpo 44R24 anti FZD (véase la Tabla 7 del ejemplo 18 más adelante) con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservativas de aminoácidos por CDR. Por tanto, la divulgación proporciona polipéptidos que incluyen, pero sin limitación, anticuerpos que se unen específicamente a uno o más receptores frizzled humanos que comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis de las CDR de 44R24. En determinadas 30 realizaciones, los polipéptidos comprenden la CDR3 de la cadena pesada de 44R24 y/o la CDR3 de la cadena ligera de 44R24. En determinadas realizaciones, una o varias CDR de cadena pesada están contenidas dentro de la región variable de cadena pesada y/o una o varias CDR de cadena ligera están contenidas dentro de la región variable de cadena ligera.
- 35 35 La divulgación también proporciona un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a FZD5 y/o FZD8 humano, en el que el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSSYYIT (SEQ ID NO: 77) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; una CDR2 de cadena pesada que comprende TISYSSSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 78) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos y una CDR3 de cadena pesada que comprende SIVFDY (SEQ ID NO: 79) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDALGNRYVY (SEQ ID NO: 80) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos, una CDR2 de cadena ligera que comprende SG (SEQ ID NO: 81) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y una CDR3 de cadena ligera que comprende GSWDTRPYPKY (SEQ ID NO: 82) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo (u otro polipéptido de unión a FZD) comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSSYYIT (SEQ ID NO: 77), una CDR2 de cadena pesada que comprende TISYSSSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 78) , y una CDR3 de cadena pesada que comprende SIVFDY (SEQ ID NO: 79) ; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDALGNRYVY (SEQ ID NO: 80), una CDR2 de cadena ligera que comprende SG (SEQ ID NO: 81) y una CDR3 de cadena ligera que comprende GSWDTRPYPKY (SEQ ID NO: 82). También se proporcionan polipéptidos que comprenden una de las cadenas ligeras o pesadas individuales descritas en el presente documento así como polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que comprenden tanto una cadena ligera como una cadena pesada.
- 40 45 50 55 60 65 También se proporcionan polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 14. En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %; al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 97 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 10, 12 o 14. Por tanto, en determinadas realizaciones, el polipéptido comprende: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10 y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12 o 14. En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende: (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; y/o (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 14. En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende: (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos

- de SEQ ID NO: 11; y/o (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15. En determinadas realizaciones, el polipéptido es un anticuerpo y/o el polipéptido se une específicamente a uno o más receptores frizzled humanos (por ejemplo, FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y/o FZD8). Por ejemplo, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un receptor frizzled humano que comprende: (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; y (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En determinadas realizaciones, el polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 10 es una región variable de cadena pesada. En determinadas realizaciones, el polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 12 o 14 es una región variable de cadena ligera. En determinadas realizaciones, el polipéptido que tiene un determinado porcentaje de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10, 12 o 14 difiere de la SEQ ID NO: 10, 12 o 14 solo por sustituciones conservativas de aminoácidos.
- En determinadas realizaciones, el polipéptido o anticuerpo comprende: (a) la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 12; (b) la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 14; (c) la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 13; o (d) la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 15.
- La divulgación proporciona adicionalmente un anticuerpo u otro polipéptido que se une específicamente a FZD5 y/o FZD8 y que comprende: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 97 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 85 y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 97 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 86. En determinadas realizaciones alternativas, el polipéptido o anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 85 y/o SEQ ID NO: 86.
- En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD comprende, consiste esencialmente, o consiste en un anticuerpo anti FZD seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos de IgG: 18R8, 18R5, 18R4605, 18R4805 y 44R24.
- En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD comprende las cadenas pesadas y las cadenas ligeras del anticuerpo de IgG2, 18R8 (con o sin la secuencia líder). En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD es el anticuerpo de IgG2, 18R8. El ADN que codifica las cadenas pesadas y las cadenas ligeras del anticuerpo de IgG2, 18R8, se depositó en la colección americana de cultivos tipo (*American Type Culture Collection (ATCC)*), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, Estados Unidos, según las condiciones del Tratado de Budapest el 29 de septiembre de 2008, y se le asignó el número de identificación de depósito en la ATCC, PTA-9540. En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD comprende las cadenas pesadas y las cadenas ligeras del anticuerpo de IgG2, 18R5 (con o sin la secuencia líder). En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD es el anticuerpo de IgG2, 18R5. El ADN que codifica las cadenas pesadas y las cadenas ligeras del anticuerpo de IgG2, 18R5, se depositó en la ATCC, según las condiciones del Tratado de Budapest el 29 de septiembre de 2008, y se le asignó el número de identificación de depósito en la ATCC, PTA-9541.
- En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD es un anticuerpo de IgG codificado por el plásmido depositado en la ATCC el 26 de agosto de 2009, y se le asignó el número de identificación de depósito PTA-10307, PTA-10309 o PTA-10311.
- En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD es un agente que compite por la unión específica a FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y/o FZD8, con un anticuerpo codificado por el plásmido que tiene el número de identificación de depósito en la ATCC, PTA-9540, PTA-9541, PTA-10307 o PTA-10309 (por ejemplo, en un ensayo de unión competitiva). En determinadas realizaciones alternativas, el agente de unión a FZD es un agente que compite por la unión específica a FZD5 y/o FZD8 con un anticuerpo codificado por el plásmido que tiene el número de identificación de depósito en la ATCC, PTA-10311.
- En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD tiene una semivida circulante en ratones, monos cinomolgos o seres humanos, de al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 1 semana o al menos aproximadamente 2 semanas.
- En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD es un anticuerpo de IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG2) que tiene una semivida circulante en ratones, monos cinomolgos o seres humanos de al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 1 semana o al menos aproximadamente 2 semanas. En la técnica se conocen métodos para aumentar la semivida de agentes tales como polipéptidos y anticuerpos. Por ejemplo, los métodos conocidos para aumentar la semivida circulante de anticuerpos de IgG incluyen la introducción de mutaciones en la región Fc lo que aumenta la unión dependiente de pH del anticuerpo con el receptor neonatal Fc (FcRn, por sus siglas *neonatal Fc receptor*) a un pH de 6,0 (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes de Estados Unidos Nº. 2005/0276799, 2007/0148164 y 2007/0122403). Los métodos conocidos para aumentar la semivida circulante de fragmentos de anticuerpo que carecen de la región Fc incluyen técnicas tales como PEGilación.
- Los anticuerpos policlonales se pueden preparar por cualquier método conocido. Los anticuerpos policlonales se

- 5 suscitan al inmunizar a un animal (por ejemplo un conejo, rata, ratón, burro, etc.), mediante inyecciones múltiples subcutáneas o intraperitoneales del antígeno en cuestión (un fragmento peptídico purificado, una proteína recombinante de longitud completa, una proteína de fusión, etc.), opcionalmente conjugado con hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas *keyhole limpet hemocyanin*), seroalbúmina, etc., diluido en solución salina estéril y combinado con un adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund, completo o incompleto) para formar una emulsión estable. Después, el anticuerpo policlonal se recupera de la sangre, ascitis y similar, de un animal inmunizado de esta manera. La sangre extraída se coagula y el suero se decanta, se aclara por centrifugación y se determina el título del anticuerpo. Los anticuerpos policlónicos se pueden purificar de suero o ascitis de acuerdo con métodos estándar conocidos en la técnica que incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, diálisis, etc.
- 10
- 15 Se pueden preparar anticuerpos monoclonales utilizando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495). Utilizando el método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal hospedador apropiado, se inmuniza como se describe anteriormente para suscitar la producción de anticuerpos por linfocitos 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 de células de mieloma adecuada utilizando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que después se pueden separar por selección de linfocitos no fusionados y células de mieloma. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno seleccionado, determinado por inmunoprecipitación, inmunotransferencia o por un ensayo de unión *in vitro* (por ejemplo radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, de inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) se pueden propagar después ya sea mediante cultivo *in vitro* utilizando métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986) o *in vivo*, como tumores ascíticos en un animal. Después, los anticuerpos monoclonales se pueden purificar del medio de cultivo o del líquido ascítico como se describe anteriormente para anticuerpos policlónicos.
- 20
- 25 De manera alternativa, también pueden crearse anticuerpos monoclonales utilizando métodos de ADN recombinante como se describe en la patente de Estados Unidos 4.816.567. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan de linfocitos B maduros o de células de hibridoma, tal como mediante RT-PCR utilizando cebadores oligonucleotídicos que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y su secuencia se determina utilizando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesada y ligera se cloran después en vectores de expresión adecuados, que cuando se transfecan en células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster Chino (CHO, por sus siglas *chinese hamster ovary*) o células de mieloma que, de otra manera, no producen la proteína inmunoglobulina, los anticuerpos monoclonales son generados por las células hospedadoras. Además, tal y como se ha descrito (McCafferty et al., 1990, *Nature*, 348:552-554; Clackson et al., 1991, *Nature*, 352:624-628; y Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597), también se pueden aislar anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de los mismos de la especie deseada, de bibliotecas de presentación en fago que expresan las CDR de la especie deseada.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- Para generar anticuerpos alternativos, uno o varios de los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se pueden modificar adicionalmente de numerosas maneras diferentes utilizando tecnología de ADN recombinante. En determinadas realizaciones, los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón, se pueden sustituir 1) por aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o 2) por un polipéptido que no sea inmunoglobulina, para generar un anticuerpo de fusión. En determinadas realizaciones, las regiones constantes se truncan o se separan para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. Para optimizar la especificidad, afinidad, etc., de un anticuerpo monoclonal, se puede utilizar mutagénesis dirigida o de alta densidad de la región variable.
- En determinadas realizaciones, el anticuerpo monoclonal contra uno o varios de los receptores frizzled humanos es un anticuerpo humanizado. En determinadas realizaciones, dichos anticuerpos se utilizan terapéuticamente para reducir la antigenicidad y las respuestas HAMA (anticuerpos humanos anti ratón, por las siglas *human anti-mouse antibody*) cuando se administra a un ser humano. Los anticuerpos humanizados se pueden producir utilizando diversas técnicas conocidas en la materia. En determinadas realizaciones alternativas, el anticuerpo contra uno o varios de los receptores frizzled humanos es un anticuerpo humano.
- Los anticuerpos humanos se pueden preparar directamente utilizando diversas técnicas conocidas en la materia. Pueden generarse 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 Cáncer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; y la patente de Estados Unidos 5.750.373). Además, el anticuerpo humano se puede seleccionar de una fagoteca que expresa anticuerpos humanos como se describe, por ejemplo, en 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, y en Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Las técnicas para la generación y uso de fagotecas de anticuerpo también se describen en las patentes de Estados Unidos Nº 5.969.108; 6.172.197; 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915; 6.593.081; 6.300.064; 6.653.068; 6.706.484 y 7.264.963; y en Rothe et al., 2007, *J. Mol. Bio.*, doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018. En la técnica se conocen estrategias de maduración por afinidad y de barajado de

cadena (Marks et al., 1992, Bio/Technology 10:779-783) y se pueden emplear para generar anticuerpos humanos de alta afinidad.

5 Los anticuerpos humanizados también se pueden crear en ratones transgénicos que contengan loci de inmunoglobulina humana que sean capaces, después de inmunización, de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Este enfoque se describe en las patentes de Estados Unidos 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016.

10 Esta divulgación también abarca anticuerpos biespecíficos que reconocen específicamente un receptor frizzled humano. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que son capaces de reconocer específicamente, y de unirse a, al menos dos epítopos diferentes. Los epítopos diferentes pueden estar dentro de la misma molécula (por ejemplo, el mismo receptor frizzled humano) o en moléculas diferentes, de tal manera que ambos anticuerpos, por ejemplo, pueden reconocer específicamente y unirse a un receptor frizzled humano así como, por ejemplo, a 1) una molécula efectora sobre un leucocito, tal como un receptor de linfocitos T (por ejemplo, CD3) o un receptor Fc (por ejemplo CD64, CD32 o CD16), o 2) un agente citotóxico, como se describe con detalle más adelante. En determinadas realizaciones, el anticuerpo biespecífico une específicamente a al menos un receptor frizzled humano, así como a cualquiera de VEGF, un ligando Notch, tal como un ligando similar a delta (por ejemplo, DLL4) o jagged, o al menos a un receptor Notch seleccionado del grupo que consiste en Notch 1, Notch 2, Notch 3 y Notch 4. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpo.

20 25 Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes, al menos uno de los cuales se origina en un polipéptido de la divulgación. De manera alternativa, un brazo anti antigénico de una molécula de inmunoglobulina se puede combinar con un brazo que se une a una molécula activadora sobre un leucocito, tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo CD2, CD3, CD2 8 o B7) o receptores Fc para IgG para centralizar los mecanismos de defensa celular a la célula que expresa el antígeno particular. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para dirigir agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o a un quelante radionúclido, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Las técnicas para preparar anticuerpos biespecíficos son comunes en la materia (Millstein et al., 1983, Nature 305:537-539; Brennan et al., 30 35 1985, Science 229:81; Suresh et al, 1986, Methods in Enzymol. 121:120; Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, J. Exp. Med. 175:217-225; Kolstelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, J. Immunol. 152:5368; y patente de Estados Unidos. 5.731.168). También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos (Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)). Por tanto, en determinadas realizaciones los anticuerpos contra uno o varios receptores frizzled humanos 35 son multiespecíficos.

De manera alternativa, en determinadas realizaciones alternativas, los agentes de unión a FZD de la invención son anticuerpos no biespecíficos.

40 45 En determinadas realizaciones, los anticuerpos (u otros polipéptidos) descritos en el presente documento pueden ser monoespecíficos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, cada uno del uno o más sitios de unión a antígeno que contiene un anticuerpo es capaz de unirse (o se une) al mismo uno o más receptores FZD humanos (por ejemplo FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 o FZD8, o un epítopo homólogo sobre alguna combinación de los FZD). En determinadas realizaciones, un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo monoespecífico descrito en el presente documento es capaz de unirse (o se une) a uno, dos, tres, cuatro o cinco (o más) receptores frizzled humanos.

50 55 En determinadas realizaciones se proporciona un fragmento de anticuerpo para, por ejemplo, aumentar la penetración tumoral. Se conocen diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtienen 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 determinadas realizaciones, los fragmentos de anticuerpo se producen de manera recombinante. Todos los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv se pueden expresar y pueden ser secretados por *E. coli* u otras células hospedadoras y de esta manera permitir la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo también se pueden aislar de las fagotecas de anticuerpo descritas anteriormente. Los fragmentos de anticuerpo también pueden ser anticuerpos lineales, como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5.641.870 y pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán obvias para el experto en la materia.

60 65 De acuerdo con la presente divulgación, se pueden adaptar técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla específicos para uno o más receptores frizzled humanos (véase la patente de Estados Unidos No. 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 una identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para un receptor FZD, o derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos. Se pueden producir fragmentos de anticuerpo por técnicas conocidas en la materia que incluyen, pero sin limitación: (a) un fragmento F(ab')2 producido por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (b) un fragmento Fab generado al reducir los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')2, (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 con el fin de aumentar su semivida en suero. Esto se puede realizar, por ejemplo, incorporando un epítopo de unión de receptor de rescate en el fragmento de anticuerpo por mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o incorporando el epítopo en una etiqueta peptídica que después se fusiona con el fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en el centro (por ejemplo, mediante síntesis de ADN o peptídica).

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente divulgación. Los anticuerpos heteroconjugados están constituidos por dos anticuerpos unidos por enlace covalente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células inmunitarias a células no deseadas (patente de Estados Unidos nº. 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos se puedan preparar *in vitro* utilizando métodos conocidos en química de síntesis de proteínas, incluyendo los implican agentes reticulantes. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o por formación de un enlace tioéter. Como ejemplos de reactivos adecuados para este propósito se incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptop-butirimidato.

Para los propósitos de la presente divulgación, deberá 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 proceder de cualquier tipo de mamífero que pueda inducirse para general 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 origen humano, murino, primate no humano (por ejemplo, mono cinomolgo, etc.) o lupino. En algunas realizaciones, las regiones tanto variable como constante de las inmunoglobulinas modificadas son humanas. En otras realizaciones las regiones variables de anticuerpos compatibles (habitualmente derivados de una fuente no humana) pueden modificarse por ingeniería genética o pueden adecuarse 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 humanizarse o alterarse de alguna otra manera mediante la inclusión de secuencias de aminoácidos importadas.

En determinadas realizaciones, los dominios variables de las cadenas tanto pesada como ligera se alteran por reemplazo al menos parcial de una o más CDR y, si fuera necesario, por reemplazo parcial de la región estructural y cambio de secuencia. Aunque las CDR pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo del cual derivan las regiones estructurales, se considera que las CDR derivarán de un anticuerpo de clase diferente y preferentemente de un anticuerpo de una especie diferente. Puede que no sea necesario reemplazar la totalidad de las CDR por las CDR completas de la región variable donadora para transferir la capacidad de unión a antígeno de un dominio variable a otro. En vez de esto, puede que solo sea necesario transferir aquellos restos que sean necesarios para mantener la actividad del sitio de unión a antígeno. Dadas las explicaciones expuestas en las patentes de Estados Unidos nº. 5.585.089; 5.693.761 y 5.693.762, estará dentro de la competencia de los expertos en la técnica, ya sea llevando a cabo una experimentación sistemática o por ensayo de prueba y error, obtener un anticuerpo funcional con inmunogenicidad reducida.

A pesar de las alteraciones en la región variable, los expertos en la técnica apreciarán que los anticuerpos modificados de esta divulgación comprenderán anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa o fragmentos inmunorreactivos de los mismos) en los que al menos una fracción de uno o más dominios de región constante han sido suprimidos o alterados de alguna otra manera para proporcionar las características bioquímicas deseadas, tales como aumento de la localización del tumor o reducción de la semivida en suero 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 en la región constante compatibles con esta divulgación comprenden adiciones, supresiones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Es decir, los anticuerpos modificados desvelados en el presente documento pueden comprender alteraciones o modificaciones en uno o más de los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o en el dominio constante de la cadena ligera (CL). En algunas realizaciones se contemplan regiones constantes modificadas en las que uno o más dominios se han suprimido parcial o completamente. En algunas realizaciones, los anticuerpos modificados comprenderán construcciones o variantes con dominio suprimido, en el que se ha eliminado todo el dominio CH2 (construcciones  $\Delta$ CH2). En algunas realizaciones, el dominio omitido de la región constante se reemplazará por un espaciador aminoacídico corto (por ejemplo, de 10 restos) que proporcione parte de la flexibilidad molecular impartida por lo general por la región constante ausente.

Además de su configuración, es sabido en la técnica que la región constante actúa como mediadora en varias funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento con anticuerpos activa el sistema del complemento. La activación de 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 hipersensibilidad autoinmunitaria. Además, los anticuerpos se unen a células mediante la región Fc con un sitio receptor Fc en la región Fc del anticuerpo que se une a un receptor Fc (FcR) en una célula. Existen numerosos receptores Fc que son específicos para clases diferentes de anticuerpo, que incluyen IgG (receptores gamma), IgE (receptores eta), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión de los anticuerpos con los receptores Fc en

las superficies celulares desencadena varias respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen la reabsorción y la destrucción de partículas recubiertas con anticuerpo, la depuración de complejos inmunitarios, la lisis de células diana recubiertas con anticuerpo por células citolíticas (denominada citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo o CCDA), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de producción de inmunoglobulina.

5 En determinadas realizaciones, los anticuerpos de unión a FZD proporcionan funciones efectoras alteradas que, a su vez, alteran el perfil biológico del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la supresión o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otro medio) de un dominio de región constante, puede reducir la unión del receptor Fc del anticuerpo modificado circulante con lo que aumenta la localización del tumor. En otros casos puede ser que las modificaciones de la región constante, que concuerden con esta divulgación, moderen la unión del complemento y por lo tanto reduzcan la semivida en suero y la asociación inespecífica de una citotoxina conjugada. Otras modificaciones adicionales de la región constante se pueden utilizar para eliminar enlaces disulfuro o residuos oligosacáridicos que permiten una localización aumentada debido a una especificidad de antígeno o flexibilidad de anticuerpo aumentadas. De manera similar, pueden realizarse con facilidad modificaciones en la región constante de acuerdo con esta divulgación utilizando técnicas de diseño a nivel bioquímico o molecular bien conocidas dentro del alcance del experto en la técnica.

10 En determinadas realizaciones, un agente de unión a FZD, que es un anticuerpo, no tiene una o más funciones efectoras. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el anticuerpo no tiene actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) y/o actividad de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). En determinadas realizaciones, el anticuerpo no se une a un receptor Fc y/o a factores de complemento. En determinadas realizaciones, el anticuerpo no tiene función efectora.

15 20 En determinadas realizaciones, un agente de unión a FZD, que es un anticuerpo, no tiene una o más funciones efectoras. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el anticuerpo no tiene actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) y/o actividad de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). En determinadas realizaciones, el anticuerpo no se une a un receptor Fc y/o a factores de complemento. En determinadas realizaciones, el anticuerpo no tiene función efectora.

25 30 35 Se observará que en determinadas realizaciones, los anticuerpos modificados se pueden diseñar para fusionar el dominio CH3 directamente con la región bisagra de los anticuerpos modificados respectivos. En otras construcciones puede ser deseable proporcionar un espaciador peptídico entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, podrían expresarse construcciones compatibles en las que se ha suprimido el dominio CH2 y el dominio CH3 restante (modificado o no modificado) se une a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Dicho espaciador se puede añadir, por ejemplo, para garantizar que los elementos reguladores del dominio constante permanecen libres y accesibles o que la región bisagra permanece flexible. No obstante, debe observarse que los espaciadores de aminoácidos, en algunos casos, pueden demostrar ser inmunogénicos y suscitar una respuesta inmunitaria no deseada contra la construcción. En consecuencia, en determinadas realizaciones, cualquier espaciador añadido a la construcción será relativamente no inmunogénico o incluso se omitirá por completo de manera que se mantengan las cualidades bioquímicas deseadas de los anticuerpos modificados.

40 45 50 Además de la supresión de todos los dominios de la región constante, se apreciará que los anticuerpos de la presente divulgación se pueden proporcionar por la supresión o sustitución parcial de algunos o incluso de un solo aminoácido. Por ejemplo, la mutación de un solo aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión de Fc y de esta manera aumentar la localización del tumor. De manera similar, puede ser deseable simplemente suprimir la parte de uno o más dominios de la región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, la unión de Clq al complemento) que se va a modular. Dichas supresiones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (semivida en suero) mientras deja intactas otras funciones deseables asociadas al dominio de la región constante en cuestión. Además, como indica anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos desvelados pueden estar modificadas por mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que incrementan el perfil de la construcción resultante. A este respecto, puede ser posible que se altere la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión de Fc) mientras que mantiene sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Determinadas realizaciones pueden comprender la adición de uno o más aminoácidos en la región constante para aumentar las características deseables tales como disminución o aumento de la función efectora o para proporcionar más citotoxinas o unión de hidratos de carbono. En dichas realizaciones puede ser deseable insertar o copiar secuencias específicas derivadas de dominios de región constante seleccionados.

55 60 La presente divulgación abarca adicionalmente variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos químéricos, humanizados y humanos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, que se exponen en el presente documento. Estos pueden contener, por ejemplo mutaciones de sustitución conservadora, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, 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 por otro aminoácido ácido, un aminoácido básico por otro aminoácido básico o un aminoácido neutro por otro aminoácido neutro. Lo que se entiende por una sustitución conservadora de aminoácidos es bien conocido en la técnica.

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

- (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), isótopos radioactivos (es decir, un radioconjunto), etc. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjungados incluyen, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, doxorrubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes. Las toxinas enzimáticamente activas y
- 5 fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Están disponibles diversos radionúclidos para la producción
- 10 de anticuerpos radioconjungados que incluyen 212Bi, 131I, 131In, 90Y y 186Re. Los conjungados del anticuerpo y el agente citotóxico se fabrican utilizando diversos agentes acopladores de proteína bifuncionales tales como N-succinimidil 3-(2-piridiliditio)-propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como clorhidrato de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehidos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de
- 15 bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor-bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4 -dinitrobenceno). También pueden utilizarse conjungados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteno y CC1065 y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.
- 20 Los anticuerpos de conjungados están constituidos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Se han propuesto a los anticuerpos de tener, por ejemplo, como objetivo células inmunitarias a células no deseadas (patente de Estados Unidos número 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos se puedan preparar *in vitro* utilizando métodos conocidos en química de proteína sintética, que incluyen aquellos que implican agentes reticulantes. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio disulfuro o por formación de un enlace tioéter. Como ejemplos de reactivos adecuados para este propósito se incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptopbutirimidato.

Sin importar de qué manera se obtienen cantidades útiles, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden utilizar en cualquiera de numerosas formas conjungadas (es decir, un inmunoconjunto) o no conjungadas. De manera alternativa, los anticuerpos de esta divulgación se pueden utilizar en una forma no conjungada o "no marcada". En determinadas realizaciones, los anticuerpos utilizan en forma no conjungada para aprovechar los mecanismos de defensa naturales del individuo que incluyen citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) para eliminar las células neoplásicas. En algunas realizaciones, los anticuerpos se pueden conjugar con radioisótopos tales como <sup>90</sup>Y, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>111</sup>In, <sup>105</sup>Rh, <sup>153</sup>Sm, <sup>67</sup>Cu, <sup>67</sup>Ga, <sup>166</sup>Ho, <sup>177</sup>Lu, <sup>186</sup>Re y <sup>188</sup>Re utilizando cualquiera de numerosos quelantes bien conocidos o marcaje directo. En otras realizaciones, las composiciones desveladas pueden comprender anticuerpos acoplados a fármacos, profármacos o modificadores de respuesta biológica, tales como metotrexato, adriamicina y linfocinas tales como interferón. Otras realizaciones adicionales de la presente divulgación comprenden el uso de anticuerpos conjungados con biotoxinas específicas tales como toxina de ricina o de difteria. En otras realizaciones adicionales los anticuerpos modificados pueden formar complejos con otros ligandos inmunológicamente activos (por ejemplo anticuerpos o fragmentos de los mismos) en el que la molécula resultante se une tanto a células neoplásicas como a células efectoras tales como linfocitos T. La selección de cual anticuerpo modificado conjungado o no conjungado utilizar dependerá del tipo y estadio del cáncer, del uso de tratamiento auxiliar (por ejemplo, quimioterapia o radiación externa) y de la afección del paciente. Se apreciará que un experto en la técnica puede realizar fácilmente esta selección a la vista de las enseñanzas de la presente memoria.

Los polipéptidos de la presente divulgación pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales o polipéptidos sintéticos, que comprenden un anticuerpo, o un fragmento del mismo, contra un receptor FZD humano. Se reconocerá en la técnica que algunas secuencias de aminoácidos de la divulgación pueden variar sin causar ningún efecto significativo en la estructura o función de la proteína. Por tanto, la invención incluye adicionalmente variaciones de los polipéptidos que muestran actividad sustancial o que incluyen regiones de un anticuerpo, o fragmentos de las mismas, contra una proteína receptora FZD humana. Dichos mutantes incluyen supresiones, inserciones, inversiones, secuencias repetidas y sustituciones de tipo.

55 Los polipéptidos y análogos se pueden modificar adicionalmente para que contengan partes químicas adicionales que normalmente no forman parte de la proteína. Estas partes derivatizadas pueden mejorar la solubilidad, la semivida biológica o la absorción de la proteína. Las partes también pueden reducir o eliminar cualquier efecto secundario deseable de las proteínas y similares. Una revisión de estas partes se puede encontrar en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

60 Los polipéptidos aislados descritos en el presente documento se pueden producir por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Dichos métodos varían desde métodos de síntesis directa de proteínas hasta la construcción de una secuencia de ADN que codifica secuencias polipeptídicas aisladas y que expresan estas secuencias en un hospedador transformado adecuado. En algunas realizaciones, se construye una secuencia de ADN utilizando tecnología recombinante al aislar o sintetizar una secuencia de ADN que codifica una proteína natural de interés. Opcionalmente, la secuencia puede mutagenizarse por mutagénesis específica de sitio para proporcionar análogos

funcionales de la misma. Véase, por ejemplo, Zoeller et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5662-5066 (1984) y la patente de Estados Unidos nº. 4.588.585.

- 5 En algunas realizaciones una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés se puede construir por síntesis química utilizando un sintetizador oligonucleotídico. Dichos oligonucleótidos se pueden diseñar basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionando aquellos codones que están favorecidos en la célula hospedadora en la que se producirá el polipéptido recombinante de interés. Se pueden aplicar métodos estándar para sintetizar una secuencia de polinucleótidos aislada que codifica un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, para construir un gen retrotraducido se puede utilizar una secuencia completa de aminoácidos. Además, se 10 puede sintetizar un ADN oligomérico que contenga una secuencia de nucleótidos que codifique el polipéptido aislado particular. Por ejemplo, se pueden sintetizar varios oligonucleótidos pequeños que codifican partes del polipéptido deseado y después se pueden unir. Los oligonucleótidos individuales por lo general contienen partes salientes en 5' o 3' para el ensamblado complementario.
- 15 Una vez ensambladas (por síntesis, mutagénesis dirigida a 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 ensamblado adecuado se puede confirmar por secuenciación de nucleótidos, mapeo de restricción y expresión de un polipéptido biológicamente activo en un hospedador adecuado. Como es bien conocido 20 en la técnica, con el fin de obtener niveles de expresión elevados de un gen transfectado en un hospedador, el gen debe estar unido operativamente a secuencias de control de expresión transcripcionales y traduccionales que son funcionales en el hospedador de expresión seleccionado.
- 25 En determinadas realizaciones, los vectores de expresión recombinantes se utilizan para amplificar y expresar ADN que codifica anticuerpos, o fragmentos de los mismos, contra receptores frizzled humanos. Los vectores de expresión recombinantes son construcciones de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc, que codifican una cadena polipeptídica de un anticuerpo anti FZD, o un fragmento del mismo, unida operativamente a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales adecuados derivados de genes de mamífero, microbianos, víricos o de insecto. Una unidad transcripcional en general comprende un conjunto de (1) un 30 elemento genético o elementos que tienen un papel regulador en la expresión de genes, por ejemplo, promotores transcripcionales o mejoradores, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce en una proteína, y (3) secuencias de inicio y de terminación de la transcripción y traducción apropiadas, como se describe con detalle más adelante. Dichos elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. Adicionalmente 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 se relacionan funcionalmente entre sí. 35 Por ejemplo, un ADN para un péptido señal (líder secretor) está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión de ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está colocado de manera que permite la traducción. Los elementos estructurales destinados para su uso en sistemas de expresión de levadura incluyen una secuencia líder que facilita la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula hospedadora. De manera alternativa, cuando la proteína recombinante se expresa sin una secuencia líder o transportadora, puede incluir un resto de metionina en el extremo N terminal. Opcionalmente, este resto puede escindirse posteriormente de la proteína recombinante 40 expresada para proporcionar un producto final.
- 45 La elección de la secuencia de control de expresión y del vector de expresión dependerá de la elección del hospedador. Se puede utilizar una amplia variedad de combinaciones de hospedador/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para hospedadores eucariotas incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión de SV40, del virus del papiloma bovino, de adenovirus y de citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para hospedadores bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *Escherichia coli*, que incluyen pCR 1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos con alcance de hospedador más amplio, tales como M13 y fagos filamentosos de ADN de cadena sencilla.
- 55 Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de un polipéptido o anticuerpo que se une a FZD (o una proteína FZD para su uso como un antígeno), incluyen células procariotas, de levadura, de insecto o eucariotas superiores, bajo el control de promotores apropiados. Las células procariotas incluyen organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero como se describe más adelante. También se pueden utilizar sistemas de traducción 60 sin células. Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985), describen vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamífero.
- 65 Puede encontrarse información adicional respecto a métodos de producción de proteínas, que incluyen la producción de anticuerpos, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos nº. 2008/0187954, en las patentes de Estados Unidos nº. 6.413.746 y 6.660.501 y en la publicación de patente internacional número WO 04009823.

Ventajosamente, para expresar proteínas recombinantes pueden utilizarse diversos sistemas de cultivo de células de mamífero o de insecto. La expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero se puede llevar a cabo porque dichas proteínas están, en general, correctamente plegadas, apropiadamente modificadas y son completamente funcionales. Como ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero adecuadas se incluyen

- 5 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 incluyen, por ejemplo, células L, C127, 3T3, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa y líneas celulares BHK. Los vectores de expresión de mamífero pueden 10 comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor adecuado y un mejorador unido al gen que se va a expresar y otras secuencias no transcritas flanqueantes 5' o 3' y secuencias no traducidas 15 5' o 3', tales como sitios de unión a ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donadores y aceptores de empalme y secuencias de terminación transcripcional. Luckow y Summers, Bio/Technology 6:47 (1988), revisan los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto.

Las proteínas producidas por un hospedador transformado se pueden purificar de acuerdo con cualquier método adecuado. Dichos métodos estándar incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de 15 afinidad y de columna de determinación de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Para facilitar la purificación por pasos sobre una columna de afinidad apropiada, se pueden unir a la proteína etiquetas de afinidad, tales como una etiqueta de hexahistidina, un dominio de unión a maltosa, una secuencia de la cubierta del virus de la gripe y una glutatión-S-transferasa. Las 20 proteínas aisladas también se pueden caracterizar físicamente utilizando técnicas tales como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X.

Por ejemplo, sobrenadantes de sistemas que secretan proteína recombinante en medios de cultivo se pueden 25 concentrar primero utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. De manera alternativa, se puede utilizar una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o un sustrato que tenga grupos colgantes de dietilaminoetilo (DEAE). Las matrices 30 pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos utilizados comúnmente en la purificación de proteínas. De manera alternativa, se puede utilizar una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo y carboximetilo. Finalmente, para purificar adicionalmente un agente de unión a FZD, se pueden utilizar una o más etapas de 35 cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés *reversed-phase high performance liquid chromatography*) que utilizan medios RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos colgantes de metilo u otros grupos alifáticos. Algunas, o todas, las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, también se pueden utilizar para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano se puede aislar, por ejemplo, por extracción inicial de 40 sedimentos celulares, seguido de una o más etapas de concentración, desalinización, cromatografía de intercambio iónico acuoso o de exclusión por tamaño. Se puede utilizar la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para etapas de purificación final. Las células microbianas utilizadas en la expresión de una proteína recombinante se pueden romper por cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación y descongelación, ultrasonido, rotura mecánica o el uso de agentes que causan la lisis celular.

45 Los métodos conocidos en la técnica para purificar anticuerpos y otras proteínas también incluyen, por ejemplo, los descritos en las publicaciones de patente de Estados Unidos nº. 2008/0312425, 2008/0177048 y 2009/0187005.

En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD es un polipéptido que no es un anticuerpo. Se conocen en 50 la técnica diversos métodos para identificar y producir polipéptidos que no son anticuerpos que se unen con alta afinidad a una proteína diana. Véase, por ejemplo, Skerra, Curr. Opin. Biotechnol., 18:295-304 (2007), Hosse et al., Protein Science, 15:14-27 (2006), Gilí et al., Curr. Opin. Biotechnol., 17:653-658 (2996), Nygren, FEBS J., 275:2668-76 (2008) y Skerra, FEBS J., 275:2677-83 (2008). En determinadas realizaciones se ha utilizado la tecnología de presentación en fago para identificar/producir el polipéptido de unión a FZD. En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende un armazón de proteína de un tipo seleccionado del grupo que consiste en proteína A, una lipocalina, un dominio de fibronectina, un dominio repetido de consenso de anquirina y tiorredoxina.

55 En algunas realizaciones el agente es una molécula que no es una proteína. En determinadas realizaciones el agente es una molécula pequeña. Los expertos en la técnica conocen bibliotecas de química combinatorias y técnicas útiles en la identificación de agentes de unión a FZD que no son proteínas. Véase, por ejemplo, Kennedy et al., J. Comb. Chem., 10:345-354 (2008), Dolle et al., J. Comb. Chem., 9:855-902 (2007) y Bhattacharyya, Curr. Med. Chem., 8:1383-404 (2001). En determinadas realizaciones adicionales, el agente es un hidrato de carbono, un glucosaminoglucano, una glucoproteína o un proteoglucano.

60 En determinadas realizaciones el agente es un aptámero de ácido nucleico. Los aptámeros son moléculas polinucleotídicas que se han seleccionado (por ejemplo, de acumulados aleatorios o mutagenizados) en función de su capacidad para unirse a otra molécula. En algunas realizaciones, el aptámero comprende un polinucleótido de ADN. En determinadas realizaciones alternativas, el aptámero comprende un polinucleótido de ARN. En determinadas

realizaciones, al aptámero comprende uno o más restos de ácido nucleico modificados. En la técnica se conocen bien métodos de generación y exploración de aptámeros de ácido nucleico para determinar la unión con proteínas. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos nº. 5.270.163; 5.683.867, 5.763.595, 6,344,321, 7,368,263, 5,582,981, 5,756,291, 5,840,867, 7.312,325 y 7,329,742; las publicaciones de patente internacional nº. WO 5 02/077262 y WO 03/070984, las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos nº. 2005/0239134, 2005/0124565 y 2008/0227735.

La presente divulgación proporciona adicionalmente métodos de exploración de agentes para determinar la eficacia en la inhibición de la señalización Wnt, la eficacia antitumoral y/o la eficacia contra células madre cancerosas. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, métodos que comprenden comparar los niveles de uno o más marcadores de diferenciación en un primer tumor sólido que se ha expuesto al agente, en relación con los niveles de uno o más marcadores de diferenciación en un segundo tumor sólido que no se ha expuesto al agente. En determinadas realizaciones, estos métodos incluyen: (a) exponer al agente un primer tumor sólido, pero no un segundo tumor sólido; (b) evaluar los niveles de uno o más marcadores de diferenciación en el primer y segundo tumor sólido; y (c) 10 comparar los niveles de uno o más marcadores de diferenciación en el primer y segundo tumor sólido. En determinadas realizaciones, el agente es un inhibidor de la vía de señalización Wnt canónica, y/o inhibe la unión de una o más proteínas Wnt humanas con uno o más receptores frizzled humanos. En determinadas realizaciones, el agente es un anticuerpo que se une específicamente a uno o más receptores frizzled humanos. En determinadas realizaciones, los niveles aumentados de uno o más marcadores de diferenciación en el primer tumor sólido en 15 relación al segundo tumor sólido, indican eficacia contra células madre de tumor sólido. En determinadas realizaciones alternativas, los niveles disminuidos de uno o más marcadores de diferenciación (es decir, marcadores negativos para la diferenciación) en el primer tumor sólido en relación al segundo tumor sólido, indica eficacia contra las células madre del tumor sólido. En determinadas realizaciones, el tumor sólido, es un tumor pancreático. En 20 determinadas realizaciones, el tumor sólido es un tumor pancreático y el uno o más marcadores de diferenciación pueden comprender una o más mucinas (por ejemplo, Muc16) y/o cromogramanina A (CHGA, por sus siglas en inglés). En determinadas realizaciones alternativas, el tumor sólido es tumor de colon. En algunas realizaciones, el tumor sólido es un tumor de colon y el uno o más marcadores de diferenciación comprenden citoqueratina 7. Los expertos 25 en la técnica conocen otros posibles marcadores de diferenciación para tumores de páncreas y colon, así como para otros tipos de tumores. La utilidad de los posibles marcadores de diferenciación en un método de exploración puede 30 evaluarla fácilmente un experto en la técnica tratando el tipo de tumor deseado con uno o más de los anticuerpos anti FZD desvelados en el presente documento, tales como 18R5 y/o 44R24, y después evaluando los cambios en la expresión del marcador por el tumor tratado en relación al control. Ejemplos no limitantes de dichos métodos se pueden encontrar, por ejemplo, en los ejemplos específicos que se proporcionan más adelante.

### 35 III. Polinucleótidos

En determinadas realizaciones, la divulgación abarca polinucleótidos que comprenden polinucleótidos que codifican un polipéptido que se une específicamente al receptor FZD humano, o un fragmento de dicho polipéptido. Por ejemplo, la divulgación proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica 40 un anticuerpo contra un receptor frizzled humano o que codifica un fragmento de dicho anticuerpo. 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 puede ser de cadena doble o de cadena sencilla y, si es de cadena sencilla, puede ser la cadena codificante o la no codificante (antisentido).

45 En determinadas realizaciones, los polinucleótidos están aislados. En determinadas realizaciones, los polinucleótidos son sustancialmente puros.

La divulgación proporciona un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 12 y 14. La divulgación 50 proporciona adicionalmente un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 85-86. También se proporciona un polinucleótido que comprende polinucleótidos que codifican para un polipéptido que comprende las SEQ ID NO: 11, 13 o 15.

55 La divulgación proporciona adicionalmente un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 17, 19 y 21. De manera alternativa, en determinadas realizaciones, el polinucleótido puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 87-90, 92 y 94-95. También se proporcionan secuencias polinucleotídicas que comprenden la SEQ ID NO: 18, 20 o 22,

60 También se proporciona un polinucleótido que comprende un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido que tiene la secuencia de las SEQ ID NO: 17, 19 o 21 y/o con un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de las SEQ ID NO: 10, 12 o 14. También se proporciona un polinucleótido que comprende un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 87-90, 92 y 94-95 y/o con un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de las SEQ ID NO: 85 u 86. En determinadas realizaciones, la hibridación se realiza en condiciones de alta rigurosidad.

En determinadas realizaciones los polinucleótidos comprenden la secuencia codificante para el polipéptido maduro fusionado en el mismo marco de lectura con un polinucleótido que ayuda, por ejemplo, en la expresión y secreción de un polipéptido de una célula hospedadora (por ejemplo, una secuencia líder que funciona como una secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido desde la célula). El polipéptido que tiene una secuencia líder

5 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 adicionales en la parte 5'. Una proteína madura que tiene una prosecuencia es una proproteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que la prosecuencia se escinde, lo que queda es una proteína madura activa.

10 En determinadas realizaciones los polinucleótidos comprenden la secuencia codificante para el polipéptido maduro fusionado en el mismo marco de lectura con una secuencia marcadora que permite, por ejemplo, la purificación del polipéptido codificado. Por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hexahistidina suministrada por un vector pQE-9 para proporcionar la purificación del polipéptido maduro fusionado con el marcador en el caso

15 de un hospedador bacteriano, o la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) derivada de la proteína de hemaglutinina de la gripe cuando se utiliza hospedador de mamífero (por ejemplo, células COS-7).

La presente divulgación se relaciona adicionalmente con variantes de los polinucleótidos descritos anteriormente que codifican, por ejemplo, fragmentos, análogos y derivados.

20 En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona polinucleótidos aislados que comprenden polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos al menos 80 % idéntica, al menos 85 % idéntica, al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica y en algunas realizaciones al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra a un receptor FZD humano descrito en el presente documento.

25 Por un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que es al menos, por ejemplo, 95 % "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia, se quiere indicar que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de polinucleótidos 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 tenga una secuencia de nucleótidos que sea al menos 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta el 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia se puede suprimir o sustituir por otro nucleótido, o diversos nucleótidos hasta el 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia, se pueden insertar en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia

30 pueden producirse en las posiciones amino o carboxilo terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre estas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

35 Las variantes polinucleotídicas pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes o en ambas. En algunas realizaciones, las variantes polinucleotídicas contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o supresiones silenciosas pero que no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunas realizaciones, las variantes nucleotídicas se producen por sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. Las variantes polinucleotídicas se pueden producir por diversas razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones por un hospedador particular (cambio de codones en el ARNm humano por aquellos preferidos por un hospedador bacteriano tal como *E. coli*). También se proporcionan vectores y células que comprenden los polinucleótidos descritos en el presente documento.

#### IV. Métodos de uso y composiciones farmacéuticas

40 Los agentes de unión a FZD (que incluyen polipéptidos y anticuerpos) de la divulgación, son útiles en diversas aplicaciones, incluyendo, pero sin limitación, métodos de tratamiento terapéutico, tal como el tratamiento del cáncer. En determinadas realizaciones, los agentes son útiles para inhibir la señalización Wnt (por ejemplo, señalización Wnt canónica), inhibir el crecimiento tumoral, inducir diferenciación, reducir el volumen tumoral y/o reducir la tumorigenidad de un tumor. Los métodos de uso pueden ser métodos realizados *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En

45 determinadas realizaciones, el agente, polipéptido o anticuerpo de unión a FZD es un antagonista de uno o más receptores frizzled humanos con los que se une. En determinadas realizaciones, los agentes o antagonistas de unión a FZD se utilizan en el tratamiento de una enfermedad asociada a la activación de la señalización Wnt. En realizaciones particulares, la enfermedad es una enfermedad que depende de la señalización Wnt. En realizaciones particulares, la señalización Wnt es señalización Wnt canónica. En determinadas realizaciones, los agentes o antagonistas de unión a FZD se utilizan en el tratamiento de trastornos caracterizados por niveles aumentados de células madre y/o células progenitoras.

50 En determinadas realizaciones, la enfermedad tratada con el agente o antagonista de unión a FZD (por ejemplo, un anticuerpo anti FZD) es un cáncer. En determinadas realizaciones, el cáncer se caracteriza por tumores dependientes de Wnt. En determinadas realizaciones, el cáncer se caracteriza por tumores que expresan uno de los receptores frizzled con los que se une el agente de unión a FZD (por ejemplo, un anticuerpo). En determinadas

realizaciones, el cáncer se caracteriza por tumores que expresan uno o más genes en una firma de gen Wnt.

En determinadas realizaciones, la enfermedad tratada con el agente o antagonista de unión a FZD no es un cáncer. Por ejemplo, la enfermedad puede ser un trastorno metabólico tal como obesidad o diabetes (por ejemplo, diabetes de tipo II) (Jin T., Diabetologia, oct 2008; 51(10):1771-80).

5 De manera alternativa, la enfermedad puede ser un trastorno óseo tal como osteoporosis, artrosis o artritis reumatoide (Corr M., Nat Clin Pract Rheumatol, oct 2008; 4 (10): 550-6; Day et al., Bone Joint Surg Am, feb, 2008; 90 Suppl 1:19-24). La enfermedad también puede ser un trastorno renal, tal como renopatía poliquística (Harris et al., Annu Rev Med, oct. 2008 23; Schmidt-Ott et al., Kidney Int, 2008 Oct; 74 (8): 10 04-8; Benzing et al., J Am Soc Nephrol, mayo 2007; 18(5):1389-98). De manera alternativa, 10 pueden tratarse trastornos oculares incluyendo, pero sin limitación, degeneración macular y vitreoretinopatía exudativa familiar (Lad et al., Stem Cells Dev, 8 de agosto de 2008). También se pueden tratar trastornos cardiovasculares que incluyen infarto de miocardio, aterosclerosis y valvulopatías (Al-Aly Z., Transl Res, 2008 May;151(5) :233 - 9 ; Kobayashi et al., Nat Cell Biol, 2009 Jan;11(1):46-55; van Gijn et al., Cardiovasc Res, jul. 2002; 55 (1) : 16-24; Christman et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol, jun. 2008;294(6):H2864-70). En algunas 15 realizaciones, la enfermedad es un trastorno pulmonar tal como hipertensión arterial pulmonar idiopática o fibrosis pulmonar (Laumanns et al., Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, Nov 21; Königshoff et al., PLoS ONE, 14 de mayo de 2008; 3 (5):e2142). En algunas realizaciones, la enfermedad tratada con el agente de unión a FZD es una 20 hepatopatía, tal como cirrosis o fibrosis hepática (Cheng et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, enero 2008; 294(I):G39-49). La presente divulgación proporciona métodos para tratar cáncer que comprenden administrar a un individuo (por ejemplo, a un individuo que necesite tratamiento) una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a FZD. En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en 25 cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, melanoma, cáncer cervicouterino, cáncer de vejiga, glioblastoma y cáncer de las vías respiratorias y digestivas altas. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer pancreático. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer colorrectal. En determinadas realizaciones, el individuo es un ser humano.

30 La presente divulgación proporciona adicionalmente métodos para inhibir el crecimiento tumoral utilizando los anticuerpos u otros agentes descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, el método para inhibir el crecimiento tumoral comprende poner en contacto la célula con un agente de unión a FZD (por ejemplo, un anticuerpo) *in vitro*. Por ejemplo, una línea celular inmortalizada o una línea celular de cancer que expresa uno o varios FZD diana, se cultiva en un medio al cual se le añade el anticuerpo u otro agente para inhibir el crecimiento tumoral. En algunas realizaciones, las células tumorales se aíslan de una muestra de un paciente tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, un derrame pleural o una muestra de sangre y se cultivan en el medio al cual se añade un agente de unión a FZD para inhibir el crecimiento tumoral.

35 En algunas realizaciones, el método de inhibición de crecimiento tumoral comprende poner en contacto el tumor o las células tumorales con un agente de unión a FZD (por ejemplo, un anticuerpo) *in vivo*. En determinadas realizaciones, la puesta en contacto de un tumor o de una célula tumoral con un agente de unión a FZD se lleva a cabo en un modelo animal. Por ejemplo, los agentes de unión a FZD se pueden administrar a xenoinjertos que expresan uno o más FZD que se desarrollado en ratones inmunocomprometidos (por ejemplo, ratones NOD/SCID) para inhibir el crecimiento del tumor. En algunas realizaciones, se aíslan células madre de cancer de una muestra de un paciente, tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, un derrame pleural o una muestra de sangre y se inyecta a ratones inmunocomprometidos a los que después se les administra un agente de unión a FZD para inhibir el crecimiento de células tumorales. En algunas realizaciones, el agente de unión a FZD se administra al mismo tiempo o poco después de la introducción de células tumorigénicas en el animal para impedir el crecimiento tumoral. En algunas realizaciones, el agente de unión a FZD se administra como una sustancia terapéutica después de que las células tumorigénicas hayan crecido hasta alcanzar un tamaño especificado.

40 50 En determinadas realizaciones, el método de inhibición del crecimiento tumoral comprende administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a FZD. En determinadas realizaciones, el individuo es un ser humano. En determinadas realizaciones, el individuo tiene un tumor o se le ha extirpado un tumor.

55 60 En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor en el cual la señalización Wnt es activa. En determinadas realizaciones, la señalización Wnt que es activa es señalización Wnt canónica. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor dependiente de Wnt. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tumor es sensible a la sobreexpresión de axina. En determinadas realizaciones, el tumor no comprende una mutación inactivante (por ejemplo, una mutación por truncamiento) en el gen supresor tumoral de la poliposis adenomatosa colónica (PAC) o una mutación activante en el gen de la beta-catenina. En determinadas realizaciones, el tumor expresa uno o más genes en una firma de gen Wnt. En determinadas realizaciones, el cáncer para el que se trata un individuo implica dicho tumor. En determinadas realizaciones, el tumor expresa uno o más receptores frizzled humanos con los que se une el agente de unión a FZD o el anticuerpo. En determinadas realizaciones, el tumor sobreexpresa uno o varios receptores frizzled humanos.

65 66 En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor seleccionado del grupo que consiste en un tumor colorrectal,

tumor pancreático, tumor pulmonar, tumor de ovario, tumor hepático, tumor de mama, tumor renal, tumor de próstata, tumor gastrointestinal, melanoma, tumor cervicouterino, tumor de vejiga, glioblastoma y tumor de las vías respiratorias y digestivas altas. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor colorrectal. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor pancreático.

- 5 La divulgación también proporciona un método para inhibir la señalización Wnt en una célula que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un agente de unión a FZD. En determinadas realizaciones, la célula es una célula tumoral. En determinadas realizaciones, el método es un método *in vivo* en el que la etapa de poner en contacto la célula con el agente comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz del agente.
- 10 En algunas realizaciones alternativas el método es un método *in vitro* o *ex vivo*. En determinadas realizaciones, la señalización Wnt que se inhibe es señalización Wnt canónica. En determinadas realizaciones, la señalización Wnt es señalización por WNT1, WNT2, WNT3, WNT3A, WNT7a, WNT7b y/o WNT10B. En determinadas realizaciones, la señalización Wnt es señalización por WNT1, WNT3A, WNT7b y/o WNT10B. Además, la divulgación proporciona un método para reducir la tumorigenidad de un tumor en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a FZD. En determinadas realizaciones, el tumor comprende células madre de cancer. En determinadas realizaciones, la frecuencia de las células madre cancerosas en el tumor se reduce por la administración del agente.
- 15 Por tanto, la divulgación proporciona un método para reducir la frecuencia de células madre de cancer en un tumor, que comprende poner en contacto el tumor con una cantidad eficaz de un agente de unión a FZD (por ejemplo, un anticuerpo anti FZD).
- 20 La divulgación proporciona además métodos de diferenciación de células tumorigénicas en células no tumorigénicas, que comprenden poner en contacto las células tumorigénicas con un agente de unión a FZD (por ejemplo, administrando el agente de unión a FZD a un individuo que tiene un tumor, o al cual se le ha extirpado un tumor, que comprende las células tumorigénicas. En determinadas realizaciones, las células tumorigénicas son células tumorales pancreáticas. En determinadas realizaciones alternativas, las células tumorigénicas son células de tumor de colon.
- 25 30 También se proporciona el uso de agentes polipéptidos o anticuerpos de unión a FZD, descritos en el presente documento para inducir la diferenciación de células que incluyen, pero sin limitación, células tumorales. Por ejemplo, se contemplan métodos para inducir la diferenciación de células que comprenden poner en contacto las células con una cantidad eficaz de un agente de unión a FZD (por ejemplo, un anticuerpo anti FZD) descrito en el presente documento. También se proporcionan métodos para inducir la diferenciación de células en un tumor en un individuo, que comprenden administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, polipéptido o anticuerpo de unión a FZD. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor pancreático. En otras realizaciones determinadas el tumor es un tumor de colon.
- 35 40 Se proporcionan adicionalmente métodos de tratamiento de una enfermedad o un trastorno en un individuo, en el que la enfermedad o el trastorno se asocia a la activación de la señalización Wnt y/o se caracteriza por un nivel aumentado de células madre y/o células progenitoras. En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento comprenden administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz del agente, polipéptido o anticuerpo de unión a FZD. En determinadas realizaciones, la señalización Wnt es señalización Wnt canónica.
- 45 50 La presente divulgación proporciona adicionalmente métodos para reducir activación de miofibroblastos en el estroma de un tumor sólido, que comprenden poner en contacto el estroma con una cantidad eficaz de un agente, polipéptido o anticuerpo de unión a FZD.
- 55 La presente divulgación proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los agentes de unión a FZD descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas se utilizan para inhibir el crecimiento tumoral y tratar cáncer en pacientes humanos.
- 60 65 En determinadas realizaciones, se preparan formulaciones para su almacenamiento y uso, combinando un anticuerpo o agente purificado de la presente divulgación con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un transportador, excipiente) (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20<sup>a</sup> edición Mack Publishing, 2000). Los vehículos adecuados, farmacéuticamente aceptables, incluyen, pero sin limitación, tampones no tóxicos, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro de sodio; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservadores (por ejemplo, cloruro de octadecil-dimetil-bencil-amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propilparabeno; catecol, resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, de menos de aproximadamente 10 restos de aminoácidos); proteínas tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; hidratos de carbono tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo,

complejos de Zn y proteína) y tensioactivos no iónicos tales como TWEEN o polietilenglicol (PEG).

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar de varias maneras ya sea para el tratamiento local o sistémico. La administración puede ser tópica (tal como en las membranas mucosas, que

5 incluye la administración vaginal y rectal) tal como parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos; pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo administración mediante un nebulizador, intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica); oral; o parenteral, incluyendo la administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o inyección o infusión intramuscular; o intracranial o intraventricular).

10 La formulación terapéutica puede estar en una forma de dosificación unitaria. Las formulaciones incluyen comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones en medios acuosos o no acuosos, o supositorios para administración oral, parenteral o rectal o para administración por inhalación. En las composiciones sólidas, tales como comprimidos, el ingrediente activo principal se mezcla con un transportador farmacéutico. Para la

15 formación de comprimidos, como ingredientes convencionales se 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 de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente divulgación, o una sal del mismo, farmacéuticamente aceptable y no tóxica. La composición de preformulación sólida después se subdivide en formas de dosificación unitaria del tipo antes descrito. Los

20 comprimidos, píldoras, etc., de la composición novedosa se pueden recubrir o se pueden formar compuestos de alguna otra manera para proporcionar una forma de dosificación que ofrezca la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o la píldora pueden comprender una composición interna cubierta por un componente externo. Además, los dos componentes se pueden separar por una capa entérica cuya función es resistir a la

25 disgregación y permite que el componente interno pase intacto a través del estómago o que se retrase su liberación. Se puede utilizar varios materiales para dichas capas o recubrimientos entéricos, incluyendo dichos materiales diversos ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

30 Los anticuerpos o agentes también pueden incluirse en microcápsulas. Dichas microcápsulas se preparan, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones como se describe en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20<sup>a</sup> Ed. Mack Publishing (2000).

35 En determinadas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas incluyen anticuerpos u otros agentes de la presente divulgación que forman complejos con liposomas (Epstein, et al., 1985, Proc. Nati. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang, et al., 1980, Proc. Nati. Acad. Sci. USA 77:4030; y patentes de Estados Unidos 4.485.045 y 4.544.545). En la patente de Estados Unidos 5.013.556, se desvelan liposomas con tiempo de circulación mejorado. Algunos 40 liposomas pueden generarse por evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE, del inglés *PEG-derivatized phosphatidylethanolamine*). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

45 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, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, (por ejemplo películas o microcápsulas). Como ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles tales como poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico), polilactidas (patente de Estados Unidos 3.73.919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7-etyl-L-50 glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), acetato isobutirato de sacarosa y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

55 En determinadas realizaciones, además de administrar el agente de unión a FZD, el método o tratamiento comprende además administrar un segundo agente anticanceroso (antes, de manera concurrente con, y/o después de la administración del agente de unión a FZD). También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el agente de unión a FZD y el segundo agente anticanceroso.

60 Se apreciará que la combinación de un agente de unión a FZD y un segundo agente anticanceroso se puede administrar en cualquier orden o de manera concurrente. En realizaciones seleccionadas, los agentes de unión a FZD se administrarán a pacientes que anteriormente se hayan tratado con el segundo agente anticanceroso. En otras realizaciones determinadas, el agente de unión a FZD y el segundo agente anticanceroso se administrarán de manera sustancialmente simultánea o concurrente. Por ejemplo, a un individuo se le puede administrar el agente de unión a FZD mientras que recibe un ciclo de tratamiento con el segundo agente anticanceroso (por ejemplo, quimioterapia). En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD se administrará en el plazo de 1 año del tratamiento con el segundo agente anticanceroso. En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD se

5 administrará en el plazo de 10, 8, 6, 4 o 2 meses de cualquier tratamiento con el segundo agente anticanceroso. En determinadas realizaciones, el agente de unión a FZD se administrará en el plazo de 4, 3, 2 o 1 semanas de cualquier tratamiento con el segundo agente anticanceroso. En algunas realizaciones, el agente de unión a FZD se administrará en el plazo de 5, 4, 3, 2 o 1 días de cualquier tratamiento con el segundo agente anticanceroso. Se apreciará adicionalmente que se pueden administrar al individuo dos agentes o tratamiento al individuo en cuestión de horas o minutos (es decir, sustancialmente de manera simultánea).

10 Las clases útiles de agentes anticancerosos incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auriestatinas, aglutinantes del surco menor de ADN, inhibidores de replicación de ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino tal como cis-platino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino trinucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos antifolatos, antimetabolitos, quimiosensibilizantes, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos de desempeño, antimetabolitos de purina, puromicinas, radiosensibilizantes, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasa, alcaloides de la vinca, o agentes similares.

15 En determinadas realizaciones, el segundo agente anticanceroso es un antimetabolito, un antimitótico, un inhibidor de topoisomerasa o un inhibidor de angiogénesis.

20 Los agentes anticancerosos que se pueden administrar en combinación con los agentes de unión a FZD incluyen agentes quimioterapéuticos. Por tanto, en determinadas realizaciones, el método o tratamiento implica la administración combinada de un anticuerpo o agente de la presente divulgación y un agente quimioterapéutico o u cóctel de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. El tratamiento con un anticuerpo se puede realizar antes, de manera concurrente o después de la administración de quimioterapias. Las quimioterapias que se contemplan en la divulgación incluyen sustancias químicas o fármacos que se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente, tales como gemcitabina, ironotecán, doxorrubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citocina ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; busulfán, citoxina, TAXOL, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina y carboplatino.

25 La administración combinada puede incluir la coadministración, ya sea en una sola formulación farmacéutica o utilizando formulaciones distintas, o la administración consecutiva en cualquier orden pero en general dentro de un período de tiempo de tal manera que todos los agentes activos puedan ejercer sus actividades biológicas simultáneamente. La preparación y los regímenes de dosificación de dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o un experto en la técnica puede determinarlo empíricamente.

30 La preparación y los regímenes de dosificación de dicha quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service Ed.*, M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

35 Los agentes quimioterapéuticos útiles en la presente divulgación también incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altetramina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosfaoramida y mostazas nitrogenadas de trimetilomelamina tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; 40 antibióticos tales como aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofénolico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potifromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5- fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tal como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5- FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedores de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de alofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; 45 bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglucido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; ionidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-ethylhidrazida; procarbazina; PSK; razoxano; sifofurano; 50 espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"- triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazine; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; 55 taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorrelbina, navelvina; novantrona, tenipósido; daunomicina; aminopterina; 60 xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidores de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO, por sus siglas en inglés); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Los agentes quimioterapéuticos también incluyen agentes anti hormonales, que actúan regulando o inhibiendo la acción de las hormonas en tumores, tales como antiestrógenos, que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida; leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

- En determinadas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de topoisomerasa. Los inhibidores de topoisomerasa son agentes quimioterapéuticos que interfieren con la acción de una enzima topoisomerasa (por ejemplo, topoisomerasa I o II). Los inhibidores de topoisomerasa incluyen, pero sin limitación, clorhidrato de doxorrubicina, citrato de daunorrubicina, clorhidrato de mitoxantrona, actinomicina D, etopósido, clorhidrato de topotecán, tenipósido (VM-26) e irinotecán. En determinadas realizaciones, el segundo agente anticáncer es irinotecán. En determinadas realizaciones, el tumor que se va a tratar es un tumor colorrectal y el segundo agente anticáncer es un inhibidor de topoisomerasa, tal como irinotecán.
- En determinadas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un antimetabolito. Un antimetabolito es una sustancia química con una estructura que es similar a la de un metabolito necesario para reacciones bioquímicas normales, aunque suficientemente diferente para interferir con una o más funciones normales de las células, tal como división celular. Los antimetabolitos incluyen, pero sin limitación, gemcitabina, fluorouracilo, capecitabina, metotrexato de sodio, ralitrexed, pemetrexed, tegafur, arabinósido de citosina, TIOGUANINA (GlaxoSmithKline) , 5-azacitidina, 6-mercaptopurina, azatioprina, 6-tioguanina, pentostatina, fosfato de fludarabina y cladribina, así como sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de estos. En determinadas realizaciones, el segundo agente anticáncer es gemcitabina. En determinadas realizaciones, el tumor que se va a tratar es un tumor pancreático y el segundo agente anticáncer es un antimetabolito (por ejemplo, gemcitabina).
- En determinadas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un agente antimitótico que incluye, pero sin limitación, agentes que se unen a tubulina. A modo de ejemplo no limitante, el agente comprende un taxano. En determinadas realizaciones, el agente comprende paclitaxel o docetaxel o una sal, ácido o derivado farmacéuticamente aceptable de paclitaxel o docetaxel. En determinadas realizaciones, el agente es paclitaxel (TAXOL), docetaxel (TAXOTERE), paclitaxel unido a albúmina (por ejemplo, ABRAXANE), DHA-paclitaxel o PG-paclitaxel. En determinadas realizaciones alternativas el agente antimitótico comprende un alcaloide de la vinca tal como vincristina, vinblastina, vinorrelbina o vindesina, o sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. En algunas realizaciones, el agente antimitótico es un inhibidor de cinesina Eg5 o un inhibidor de una cinasa mitótica tal como Aurora A o Plkl. En determinadas realizaciones en las que el agente quimioterapéutico administrado en combinación con el agente o polipéptido o anticuerpo de unión a FZD comprende un agente antimitótico, el cáncer o tumor que se está tratando es cáncer de mama o un tumor de mama.
- En determinadas realizaciones, el tratamiento implica la administración combinada de un anticuerpo (u otro agente) de la presente divulgación y radioterapia. El tratamiento con el anticuerpo (o agente) puede producirse antes, de manera concurrente o después de la administración de radioterapia. Se puede utilizar cualquier régimen de dosificación para dicha radioterapia, según lo determine el experto en la técnica.
- En algunas realizaciones, el segundo agente anticáncer comprende un anticuerpo. Por tanto, el tratamiento puede implicar la administración combinada de anticuerpos (u otros agentes) de la presente divulgación con otros anticuerpos contra抗ígenos adicionales asociados a tumor que incluyen, pero sin limitación, anticuerpos que se unen a EGFR, ErbB2, HER2, DLL4, Notch y/o VEGF. Se describen ejemplos de anticuerpos anti DLL4, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos nº. US 2008/0187532. En determinadas realizaciones, el segundo agente anticáncer es un anticuerpo que es un inhibidor de angiogénesis (por ejemplo, un anticuerpo anti VEGF). Anticuerpos anti DLL4 adicionales se describen, por ejemplo, en las publicaciones de patente internacionales nº. WO 2008/091222 y WO 2008/0793326 así como en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos nº US 2008/0014196; US 2008/0175847; US 2008/0181899 y US 2008/0107648. Se describen ejemplos de anticuerpos anti Notch, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos nº US 2008/0131434. En determinadas realizaciones, el segundo agente anticáncer es un anticuerpo que es un inhibidor de angiogénesis (por ejemplo, un anticuerpo anti VEGF). En determinadas realizaciones, el segundo agente anticáncer es un inhibidor de señalización Notch. En determinadas realizaciones, el segundo agente anticáncer es AVASTIN (Bevacizumab), Herceptin (Trastuzumab), VECTIBIX (Panitumumab) o Erbitux (Cetuximab). La administración combinada puede incluir la coadministración, ya sea en una sola formulación farmacéutica o utilizando formulaciones distintas, o la administración consecutiva en cualquier orden, pero en general dentro de un período de tiempo de tal manera que todos los agentes activos pueden ejercer sus actividades biológicas simultáneamente.
- Además, el tratamiento puede incluir la administración de una o más citocinas (por ejemplo, linfocinas, interleucinas, factores de necrosis tumoral y/o factores de crecimiento) o puede ir acompañado de extirpación quirúrgica de células cancerosas o de cualquier otro tratamiento que considere necesario el médico tratante.
- Para el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo o agente de la presente divulgación depende del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, de la gravedad y evolución de la enfermedad, de la capacidad de respuesta de la enfermedad, de si el anticuerpo o agente se administra para propósitos terapéuticos o preventivos, del tratamiento previo, del historial clínico del paciente, etcétera y todo según el criterio del médico tratante. El anticuerpo o agente se puede administrar una vez o durante una serie de tratamientos que duran de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una curación o se obtenga una disminución del estado de la enfermedad (por ejemplo reducción en el tamaño del tumor). Los regímenes de dosificación óptimos se pueden calcular a partir de mediciones de la acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente y variarán dependiendo de

la fuerza relativa del anticuerpo o agente individual. El médico que realiza la administración puede determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición. En determinadas realizaciones, la dosificación es de 0,01 µg a 100 mg por kg de peso corporal y se puede suministrarse una o más veces al día, a la semana al mes o al año. En determinadas realizaciones, el anticuerpo u otro agente de unión a

- 5 FZD se suministra una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En determinadas realizaciones, la dosificación del anticuerpo u otro agente de unión a FZD es de aproximadamente 0,1 mg a 20 mg por kg de peso corporal. El médico tratante puede calcular las tasas de repetición de la dosificación basándose en los tiempos de residencia medidos y en las concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales

10 V. Firma del gen Wnt y sus usos

La presente divulgación proporciona adicionalmente una firma del gen Wnt, una firma del gen indicativa de actividad de señalización Wnt en tumores, que se puede utilizar en la selección de tumores, pacientes y/o terapia.

- 15 La firma del gen Wnt comprende la expresión diferencial de un conjunto de genes en tumores en los que se activa la señalización Wnt (y/o que depende de la señalización Wnt), en relación a tumores en los que no se activa la señalización Wnt. En determinadas realizaciones, la señalización Wnt es señalización Wnt canónica. La firma del gen Wnt es útil para la identificación de tumores y/o pacientes que probablemente respondan al tratamiento con un inhibidor de señalización Wnt (por ejemplo, un agente de unión a FZD que es un antagonista de al menos un receptor frizzled humano y/o un inhibidor de señalización Wnt).

20 En determinadas realizaciones, la firma del gen Wnt comprende uno o más genes (es decir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 genes), incluidos en la Tabla 3 a continuación. Los números "ID de conjunto de sonda" son los números de ID de conjunto de sonda de la matriz GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 ("HG U133 Plus\_2"; Affymetrix, Santa Clara, CA). En los tumores en los que la señalización Wnt está activa (es decir, tumores que son positivos para una firma de gen Wnt), uno o varios de los niveles de expresión de uno o varios de los genes en la Tabla 3 que comprenden la firma del gen Wnt están elevados en relación a los tumores en los que no está activa la señalización Wnt. En algunas realizaciones, la firma del gen Wnt comprende dos o más genes enumerados en la Tabla 3 siguiente. En algunas realizaciones, la firma del gen Wnt comprende tres o más, 30 cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o más, doce o más, trece o más, catorce o más, quince o más, diecisésis o más, diecisiete o más, dieciocho o más o diecinueve de los genes enumerados en la Tabla 3 siguiente. En determinadas realizaciones, el tumor que se evalúa para determinar los niveles de expresión de uno o más genes indicados en la Tabla 3, es un tumor colorrectal. En determinadas realizaciones, la firma del gen Wnt comprende AXIN2 y/o FOXQ1. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor colorrectal y la firma del gen WNT comprende AXIN2, LGR5 y/o FOXQ1.

35 Tabla 3. Ejemplos de genes de firma de gen Wnt

ID de conjunto de sonda HG_U133_Plus_2	Símbolo del gen	Descripción
222696_at	AXIN2	axina 2 (conductina, axil)
206286_s_at	TDGF1	factor 1 de crecimiento derivado de teratocarcinoma
213880_at	LGR5	receptor 5 acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina
207217-s_at	NOX1	NADPH oxidasa 1
209588_at	EPHB2	receptor B2 de EPH
212 85 0_s_at	LRP4	proteína 4 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad
205107_s_at	EFNA4	efrina-A4
214058_at	MYCL1	homólogo 1 de oncogén vírico de mielocitomatosis v-myc, derivado de carcinoma de pulmón (aviar)
209864_at	FRAT2	dispuesto frecuentemente en linfomas 2 de linfocitos T avanzados
202121_s_at	PTPRO	proteína tirosina fosfatasa, receptor de tipo, O
229376_at		etiqueta de secuencia expresada (EST, <i>expressed sequence tag</i> ) desconocida
202431_s_at	MYC	homólogo del oncogén vírico de mielocitomatosis v-myc (aviar)
212444_at	GPCR5A	receptor acoplado a proteína G, familia C, grupo 5, miembro A
222938_x_at	ENPP3	pirofosfatasa ectonucleotídica/fosfodiesterasa 3
241607_at	LOC370102	proteína hipotética LOC730102
227475_at	FOXQ1	caja forkhead Q1
230398_at	TNS4	tensina 4
4 02 84_at	FOXA2	caja forkhead A2
219704_at	YBX2	proteína 2 de unión de caja Y

- 5 También se proporcionan métodos de uso de la firma del gen Wnt para seleccionar pacientes (o para identificar un paciente) adecuados para el tratamiento con un inhibidor de la vía Wnt o para determinar la eficacia de una terapia particular. En determinadas realizaciones, el inhibidor de señalización Wnt es un agente que se une a FZD, tal como un anticuerpo FZD antagonista. Por ejemplo, se puede identificar a un paciente como adecuado para el tratamiento con uno o varios agentes de unión a FZD determinando si un tumor en el paciente, o un tumor extirpado del paciente, presentan una firma de gen Wnt. En determinadas realizaciones, la detección de la firma del gen Wnt comprende determinar el nivel de expresión en el tumor de uno o más genes indicados la Tabla 3. Si los niveles de expresión de uno o más genes indicados en la Tabla 3 que comprenden la firma del gen Wnt son elevados en el tumor (por tanto indicando que la señalización Wnt es activa en el tumor), el paciente se identifica como adecuado para el tratamiento con un agente de unión a FZD, tal como un anticuerpo anti FZD que inhibe la señalización Wnt. Asimismo se proporcionan métodos de uso de la firma del gen Wnt para seleccionar una terapia adecuada para un paciente particular.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- También se proporciona un método para tratar cáncer en un paciente que tiene un tumor, o del cual se ha extirpado un tumor, que comprende: (a) proporcionar el nivel de expresión en el tumor de uno o más genes indicados la Tabla 3; (b) seleccionar al paciente para que comience o continúe el tratamiento con un agente de unión a FZD basándose en el nivel de expresión de uno o más genes, y (c) administrar al paciente el agente de unión a FZD. En determinadas realizaciones, el método comprende medir el nivel de expresión de uno o más genes en el tumor. En determinadas realizaciones, el nivel de expresión de uno o más genes se compara con un nivel de control o de referencia.
- También se proporcionan métodos para identificar un tumor que puede responder al tratamiento con un inhibidor de señalización Wnt. En determinadas realizaciones, el inhibidor de señalización Wnt es un agente de unión a FZD. En determinadas realizaciones, el método comprende someter el tumor a ensayo para determinar una firma de gen Wnt. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden determinar en el tumor el nivel de expresión de uno o más genes indicados la Tabla 3.
- También se proporcionan métodos de exploración de candidatos farmacológicos contra tumores identificados como que presentan la firma del gen Wnt. En determinadas realizaciones, los candidatos farmacológicos son inhibidores de la señalización Wnt. Dichos candidatos farmacológicos se someten preferentemente a ensayo para determinar su eficacia sobre aquellos tumores en los que la señalización Wnt es activa y/o que dependen de la señalización Wnt. La presente divulgación también proporciona un método de exploración de un candidato farmacológico que comprende (a) evaluar en un tumor el nivel de expresión de uno o más genes indicados en la Tabla 3 (b) seleccionar el tumor para someter a ensayo con el candidato farmacológico basándose (al menos en parte) en el nivel de expresión de uno o más genes, y (c) someter a ensayo el efecto del candidato farmacológico sobre el tumor.
- Además, en determinadas realizaciones, se puede determinar el efecto de un fármaco sobre la firma del gen Wnt y se utilice para determinar la eficacia del tratamiento de un tumor en el que la señalización Wnt es activa. En determinadas realizaciones, esto proporciona un método de control del tratamiento de un paciente. En algunas realizaciones alternativas, esto proporciona un método para determinar la eficacia de un candidato farmacológico. En determinadas realizaciones, una disminución en los niveles de expresión de uno o más genes indicados la Tabla 3 (es decir, una reducción o una eliminación de la firma del gen Wnt) indica eficacia del tratamiento.
- En determinadas realizaciones, la determinación del nivel de uno o más genes en una firma de gen Wnt comprende determinar los niveles de expresión de polinucleótidos de uno o más genes. En determinadas realizaciones, la detección de una firma de gen Wnt comprende detectar la expresión de ARNm de polinucleótidos de uno o más genes que comprenden la firma. En algunas realizaciones, la detección de la expresión de ARNm se realiza mediante transferencia Northern. En algunas realizaciones, la detección de la expresión de ARNm se realiza mediante RT-PCR, PCR en tiempo real o PCR cuantitativa, utilizando conjuntos de cebadores que amplifican específicamente los polinucleótidos que comprenden la firma de células madre cancerosas. En determinadas realizaciones, la detección de ARNm comprende exponer una muestra a sondas de ácido nucleico complementarias a polinucleótidos que comprenden una firma de gen de célula madre cancerosa. En algunas realizaciones, el ARNm de la muestra se convierte a ADNc antes de la detección. En determinadas realizaciones, la detección de ARNm es mediante micromatrices que comprenden polinucleótidos que se hibridan con uno o más genes en la firma del gen Wnt.
- En determinadas realizaciones, la determinación del nivel de uno o más genes en una firma de gen Wnt comprende detectar polipéptidos codificados por uno o más genes. En determinadas realizaciones, la determinación de los niveles de los productos de expresión polipeptídicos de uno o más genes comprende exponer una muestra a anticuerpos específicos para los polipéptidos y detectar la unión de los anticuerpos a los polipéptidos, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia cuantitativa o ELISA. Otros métodos de detección se conocen por aquellos habitualmente expertos en la técnica, véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos nº. 6.057.105.
- También se proporciona una matriz que comprende polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas con uno o más genes indicados en la Tabla 3. También se proporciona un kit que comprende la matriz.

También se proporcionan Kits que comprenden anticuerpos que se unen al producto de expresión de uno o más genes indicados en la Tabla 3.

VI. Kits que comprenden agentes de unión a FZD.

- 5 La presente divulgación proporciona kits que comprenden los anticuerpos u otros agentes descritos en el presente documento y que se pueden utilizar para realizar los métodos descritos en el mismo. En determinadas realizaciones, un kit comprende al menos un anticuerpo purificado contra uno o más receptores frizzled humanos en uno o más recipientes. En algunas realizaciones, los kits contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para 10 realizar un ensayo de detección, que incluye todos los controles, instrucciones para realizar el ensayo, y cualquier programa informático necesario para el análisis y la presentación de resultados. Un experto en la materia reconocerá fácilmente que los anticuerpos o agentes desvelados de la presente divulgación se pueden incorporar fácilmente en uno de los formatos de kits establecidos que son muy conocidos en la técnica.
- 15 Se proporcionan adicionalmente kits que comprenden un agente de unión a FZD (por ejemplo, un anticuerpo de unión a FZD), así como un segundo agente anticanceroso. En determinadas realizaciones, el segundo agente anticanceroso es un agente quimioterapéutico (por ejemplo, gemcitabina o irinotecán). En determinadas realizaciones, el segundo agente anticanceroso es un inhibidor de la angiogénesis. En determinadas realizaciones el 20 segundo agente anticanceroso es un inhibidor de la señalización Notch (por ejemplo, un anticuerpo anti DLL4 o anti Notch).

También se proporcionan kits que comprenden un agente de unión a FZD y uno o más reactivos para determinar la expresión de uno o más genes indicados la Tabla 3 anterior ("ejemplos de genes de firma de gen Wnt").

- 25 Las realizaciones de la presente divulgación se pueden definir adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que describen con detalle la preparación de determinados anticuerpos de la presente divulgación y sus métodos de uso. Será evidente para los expertos en la técnica que pueden realizarse muchas modificaciones, tanto en los materiales como en los métodos, sin apartarse del alcance de la presente divulgación.

30 **Ejemplos**

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones que se describen en el presente documento son solo para fines ilustrativos y que teniendo en cuenta lo anterior, los expertos en la técnica sugerirán diversas modificaciones o cambios y se incluirán dentro del espíritu y alcance de esta solicitud.

35 **Ejemplo 1**

Identificación/generación de anticuerpos anti FZD

- 40 Los anticuerpos humanos que reconocen específicamente uno o más receptores Frizzled humanos se pueden aislar utilizando la tecnología de presentación en fago. Por ejemplo, para determinar el reconocimiento específico y de alta afinidad del dominio extracelular del receptor FZD7 humano, se puede seleccionar una biblioteca de anticuerpos sintéticos que contenga dominios variables de anticuerpo humano. Una vez que se haya identificado un Fab específico con las características deseadas, las regiones variables humanas del Fab se cloran después en un vector 45 de expresión de Ig que contiene la cadena pesada y la cadena ligera (kappa o lambda) de IgG2 para la expresión de anticuerpos humanos en células CHO.

Para identificar un Fab específico, 18R8, que se une al dominio extracelular de FZD7, se utilizó presentación en fago. Se incubaron  $2 \times 10^{13}$  partículas de fago presentadoras de Fab de una fagoteca Fab humana con proteína Fc DEC FZD7 recombinante inmovilizada de manera pasiva. El fago inespecífico se eliminó por lavado, y después, el fago específico se eluyó con DTT. El resultado de lo eluido se utilizó para infectar bacterias F+ TG1, rescatadas con fago auxiliar. Después, se indujo la presentación de Fab con IPTG (0,25 mM). El resultado de esta ronda rescatada sirvió como el punto de partida para rondas de selección adicionales. Las selecciones continuaron hasta la ronda 3, y después el resultado se exploró en un ensayo ELISA para determinar los Fab específicos para la proteína Fc DEC 55 FZD7 recombinante. Se identificó un Fab que se unía específicamente a FZD7 humano.

Se obtuvieron las secuencias de las regiones variables de los Fab identificados. Se eliminó un sitio de glucosilación unido a N de la secuencia precursora a través de mutagénesis dirigida a sitio. El sitio de glucosilación unido a N, Asn, en la CDR1 de cadena pesada se cambia por His. Esta mutación se realizó para impedir la glucosilación durante la expresión en sistemas de mamífero. El Fab resultante se denominó 18R8. Las secuencias de las CDR de la cadena pesada y de la cadena ligera de 18R8 se muestran a continuación en la Tabla 4 siguiente. Las secuencias VH y VL de 18R8 se proporcionan en las SEQ ID NO: 10 y 12, respectivamente.

Tabla 4. CDR de los anticuerpos humanos 18R8 y 18R5

Líder	Cadena pesada			Cadena ligera		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
18R8	GFTFS <u>H</u> YTLS (SEQ ID NO:1)	VISGDDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	NFIKVVFAN (SEQ ID NO:3)	SGDKLGKKYAS (SEQ ID NO: 4)	EKDNRPSG (SEQ ID NO:5)	SSFAGNSLE (SEQ ID NO:6)
18R5	GFTFS <u>H</u> YTLS (SEQ ID NO:1)	VISGDDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	NFIKVVFAN (SEQ ID NO:3)	SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO:7)	DKSNPRSG (SEQ ID NO:8)	QSYANTLSSL (SEQ ID NO:9)

\*Se subraya el cambio dirigido a sitio para eliminar el sitio de glucosilación unido A

El Fab 18R5, anti FZD, se generó asociando las cadenas VH-CH1 del Fab 18R8 con diversas cadenas VL-CL de la fagoteca Fab original de la cual se identificó 18R8. Después de tres rondas de selección con proteína Fc DEC FZD7 recombinante inmovilizada se aisló el anticuerpo 18R5 de la biblioteca. Las secuencias de las CDR de 18R5 se muestran en la Tabla 4 anterior. La VL del anticuerpo 18R5 tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 14.

5 Las CDR de cadena pesada y la VH del anticuerpo 18R5 son idénticas a las del anticuerpo 18R8.

Las regiones variables humanas de los Fab 18R8 y 18R5 se clonaron en el vector de expresión de Ig que contenía la cadena pesada y la cadena ligera (lambda) de IgG2 humana para la expresión en células CHO. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de IgG 18R8 (que incluye secuencias señal) se proporcionan en las SEQ ID NO: 11 y 13, respectivamente. La secuencia señal en el extremo N terminal de la secuencia de aminoácidos de cada una de las cadenas se escinde después de la secreción. Las secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de IgG 18R8 se proporcionan en las SEQ ID NO: 18 y 20, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de IgG 18R5 se proporcionan en las SEQ ID NO: 11 y 15, respectivamente. (Nuevamente, la secuencia señal en el extremo N terminal de la secuencia de aminoácidos de cada una de las cadenas se escinde después de la secreción). Las secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de IgG 18R5 se proporcionan en las SEQ ID NO: 18 y 22, respectivamente. Para purificar los anticuerpos se utilizó purificación con proteína A

10 Utilizando el sistema Biacore 2000 de Biacore Lifescience (GE Healthcare) se determinaron las  $K_D$  de los anticuerpos 18R8 y 18R5. Específicamente, se realizaron diluciones en serie con factor 2, de 100 a 0,78 nM, de los anticuerpos anti Fzd7 purificados, en HBS-P (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15M, tensioactivo P20 al 0,005 % v/v). Cada dilución se sometió a ensayo frente a proteínas Fc Fzd recombinantes inmovilizadas en una microplaca CM5 de Biacore. Se midieron las velocidades de asociación y de disociación y utilizando el programa informático Biaevaluation (Tabla 5, a continuación), se determinaron los valores  $K_D$ .

15

20 Tabla 5. Afinidad de los anticuerpos de IgG 18R8 y 18R5

FZD	18R8	18R5
	$K_D$ (nM)	$K_D$ (nM)
1	15,6	4,6
2	6,2	3,3
5	4,2	1,9
7	5,2	1,8
8	29,3	5,8

## Ejemplo 2

30 Análisis FACS de anticuerpos anti FZD que demuestran la unión a múltiples proteínas FZD humanas expresadas en la superficie celular

35 Para determinar la capacidad de los anticuerpos para unirse a proteínas FZD expresadas en la superficie celular se utilizó análisis de citometría de flujo

35 Para fomentar una fuerte expresión en la superficie celular de las proteínas FZD seleccionadas, se generaron plásmidos de expresión de mamífero que comprendían un promotor de CMV en dirección 5' de los polinucleótidos que codifican FZD utilizando tecnología de ADN recombinante estándar (dichas construcciones se denominaron "FL sin FLAG"). Se generaron plásmidos de expresión similares para cada una de las diez proteínas frizzled humanas. 40 También se prepararon versiones alternativas de los vectores de expresión de FZD en los que también se generaron polinucleótidos que codificaban una etiqueta epitópica FLAG de secuencia señal N terminal fusionada al extremo N terminal de la proteína FZD madura, por tecnología recombinante estándar (dichas construcciones se denominaron "etiqueta FL"). Adicionalmente, se diseñaron plásmidos de expresión que codificaban proteínas quiméricas que comprendían el dominio DRC (también denominado dominio "fri") o el FZD o todo el dominio extracelular N terminal 45 de la proteína FZD fusionado a un epitópico FLAG de secuencia señal N terminal (denominado "etiqueta fri" y "etiqueta DEC", respectivamente), así como una sección C terminal que codifica el dominio transmembrana y citoplasmático de una proteína CD4 humana.

50 Para medir la unión del anticuerpo a FZD por citometría de flujo, se cotransfectaron células HEK 293 con vectores de expresión FZD y el marcador de transfección GFP. Al cabo de 24 a 48 horas posteriores a la transfección, se recogieron las células en suspensión y se incubaron en hielo con anticuerpos anti FZD (10 µg/ml, a menos que se indique otra cosa) o IgG de control, para detectar la unión de fondo del anticuerpo. Las células se lavaron y los anticuerpos primarios detectados con anticuerpos secundarios específicos de dominio Fc se conjugaron con un cromóforo fluorescente (por ejemplo, anti IgG humana conjugada con ficoeritrina). Después, las células marcadas se analizaron por citometría de flujo para identificar anticuerpos anti FZD que reconocían específicamente la expresión de la proteína FZD en la superficie celular. Los anticuerpos monoclonales 18R5 y 18R8 reconocieron la proteína FZD en células transfectadas. Como se muestra en las Figuras 1 y 2, tanto 18R8 como 18R5 se unen a FZD múltiples, incluyendo FZD1, FZD2, FZD5, FZD6, y FZD8. Para examinar la capacidad relativa de 18R8 y 18R5 para unirse a cada proteína FZD, se llevaron a cabo análisis de titulación en los que se modificó la cantidad de anticuerpo

en la reacción de unión (Figura 2). Este análisis demostró que 18R5 presentaba mayor fuerza de unión con cada uno de los receptores FZD (FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8) en comparación con 18R8.

### Ejemplo 3

- 5 Inhibición de la señalización Wnt por 18R8 y 18R5
- La capacidad de los anticuerpos de IgG 18R8 y 18R5, anti FZD, para bloquear la activación de la vía de señalización Wnt, se determinó *in vitro* utilizando ensayos con indicador luciferasa.
- 10 Se cultivaron células STF293 en DMEM complementado con antibióticos y FCS al 10 %. Las células STF293 son células 293 en las que se ha integrado de manera estable lo siguiente: (1) un vector indicador de Luc 8xTCF que contiene siete copias del sitio de unión a TCF unido a un promotor en dirección 5' (*upstream*) de un gen indicador de luciferasa de luciérnaga para medir niveles de señalización Wnt canónica (Gazit et al., 1999, *Oncogene* 18:5959-66)
- 15 y (2) un indicador de luciferasa de *Renilla* (Promega; Madison, WI) como un control interno para determinar la eficiencia de la transfección. Las células se añadieron a placas de cultivo. Se añadieron los anticuerpos FZD a ensayar (o sin anticuerpos). Después, las células se incubaron en presencia o ausencia de medio acondicionado con Wnt3A que se había preparado a partir de células L que expresaban de manera estable Wnt3a (línea celular CRL-2647 de la ATCC) o medio acondicionado de control a partir de células L que no sobreexpresaban Wnt3A (línea celular CRL-2648 de la ATCC). Después de incubar durante la noche, se midieron los niveles de luciferasa utilizando un kit de análisis de luciferasa doble (Promega; Madison, WI) con actividad de luciferasa de luciérnaga normalizada a actividad de luciferasa de *Renilla*.
- 20 De esta manera se determinó la capacidad de los anticuerpos 18R8 y 18R5 para inhibir la activación de la vía inducida por Wnt. Se trataron células STF 293 con diferentes concentraciones de anticuerpos de IgG 18R8 o 18R5 y se añadió medio acondicionado con Wnt3A. Las células se analizaron 18 horas después utilizando el kit de análisis de luciferasa doble. En la Figura 3 se muestran los resultados. Con el anticuerpo 18R5, anti FZD, se observó una mayor inhibición de la señalización por TCF de la vía Wnt3a.

- 25 30 En experimentos adicionales se determinó la capacidad del anticuerpo 18R8 para antagonizar la señalización por diferentes ligandos de Wnt. Durante 48 horas, se transfectaron células HEK 293 con Wnt1, Wnt2, Wnt2b2, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt9b y Wnt10b, con Fugene 6 (Roche). Como un control de activación positivo se utilizó medio acondicionado con Wnt3A ("WNT3ACM"). Las células STF293 se cultivaron en DMEM complementado con antibióticos y FCS al 10 % y se trataron con 20 µg/ml de anticuerpo 18R8 o sin anticuerpo. Después, se añadieron las células HEK293 que sobreexpresan Wnt. Dieciocho horas después del tratamiento se midieron los niveles de luciferasa utilizando el kit de análisis de luciferasa doble. En la Figura 4 se muestran los resultados. Se demostró que el anticuerpo 18R8, anti FZD, inhibía la señalización de diversas Wnt, incluyendo la inhibición de Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt7A, Wnt7B y Wnt10B, además de Wnt3A.

### Ejemplo 4

#### 18R8 bloquea la unión de FZD con Wnt

- 45 Para determinar la capacidad de 18R8 para bloquear la unión de FZD con Wnt, se añadieron al medio de cultivo 2 µl de FZD8-Fc soluble 1,32 µg/µl que contenía el dominio Fri (aminoácidos 1-157 de FZD8 ligados en marco a Fc de IgG1 humana) para unir Wnt3A (añadido como 20 µl de medio acondicionado Wnt3A) solo o en presencia del anticuerpo de IgG 18R8 (añadido como 4 µl de 3,71 µg/µl). Las mezclas se incubaron solas o en presencia de esferas de proteína A Sepharose (GE Healthcare products; 20 µl de solución al 50 % en PBS) durante 2 h a 4 °C. Después de la incubación las esferas de proteína A (y cualquier proteína que forme complejo con las esferas de proteína A) en cada muestra se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se analizó para determinar la capacidad de inducir actividad de luciferasa 8xTCF. El sobrenadante se añadió a células STF293, que expresaban de manera estable 8xTCF (ocho copias del dominio de unión a TCF hacia el extremo 5' de un gen indicador de luciferasa de luciérnaga) para medir los niveles de señalización Wnt canónica y que se cultivaron en DMEM complementado con antibióticos y FCS al 10 %. Al cabo de 18 horas de tratamiento de las células CTF293, se midieron los niveles de luciferasa utilizando el kit de análisis de luciferasa doble (promega; Madison, WI).

- 50 55 Como se observa en la Figura 5, Wnt3A y la proteína A inducen una fuerte activación del gen indicador, medida en unidades de luciferasa (RLU) (Figura 5, columna 1). La adición de Fzd8-fc induce la formación de un complejo entre Wnt3A-Fzd8 y la proteína de fusión Fc con las esferas de proteína A Sepharose, y una vez eliminado por centrifugación el complejo de proteína A-Wnt3A-Fzd8, el sobrenadante resultante ya no es capaz de activar el gen indicador (Figura 5, columna 2). Después de la adición de 18R8, este complejo probablemente se ve interrumpido por el bloqueo del anticuerpo sobre el dominio de interacción Wnt3A de Fzd8, porque aunque el complejo de proteína-A-Fzd8-fc se elimina junto con 18R8, que puede interaccionar fácilmente con la proteína A a través de su propia parte Fc, la actividad del indicador se puede observar fácilmente, lo que sugiere niveles suficientes de Wnt3A sin formar complejos (Figura 5, columna 3). 18R8 también funciona en los Fzd endógenos presentes en las células STF293, porque la incapacidad de la proteína A para eliminar 18R8 no muestra el retorno de la activación de Wnt3A

(Figura 5, columna 6).

Los datos de la Figura 5 muestran que la presencia del anticuerpo de IgG 18R8 en la reacción de incubación hace que se retenga la actividad de Wnt3A en el sobrenadante en relación a la actividad observada solo con FZD8-Fc.

5 Estos resultados indican que 18R8 bloquea la capacidad de FZD8 para unirse con Wnt3A e indican que la unión del anticuerpo con el epítopo reconocido por 18R8 es capaz de bloquear las interacciones entre Wnt y FZD.

#### Ejemplo 5

10 Mapeo epítópico de 18R8 y 18R5

Para identificar el epítopo de FZD reconocido por el anticuerpo de IgG 18R8, se realizó un mapeo epítópico. Se utilizó análisis de citometría de flujo de FZD expresado en la superficie celular para medir la unión del anticuerpo. Se generaron vectores plasmídicos de expresión de mamífero que comprendían un promotor de CMV en dirección 5' de los polinucleótidos que codifican una etiqueta epítópica FLAG de secuencia señal N-terminal fusionada al extremo N del dominio Fri de FZD8 a su vez fusionado al dominio transmembrana y al dominio intracelular de la proteína CD4 utilizando tecnología recombinante estándar. Esta construcción de expresión permite la expresión del dominio Fri de FZD8 en la superficie de la célula, así como la expresión de una etiqueta epítópica FLAG para controlar la expresión. Después, se utilizó mutagénesis dirigida para modificar aminoácidos seleccionados dentro del dominio extracelular de FZD. Las células HEK293 se cotransfectaron con vectores de expresión que codificaban el FZD y el marcador de transfección GFP. Cuarenta y ocho horas después de la transfección se recogieron las células en suspensión y se incubaron en hielo con anticuerpo anti FZD o IgG de control para detectar unión de fondo del anticuerpo. Las células se lavaron y los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos secundarios anti anticuerpo conjugados con un cromóforo fluorescente. Después, las células marcadas se analizaron por citometría de flujo para medir la unión de anticuerpo anti FZD con FZD en la superficie celular.

25 De esta manera, se identificaron aminoácidos específicos dentro del dominio extracelular FZD que eran importantes para la unión de los anticuerpos anti FZD. Cuando los restos de aminoácidos 82-83 de FZD8 se mutaron de PD a SQ, la unión de FZD8 por 18R8 no se vio en gran parte afectada (Figura 6). De manera similar, cuando el aminoácido 109S se cambió por 109Q, no se observó ningún efecto apreciable en la unión. Por otra parte, cuando los restos 70-71 de FZD8 se cambiaron de HQ a AE, la unión de 18R8 con FZD8 disminuyó claramente en las células (Figuras 6 y 7). Cuando los aminoácidos 66-67 se mutaron de GL a AA, o cuando los aminoácidos 68-69 se mutaron de EV a QL, o cuando los aminoácidos 126-127 se mutaron de FG a NV, la unión del anticuerpo 18R8 con FZD8 en las células se perdió de manera similar. La pérdida de unión a FZD, cuando determinados aminoácidos se han sustituido por el dominio extracelular de FZD, reveló sitios de reconocimiento específicos del anticuerpo. De esta manera, se determinó que el anticuerpo 18R8 se unía a un epítopo que comprendía los aminoácidos 66-71 GLEVHQ (SEQ ID NO: 25) de FZD8 y los aminoácidos 124-128 GF de FZD8 humano. Esta región epítópica está bien conservada en todos los receptores frizzled humanos a los que se une FZD8 (es decir, FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 y FZD8) y no muy conservada en los receptores frizzled humanos a los que no se une FZD8 (es decir, FZD3, FZD4, FZD6, FZD9 o FZD10).

30 También se realizaron experimentos FACS que comparaban la unión de IgG 18R5 e IgG 18R8 con FZD8 natural y mutante en las células. Estos experimentos demostraron que los anticuerpos 18R8 y 18R5 se unían a un epítopo similar en FZD8 (Figura 7).

#### Ejemplo 6

45 Identificación del sitio de unión biológica (SUB de los receptores FZD)

50 El descubrimiento de anticuerpos que inhiben la señalización Wnt y el descubrimiento del epítopo dentro de la proteína FZD unida por estos anticuerpos, ha permitido analizar ahora qué regiones de la estructura de la proteína FZD son importantes para la señalización Wnt. Para examinar esto, se examinó la estructura cristalina del dominio Fri de la proteína Fzd 8 de ratón. Identificamos el epítopo de unión de 18R8 y 18R5 que se encuentra dentro de una región de la estructura FZD en la que anteriormente no se había apreciado un papel funcional específico. Además, el epítopo contenía dos elementos de superficie distintos de Fzd (que se denominaron "borde superior" y "borde inferior") separados por una hendidura. Al comparar los diez receptores frizzled humanos, también se descubrió que existía una notable conservación de la identidad de los aminoácidos que cubre la parte inferior de esta hendidura. La región que comprende esta hendidura, así como el "borde superior" y el "borde inferior" con los que se une 18R8 y 18R5, se ha denominado sitio de unión biológica (SUB) de FZD. En la Figura 9 se muestran imágenes de la estructura de un dominio Fri de Fzd basados en el análisis de la estructura cristalina anteriormente descrita de FZD8 de ratón (Dann CE et al., *Nature* 412 (6842) 86-90, 2001) y en análisis realizados utilizando el programa informático Pymol. En la imagen izquierda superior se muestra una vista de la superficie del dominio Fri de FZD comprendiendo la región de la proteína Fzd el sitio de unión biológica (SUB) indicado con un círculo blanco. Cada una de las regiones denominadas "borde superior", "borde inferior" y "hendidura" del SUB se destacan con una coloración de superficie más oscura en imágenes distintas en la parte inferior del panel. En la imagen derecha superior de la Figura 9 se destacan con una superficie más oscura, los restos que se conservan en 9 o 10 de los diez miembros de

familia de Fzd humanos.

#### Ejemplo 7

##### 5 Inhibición de crecimiento tumoral *in vivo* por 18R5

###### *Prevención de crecimiento tumoral dependiente de Wnt por 18R5*

10 Ratones NOD/SCID hembra de 5-7 semanas de vida, recibieron inyección de 50.000 células derivadas de virus de tumor mamario de ratón (VTMM)-WNT1 en el panículo adiposo mamario derecho superior. Los ratones transgénicos (VTMM)-Wnt-1 muestran etapas definidas de tumorigénesis mamaria, que incluyen hiperplasia, carcinoma ductal invasivo y metástasis distante, y por lo tanto este modelo de ratón de cáncer de mama proporciona una herramienta útil para analizar el papel de Wnt en la formación y crecimiento tumoral (Nusse y Varmus (1982) *Cell* 31:99-109). Los tumores de estos ratones se disociaron y estas células tumorales disociadas se utilizaron para la propagación tumoral. Los ratones con células tumorales implantadas en el panículo adiposo mamario se controlaron dos veces a la semana. Una vez que los tumores eran palpables, se midieron dos veces cada semana y se determinó el volumen del tumor utilizando la fórmula  $\frac{1}{2} (a \times b^2)$ ; en la que a = longitud y b = anchura. Los datos se expresan como media y media  $\pm$  E.T.M. (error típico de la media). Las medias de los grupos se compararon utilizando la prueba de la t de Student bilateral para muestras no relacionadas. Los valores de probabilidad (p) de <0,05 se interpretaron como significativamente diferentes. El día 19, los ratones con un volumen de tumor promedio de 44 mm<sup>3</sup> se distribuyeron al azar en dos grupos de 10 animales cada uno. A los animales se les inyectó el anticuerpo de control o el anticuerpo de IgG 18R5 (10 mg/kg). La administración de los anticuerpos se realizó por inyección en la cavidad intraperitoneal, dos veces a la semana. El tratamiento con el anticuerpo 18R5 anuló completamente el crecimiento tumoral en comparación con tumores tratados con anticuerpo de control (Figura 10; p = 0,002).

##### 25 Reducción de crecimiento de tumor de xenoinjerto OMP-C28 por tratamiento combinado de 18R5 e irinotecán

30 En otra realización se analizaron anticuerpos anti FZD para determinar su capacidad para reducir el crecimiento de xenoinjertos de tumor de colon OMP-C28. Células OMP-C28 humanas disociadas (10.000 por animal) se inyectaron por vía subcutánea a ratones NOD/SCID macho de 6-8 semanas de vida. Semanalmente, se controló el crecimiento tumoral y se iniciaron mediciones tumorales una vez que los tumores eran palpables. El día 24, los ratones con un volumen de tumor promedio de 129 mm<sup>3</sup> se distribuyeron al azar en 4 grupos de 10 animales cada uno. A los animales se les inyectó anticuerpo de control o anticuerpo de IgG 18R5 (10 mg/kg) o irinotecán (7,5 mg/kg) o una combinación tanto de 18R5 como de irinotecán. La administración de los anticuerpos e irinotecán se realizó por inyección en la cavidad intraperitoneal, dos veces a la semana. Los tumores se midieron dos veces a la semana y se determinó el volumen del tumor utilizando la fórmula  $\frac{1}{2} (a \times b^2)$ ; en la que a = longitud y b = anchura. Los datos se expresan como media y media  $\pm$  E.T.M. (error típico de la media). Las medias de los grupos se compararon utilizando la prueba de la t de Student bilateral para muestras no relacionadas. Los valores de probabilidad (p) de <0,05 se interpretaron como significativamente diferentes. El tratamiento con 18R5 produjo una reducción del 40 % en el crecimiento tumoral, como se muestra en la Figura 11 (p = 0,02). Además, el tratamiento con 18R5 e irinotecán produjo una reducción en el crecimiento tumoral del 53 % en relación al tratamiento solo con irinotecán (p = 0,0002 vs. solo irinotecán) (Figura 11). Por tanto, 18R5 demuestra actividad de crecimiento antitumoral en el modelo de tumor de colon OMP-C28 como un agente único, así como en combinación con irinotecán.

##### 45 Reducción de crecimiento de tumor de xenoinjerto OMP-Pn4 por tratamiento combinado de 18R5 y gemcitabina

50 En otra realización, se analizaron anticuerpos anti FZD para determinar su capacidad para reducir el crecimiento de xenoinjertos de tumor pancreático OMP-Pn4. Se adquirieron ratones NOD/SCID de Harán (Indianápolis, Indiana) y antes de realizar los estudios, se permitió que se aclimataran durante varios días. Anteriormente se ha descrito el establecimiento y la caracterización de modelos de xenoinjerto de páncreas generados *in vivo* por células madre cancerosas (Li et al., *Cáncer res.*, 67:1030-7, 2007). Para estudios de eficacia, células tumorales pancreáticas humanas OMP-Pn4 se disociaron en suspensiones de células sueltas, se resuspendieron en una mezcla 1:1 (v/v) de tampón FACS (solución salina equilibrada de Hank [HBSS, por sus siglas en inglés *Hank's balanced salt solution*] complementada con suero bovino fetal termoinactivado al 2 % y Hepes 20 mM) y Matrigel (BD Bioscience, San José, CA) y con una aguja de calibre 25, que contenía 50.000 células/100 µl, se implantaron por vía subcutánea en la región del costado derecho de ratones NOD/SCID macho de 6-7 semanas de vida. El crecimiento del tumor se controló semanalmente y las mediciones tumorales se iniciaron una vez que los tumores eran palpables. El día 36, los volúmenes tumorales medios alcanzaron aproximadamente 120 mm<sup>3</sup> y los animales portadores del tumor se distribuyeron al azar (4 grupos de 9 por grupo). El tratamiento se inició dos días después. A los animales se les inyectó anticuerpo de control, anticuerpo de IgG 18R5 (10 mg/kg), gemcitabina (40 mg/kg) o una combinación de anticuerpo de IgG 18R5 y gemcitabina. La administración de los anticuerpos y/o gemcitabina se realizó por inyección en la cavidad intraperitoneal, una vez a la semana. Con un calibrador electrónico (Coast Tools Company, San Leandro, CA) se midió el crecimiento tumoral. Los tumores se midieron una vez a la semana y el volumen tumoral se determinó utilizando la fórmula  $\frac{1}{2} (a \times b^2)$ ; en la que a = longitud (eje más largo del tumor) y b = anchura (eje más corto del tumor). Los animales se pesaban todos los días si mostraban una pérdida de peso corporal mayor de 15 % y se sacrificaban si mostraban un peso corporal de 20 %. Los datos se expresan como media  $\pm$  E.T.M. Las

diferencias en la media de valores entre los grupos se analizaron mediante un ensayo *t* no paramétrico. Para las comparaciones múltiples se utilizó ensayo ANOVA unilateral con comparación de ensayo *t* a *posteriori*. Las diferencias de  $p < 0,05$  se consideraron significativamente diferentes. El programa informático para el análisis estadístico fue GraphPad Prism4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Al final del estudio los ratones se

5 sacrificaron utilizando una cámara de  $\text{CO}_2$  seguido de luxación cervical. Los tumores se extirparon para su análisis de ARN e histológico. Los tumores restantes se transfirieron a medio 199 enfriado para su procesamiento en suspensiones de células sueltas para el análisis de la frecuencia de células madre cancerosas.

10 En la Figura 12 se muestran los resultados del estudio del xenoinjerto OMP-Pn4. En este experimento, el tratamiento con el anticuerpo 18R5, como tratamiento único, no produjo ninguna reducción significativa en el crecimiento tumoral. No obstante, el tratamiento con 18R5 y gemcitabina produjo una reducción de 42 % en el crecimiento tumoral con respecto al tratamiento con gemcitabina (Figura 12;  $p = <0,001$  versus solo gemcitabina). Por tanto, 18R5 demostró una actividad de crecimiento antitumoral sinérgica en el modelo de tumor pancreático OMP-Pn4 en combinación con gemcitabina, un agente quimioterapéutico de referencia aprobado.

15 *Reducción de crecimiento tumoral de mama PE-13 por tratamiento combinado con 18R5 y paclitaxel*

20 Se implantaron 10.000 células de tumor de mama humano PE-13 (HER2 negativo) en ratones NOD-SCID y se dejaron crecer durante 22 días hasta que se alcanzó un volumen promedio de aproximadamente  $120 \text{ mm}^3$ . Después, los animales se distribuyeron al azar en 4 grupos de 10 animales cada uno y recibieron dosis de un anticuerpo de control, anti FZD 18R5, paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>) o 18R5 más paclitaxel. La Figura 37 muestra el promedio de los volúmenes tumorales de ratones dosificados con anticuerpo de control, anti FZD 18R5, paclitaxel o 18R5 y paclitaxel. Los anticuerpos se administraron a una dosis de 10 mg/kg, por vía IP, dos veces a la semana. El paclitaxel se administró a una dosis de 10 mg/kg, IP, una vez a la semana. Los tumores se midieron los días indicados en la Figura 37. La Figura 38 muestra el crecimiento tumoral de los animales individuales en el grupo tratado con 18R5 y paclitaxel. Se observó que el tratamiento con 18R5 y paclitaxel producía una actividad antitumoral y regresión de los tumores de mama establecidos.

**Ejemplo 8**

30 Análisis para determinar el efecto sobre la frecuencia de células madre cancerosas

35 Se pueden utilizar ensayos de dilución limitante (LDA, por sus siglas en inglés *Limiting dilution assays*) para determinar el efecto de un agente o anticuerpo de unión a FZD sobre células madre cancerosas de tumor sólido y sobre la tumorigenidad de un tumor que comprende las células madre cancerosas. Los ensayos se pueden utilizar para determinar la frecuencia de células madre cancerosas en tumores de animales tratados con el anticuerpo de unión a FZD u otro agente y comparar esa frecuencia con la frecuencia de células madre cancerosas en tumores de animales de control.

40 *Efecto del tratamiento combinado de 18R5 e irinotecán sobre células madre cancerosas en tumores OMP-C28*

45 Al final del estudio (día 48) se trajeron tumores de control y tratados del estudio de xenoinjerto OMP-C28 descrito anteriormente (ejemplo 7). Los tumores se procesaron y se disociaron en células sueltas. Las células tumorales se incubaron después con anticuerpos de ratón biotinilados ( $\alpha$  CD45 de ratón-biotina, dilución 1:200 y ( $\alpha$  H2Kd de ratón de rata-biotina, dilución 1:100, BioLegend, San Diego, CA) en hielo durante 30 min seguido de la adición de esferas magnéticas marcadas con estreptavidina (Invitrogen, Carlsbad, CA) para eliminar con un imán las células de ratón.

50 Para la LDA, se recogieron células humanas en la suspensión, se contaron y las dosis de células apropiadas (5, 25 y 125 células) en tampón FACS se mezclaron en una mezcla 1:1 con Matrigel y se inyectaron por vía subcutánea a ratones NOD/SCID (10 ratones por dosis de célula por grupo de tratamiento). Se permitió que los tumores crecieran hasta los 4 meses. En el momento deseado, se determinó el porcentaje de ratones con tumores detectables en todos los grupos inyectados con células tumorales tratadas con el anticuerpo anti FZD y se comparó con el porcentaje de ratones con tumores detectables en los controles. Por ejemplo, el número de ratones inyectados con 125 células tumorales tratadas con control que presentaron tumores detectables se determinó y se comparó con el número de ratones inyectados con 125 células tumorales tratadas con anticuerpo FZD que presentaban tumores detectables. Después se calculó la frecuencia de células madre cancerosas utilizando el programa informático L-CalcTM (StemCell Technologies Inc.). Resumiendo, basándose en datos estadísticos de Poisson, si el 37 % de los animales no desarrollan tumores, existe exactamente una célula madre cancerosa entre el número conocido de células inyectadas.

60 Para análisis de marcadores de superficie celular, la suspensión de células tumorales disociadas se tiñó con anticuerpos anti ESA (Biomedica) y anti CD44 (BD Biosciences) que se conjugaron directamente con fluorocromos. Las células muertas se excluyeron utilizando el colorante de viabilidad DAPI. Se realizó citometría de flujo utilizando un FACS Aria (Becton Dickinson). Para eliminar grumos de células se utilizan perfiles de dispersión lateral y directa. 65 El análisis de los tumores tratados con anticuerpo de control mostró que el 64 % del volumen de la población tumoral expresaba tanto ESA como CD44 a niveles altos (Figura 39). La población doble positiva no se vio significativamente

afectada por el tratamiento con irinotecán solo (55 %), como se muestra en la Figura 39, pero el tratamiento bien con 18R5 o con la combinación de 18R5 con irinotecán redujo la población doble positiva (40 % y 32 %, respectivamente).

5 *Efecto del tratamiento combinado de 18R5 y gemcitabina en células madre cancerosas sobre tumores OMP-Pn4*

Se extrajeron tumores de control y tratados del estudio de xenoinjerto OMP-Pn4 descrito anteriormente (Ejemplo 7) al final de 41 días de tratamiento. Los tumores se procesaron y disociaron en células disociadas. Las células tumorales se incubaron después con anticuerpos de ratón biotinilados ( $\alpha$ -CD45 de ratón-biotina, dilución a 1:200 y rata  $\alpha$ -H2Kd de ratón-biotina, dilución a 1:100, BioLegend, San Diego, CA) en hielo durante 30 min seguido de la adición de esferas magnéticas marcadas con estreptavidina (Invitrogen, Carlsbad, CA) para eliminar las células de ratón. Las células humanas que quedaban en la suspensión se recogieron, se contaron y se diluyeron a las dosis de célula apropiadas (30, 90, 270 y 810 células), se mezclaron en la mezcla de tampón FACS 1:1 (v/v) y Matrigel y se inyectaron por vía subcutánea a ratones NOD/SCID (10 ratones por dosis de células por grupo de tratamiento). Se permitió que los tumores crecieran durante 75 días como se muestra en la Figura 40. Cada punto en la Figura 40 representa el volumen del tumor de un ratón individual. Se determinó el porcentaje de ratones con tumores detectables en todos los grupos inyectados con células tumorales tratadas con anticuerpo anti FZD y se comparó con el porcentaje de ratones con tumores detectables en los controles. Por ejemplo, el número de ratones inyectados con 810 células tumorales tratadas con control que tenían tumores detectables se determinó y se comparó con el número de ratones inyectados con 810 células tumorales tratadas con anticuerpo FZD que tenían tumores detectables. Se utilizó la frecuencia de crecimiento tumoral para calcular la frecuencia de células madre cancerosas utilizando el programa informático L-CalcTM. Las frecuencias de células madre cancerosas calculadas para cada uno de los grupos de tratamiento se muestran en la Figura 41. El tratamiento con 18R5 solo y el tratamiento con 18R5 combinado con gemcitabina redujeron la frecuencia de células madre cancerosas, mientras que el tratamiento con gemcitabina sola no tuvo ningún efecto.

**Ejemplo 9**

30 Producción de anticuerpos FZD

*Producción de antígenos*

35 Los fragmentos de polipéptidos recombinantes del dominio extracelular (DEC) o del dominio Fri (Fri) de los receptores FZD humanos (FZD) se generaron como antígenos para la producción de anticuerpos. Se utilizó la tecnología de ADN recombinante estándar para aislar polinucleótidos que codifican los aminoácidos de estos dominios del receptor o receptores frizzled humanos deseados. Estos polinucleótidos se ligaron en marco en el extremo N ya sea a la etiqueta Fc humana o a la etiqueta de histidina y se clonaron en un vector de transferencia plasmídico para la expresión mediada por baculovirus en células de insecto. La transfección estándar, la infección y los protocolos de cultivo celular se utilizan para producir células de insecto recombinantes que expresan los polipéptidos FZD correspondientes (O'Reilley et al., Báculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)).

40 La proteína antigénica se purifica del medio acondicionado de células de insecto utilizando proteína A y cromatografía de afinidad con  $\text{Ni}^{++}$ -quelato. La proteína antigénica purificada se dializa contra PBS (pH = 7), se concentra aproximadamente 1 mg/ml y se esteriliza por filtración en la preparación para la inmunización.

*Inmunización*

50 Se inmuniza a los ratones con la proteína antigénica FZD purificada utilizando técnicas estándar. La sangre de ratones individuales se explora aproximadamente 70 días después de la inmunización inicial para el reconocimiento antigénico utilizando análisis de ELISA y FACS (descrito detalladamente más adelante). Los dos animales con los títulos más altos de anticuerpo se seleccionan para el refuerzo final con antígeno, después de lo cual se aíslan esplenocitos para la producción del hibridoma. Las células del hibridoma se siembran en placa a 1 célula por pocillo en placas de 96 pocillos y el sobrenadante de cada pocillo se explora mediante ELISA y análisis FACS contra la proteína antigénica. Se seleccionan varios hibridomas con alto título de anticuerpo y se mejoran en un cultivo de matraz estático. Los anticuerpos se purifican del sobrenadante de hibridoma utilizando cromatografía en agarosa con proteína A o proteína G. Los anticuerpos monoclonales purificados se someten nuevamente a ensayo con FACS y se determina el isotipo para seleccionar los anticuerpos de IgG e IgM.

60 *Mapeo epítópico*

65 Para identificar anticuerpos que reconocen regiones específicas del dominio de FZD extracelular, que incluyen el dominio rico en cisteína, se realiza un mapeo epítópico. Los vectores de expresión plasmídicos de mamífero que comprenden un promotor de CMV hacia el extremo 5' de los polinucleótidos que codifican fragmentos del dominio de FZD extracelular se generan utilizando tecnología de ADN recombinante estándar. Las proteínas recombinantes después se expresan en células de mamífero cultivadas por transfección transitoria. Veinticuatro a 48 horas después

de la transfección, las células se recogen y las proteínas resultantes del lisado celular se separan en geles de acrilamida de SDS-PAGE para transferencia Western utilizando anticuerpos de ratones inmunizados con antígeno FZD. Los anticuerpos que reconocen el dominio de unión a ligando de FZD se pueden analizar adicionalmente por ELISA para determinar la unión competitiva con proteínas Wnt.

- 5 Para identificar epítopos específicos dentro de los dominios extracelulares reconocidos por un anticuerpo contra FZD, se utiliza el sistema SPOT (sigma Genosys, The Woodlands, TX). Una serie de péptidos lineales de 10 restos que se superponen por un aminoácido y que abarcan la totalidad del dominio de FZD extracelular se sintetizan y se unen de manera covalente con una membrana de celulosa por la técnica de síntesis SPOT. La membrana se 10 preincuba durante 8 horas a temperatura ambiente con tampón de bloqueo y se hibrida con anticuerpo durante la noche a 4 °C. Después, la membrana se lava, 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 revelado de señal que contiene 3-amino-9-etylcarbazol. De esta manera se determinan los epítopos específicos 15 reconocidos por un anticuerpo.

15 *Análisis FACS*

Para seleccionar los anticuerpos monoclonales producidos por clones de hibridomas que reconocen la proteína FZD en la superficie celular nativa, se utiliza el análisis FACS. Se transfecan células HEK293 con un vector de expresión 20 que codifica un clon de ADNc de longitud completa del FZD correspondiente, ya sea solo o cotransfectado con un vector que expresa GFP. Se puede introducir una etiqueta epítópica Flag en el extremo amino terminal, lo que permite verificar la expresión de los receptores FZD etiquetados sobre la superficie celular. Veinticuatro a 48 horas después de la transfección se recogen las células en suspensión y se incuban en hielo con anticuerpos anti FZD, anticuerpos FLAG, suero inmunitario (para células que expresan FZD5) o IgG de control para detectar la unión de fondo del anticuerpo. Las células se lavan y los anticuerpos primarios se detectan con anticuerpos secundarios anti ratón conjugados con un cromóforo fluorescente. Las células marcadas se clasifican después por FACS para 25 identificar anticuerpos anti FZD que reconocen específicamente la expresión del receptor FZD correspondiente en la superficie celular. Se identifican anticuerpos que reconocen uno o varios de los receptores frizzled humanos deseados.

30 *Anticuerpos quiméricos*

Después de que se identifican los anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente un receptor FZD, estos 35 anticuerpos se modifican para superar la respuesta inmunitaria de anticuerpo humano anti ratón (HAMA, por sus siglas en inglés *human anti-mouse antibody*) cuando como agentes terapéuticos se utilizan anticuerpos de roedor. Las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal seleccionado se aislan por RT-PCR de células de hibridoma y se ligan en marco a las regiones constantes de la cadena pesada de IgG1 humana y cadena ligera kappa, respectivamente, en vectores de expresión de mamífero. De manera alternativa, se 40 utiliza un vector de expresión de Ig humana, tal como TCAE 5.3, que contiene los genes de la región constante de cadena pesada de IgG1 humana y cadena ligera kappa en el mismo plásmido (Preston et al., 1998, *Infection & Immunity* 66: 4137-42). Los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera quiméricas se cotransfectan después 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 las de los anticuerpos murinos 45 precursores mediante ELISA y FACS.

45 *Anticuerpos humanizados*

Dado que las sustancias terapéuticas de anticuerpos quiméricos con frecuencia siguen siendo antígenicas, la 50 producción de una respuesta inmunitaria de anticuerpo humano antiquimérico (HACA, por sus siglas en inglés *human anti-chimeric antibody*), los anticuerpos quiméricos contra un receptor FZD pueden experimentar humanización adicional. Para generar anticuerpos humanizados, los aspectos clave de los motivos determinantes de especificidad del anticuerpo, que incluyen posiblemente elementos tanto de las tres secuencias hipervariables cortas, o regiones determinantes de complementariedad (las CDR) y/o como de las regiones estructurales necesarias para colocar correctamente las regiones CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera de los 55 anticuerpos descritos anteriormente, se modifican por ingeniería genética utilizando tecnología de ADN recombinante en las secuencias de ADN de línea germinal de los genes de anticuerpos de cadena pesada y ligera humanas, respectivamente, y después se clonian en un vector de expresión de mamífero para su expresión en células CHO. La inmunorreactividad y afinidad de los anticuerpos humanizados se comparan con las de los 60 anticuerpos quiméricos precursores mediante ELISA y FACS. Adicionalmente, para optimizar la especificidad, afinidad, etc. del anticuerpo humanizado, se puede utilizar mutagénesis dirigida a sitio o de alta densidad de la región variable.

*Anticuerpos humanos*

65 En algunas realizaciones, los anticuerpo humanos que reconocen específicamente el dominio extracelular de un receptor FZD se aislan utilizando tecnología de presentación en fago. Se explora una biblioteca de anticuerpos de

presentación en fago que contiene dominios variables de anticuerpo humano presentados como dominios Fv de cadena única o como dominios Fab, para el reconocimiento específico y de alta afinidad de un antígeno de receptores FZD descrito anteriormente. Después, las secuencias de anticuerpo de dominio variable identificadas, se reformatean en un vector de expresión de Ig que contiene la cadena pesada y la cadena ligera kappa de la IgG1 humana para la expresión de anticuerpos humanos en células CHO.

**Ejemplo 10**

Producción de anticuerpos que reconocen epítopos específicos

10 *Anticuerpos monoclonales de hibridomas*

En determinadas realizaciones, los anticuerpos que reconocen epítopos funcionales de receptores FZD se generan inmunizando ratones con uno o más de los antígenos de receptores FZD. Los ratones se inmunizan con la proteína antígenica de FZD purificada utilizando técnicas estándar. En determinadas realizaciones, los ratones se inmunizan secuencialmente con distintos antígenos de receptores FZD. La sangre de ratones individuales se explora aproximadamente 70 días después de la inmunización inicial. Se seleccionan animales que tienen el título de anticuerpo alto para el antígeno FZD para refuerzo final con antígeno, después de lo cual se aíslan esplenocitos para la producción de hibridoma. Las células de hibridoma se siembran en placas a 1 célula por pocillo en placas de 96 pocillos y los sobrenadantes de cada pocillo se exploran por ELISA y análisis de citometría de flujo. Para identificar anticuerpos monoclonales que reconocen epítopos específicos, incluidos los epítopos dentro del sitio de unión biológica (SUB), o que se superponen con este, el sobrenadante de hibridoma se explora para determinar tanto la unión del anticuerpo con uno o más FZD deseados, como la no unión con FZD que tiene sustituciones de aminoácidos específicas dentro del epítopo específico deseado (por ejemplo, el SUB).

25 *Anticuerpos Humanos*

Para identificar anticuerpos que reconocen los epítopos deseados de los receptores FZD (por ejemplo, epítopos comunes a FZD múltiples y/o epítopos dentro del SUB, o que se superponen con este o con una parte del mismo) se puede utilizar una fagoteca de presentación. Por ejemplo, el dominio Fri de un FZD seleccionado se expresa como proteína recombinante y se aplica sobre una superficie apropiada a 10 µg/ml. Después, se selecciona una fagoteca humana a través de dos o más rondas de enriquecimiento (véase, por ejemplo Griffiths et al., *EMBO J.* 12: 715-34). Opcionalmente, pueden realizarse rondas de selección posteriores utilizando distintas proteínas FZD. Opcionalmente, cada ronda de selección se puede realizar en presencia de proteína FZD soluble de señuelo que contiene sustituciones de aminoácidos específicas dentro de la región epítópica diana deseada (por ejemplo, que incluye los epítopos dentro del sitio de unión biológica (SUB)). Los clones individuales del resultado de las selecciones de selección se exploran después para determinar la capacidad de unirse a una o varias de las proteínas FZD deseadas por ELISA o análisis de citometría de flujo y la unión a un epítopo deseado se evalúa por la falta de unión a la proteína FZD que contiene sustituciones de aminoácidos específicas dentro del epítopo diana deseado. Los genes que codifican el dominio de unión a antígeno se recuperan después del fago y se utilizan para construir una molécula completa de anticuerpo humano uniendo el dominio de unión a antígeno con las regiones constantes para su expresión en una línea celular hospedadora adecuada. Los anticuerpos se identifican y se someten a ensayo para determinar la capacidad de impedir el crecimiento de células tumorales, como se describe en cualquier otra parte de este documento.

45 **Ejemplo 11**

Análisis adicionales *in vitro* para evaluar anticuerpos contra un receptor FZD

50 Este ejemplo describe análisis representativos *in vitro* para ensayar la actividad de anticuerpos generados contra un receptor FZD sobre la proliferación, activación de la vía y citotoxicidad celular.

*Análisis de Proliferación*

55 La expresión de un receptor FZD por diferentes líneas celulares de cáncer se cuantifica utilizando análisis Taqman. Las líneas celulares identificadas que expresan un receptor FZD se siembran en placa a una densidad de  $10^4$  células por pocillo, en microplacas de cultivo tisular de 96 pocillos y se permite su propagación durante 24 horas. Posteriormente, las células se cultivan durante 12 horas más en DMEM reciente con FCS al 2 %, momento en el cual se añaden al medio de cultivo anticuerpos anti FZD frente a anticuerpos de control en presencia de BrdU 10 µmol/l. Después del marcado con BrdU, el medio de cultivo se retira y las células se fijan a temperatura ambiente durante 30 minutos en etanol y se hacen reaccionar durante 90 minutos con anticuerpo monoclonal anti BrdU conjugado con peroxidasa (fragmentos de Fab, clon BMG 6H8). El sustrato se revela en una solución que contiene tetrametilbencidina y se detiene después de 15 minutos con 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mol/l. La reacción de color se mide con un lector de placa ELISA automático utilizando un filtro de 450 nm (lector de microplaca UV; 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.

*Análisis de activación de la vía*

En determinadas realizaciones, la capacidad de los anticuerpos contra un receptor de FZD para bloquear la activación de la vía de señalización Wnt se determina *in vitro*. Por ejemplo, células HEK293 cultivadas en DMEM complementado con antibióticos y con FCS al 10 %, se cotransfectan con 1) vectores de expresión de Wnt7B y FZD10 para activar la vía de señalización Wnt; 2) un vector indicador de TCF/Luc natural o mutante que contiene tres u ocho copias del dominio de unión a TCF hacia el extremo 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 de luciferasa de *Renilla* (Promega; Madison, WI) como un control interno para determinar eficiencia de la transfección. Despues, anticuerpos anti FZD10 y de control se añaden al medio de cultivo celular. Cuarenta y ocho despues de la transfección, los niveles de luciferasa se miden utilizando un kit de análisis de luciferasa doble (Promega; Madison, WI) con la actividad de la luciferasa de luciérnaga normalizada a la actividad de luciferasa de *Renilla*. Se realizan por triplicado tres experimentos independientes. De esta manera, se determina la capacidad de los anticuerpos anti FZD para inhibir la activación de la vía Wnt.

*Análisis de citotoxicidad dependiente del complemento*

En determinadas realizaciones, para medir la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) mediada por un anticuerpo contra un receptor FZD, se utilizan las líneas celulares de cáncer que expresan un receptor FZD o células madre cancerosas aisladas de una muestra de un paciente sometidas a pases como un xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos. Las células se suspenden en 200 µl de medio de cultivo RPMI 1640 complementado con antibióticos y FBS al 5 %, a  $10^6$  células/ml. Despues, las células suspendidas se mezclan con 200 µl de suero o de suero termoinactivado con anticuerpos contra un receptor FZD o anticuerpos control, por triplicado. Las mezclas celulares se incuban durante 1 a 4 horas a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Despues, las células tratadas se recogen, se resuspenden en anexina V 100 µl marcada con FITC diluida en medio de cultivo y se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añaden 100 µl de una solución de yoduro de propidio (25 µg/ml) diluida en HBSS y se incuba 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 totales de células y la absorción de yoduro de propidio por células muertas como un porcentaje de los números de células totales, se utiliza para medir la muerte celular en presencia de suero y anticuerpos contra un FZD en comparación con suero termoinactivado y anticuerpos de control. De esta manera se determina la capacidad de los anticuerpos anti FZD para mediar la citotoxicidad dependiente del complemento.

*Análisis de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo*

Para medir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), mediada por un anticuerpo contra un receptor FZD, pueden utilizarse líneas celulares de cáncer que expresan un receptor FZD o células madre cancerosas aisladas de una muestra de un paciente sometidas a pases como un xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos. Las células se suspenden en 200 µl de medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo de fenol, complementado con antibióticos y FBS al 5 % a  $10^6$  células/ml. Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se aíslan de sangre periférica heparinizada por centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll-Paque para su uso como células efectoras. Despues, se mezclan células diana (D) con células PBMC efectoras (E) a relaciones de E/D de 25:1, 10:1 y 5:1 en placas de 96 pocillos en presencia de al menos un anticuerpo anti receptor FZD o un anticuerpo de control. Los controles incluyen la incubación de células diana solas y de células efectoras solas 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 %. Despues, la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada, una enzima citosólica estable liberada despues de la lisis celular, se mide mediante un análisis colorimétrico (análisis de citotoxicidad no radioactiva CytoTox96; Promega; Madison, WI). Con un lector de placa de 96 pocillos estándar se recogen los datos de absorbancia a 490 nm y se corrige el fondo. Se calcula el porcentaje de citotoxicidad específica de acuerdo con la fórmula: % de citotoxicidad = 100 x (liberación experimental de LDH - liberación espontánea de LDH efectora - liberación diana de LDH espontánea)/(liberación máxima diana de LDH - liberación diana de LDH espontánea). De esta manera se determina la capacidad de los anticuerpos contra un receptor FZD para mediar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

**Ejemplo 12***Prevención *in vivo* de crecimiento tumoral utilizando anticuerpos anti receptores FZD*

Este ejemplo describe el uso de anticuerpos anti receptores FZD para prevenir el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto. En determinadas realizaciones, las células tumorales de una muestra de un paciente (biopsia de tumor sólido o derrame pleural) que se han sometido a pasajes como un xenoinjerto en ratones, se preparan para someterlas de nuevo a pases en animales experimentales. Se retira el tejido tumoral en condiciones estériles, se corta en trozos pequeños, se tritura completamente utilizando cuchillas estériles y se obtienen suspensiones de células disociadas por digestión enzimática y rotura mecánica. Específicamente, células de derrame pleural o trozos de tumor 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 pipeteando de arriba a abajo con una pipeta de 10 ml cada 15-20

minutos. Las células digeridas se filtran a través de una malla de nylon de 45  $\mu\text{M}$ , se lavan con RPMI/FBS al 20 % y se lavan dos veces con HBSS. Después, las células tumorales disociadas se inyectan por vía subcutánea en los panículos adiposos mamarios de ratones NOD/SCID para inducir el crecimiento tumoral.

- 5 En determinadas realizaciones, las células tumorales disociadas se clasifican primero en células tumorigénicas o no tumorigénicas basándose en marcadores de superficie celular antes de la inyección en animales experimentales. Específicamente, las células tumorales disociadas, como se describe anteriormente, se lavan dos veces con solución salina tamponada con Hepes (HBSS, *Hepes buffered saline solution*) que contiene suero de ternero termoinactivado (HICS, *heat-inactivated calf serum*) al 2 % y se resuspenden a  $10^6$  células por 100  $\mu\text{l}$ . Los 10 anticuerpos se añaden y las células se incuban durante 20 minutos en hielo seguido de dos lavados con HBSS/HICS al 2 %. Los anticuerpos incluyen anti ESA (Biomeda, Foster City, CA), anti CD44, anti CD24, y marcadores de Linaje anti CD2, -CD3, -CD10, -CD16, -CD18, -CD31, y -CD140b (denominados colectivamente Lin; PharMingen, San 15 José, CA). Los anticuerpos se conjugan directamente con fluorocromos para seleccionar de manera positiva o negativa células que expresan estos marcadores. Las células de ratón se eliminan seleccionando contra células H2Kd+ y las células muertas se eliminan utilizando el colorante de viabilidad 7AAD. Se realiza citometría de flujo en un FACSvantage (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Para eliminar grumos de células se utilizan perfiles de dispersión lateral y directa. Después, células tumorigénicas aisladas ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin-, se inyectan por vía subcutánea a ratones NOD/SCID para inducir el crecimiento tumoral.
- 20 Como ejemplo, se analizan anticuerpos anti FZD para determinar su capacidad para reducir el crecimiento de células tumorales. Por vía subcutánea, se inyectan células tumorales disociadas (10.000 por animal) en la región del costado de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de vida. Dos días después de la inyección de las células tumorales, se inyectan a los animales, por vía intraperitoneal (i.p.), 10 mg/kg de cualquiera de los anticuerpos anti FZD, dos veces a la semana. El crecimiento tumoral se controla semanalmente hasta que se detecta el crecimiento, punto 25 después del cual el crecimiento tumoral se mide dos veces a la semana durante un total de 8 semanas. De esta manera se identifican anticuerpos de unión a FZD, que reducen de manera significativa el crecimiento tumoral en comparación con controles inyectados con PBS.

### Ejemplo 13

30 Tratamiento *in vivo* de tumores utilizando anticuerpos anti receptores FZD

Este ejemplo describe el uso de anticuerpos anti receptores FZD para tratar cáncer en un modelo de xenoinjerto. En 35 determinadas realizaciones, las células tumorales de una muestra de un paciente (biopsia de tumor sólido o derrame pleural) que se han sometido a pasajes como un xenoinjerto en ratones, se preparan para someterlas de nuevo a pases en animales experimentales. Se retira el tejido tumoral en condiciones estériles, se corta en trozos pequeños, se tritura completamente utilizando cuchillas estériles y se obtienen suspensiones de células disociadas por digestión enzimática y rotura mecánica. Después, las células tumorales disociadas se inyectan por vía subcutánea en los panículos adiposos mamarios, para tumores mamarios, o en el costado, para tumores no mamarios, de 40 ratones NOD/SCID, para inducir el crecimiento tumoral. De manera alternativa, se aíslan células tumorales tumorigénicas ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin- como se describe anteriormente y se inyectan.

45 Después de la inyección de células tumorales, se controla a los animales para determinar crecimiento del tumor. Una vez que los tumores alcanzan el tamaño promedio de aproximadamente 150 a 200 mm, comienza el tratamiento con los anticuerpos. Cada animal recibe 100  $\mu\text{g}$  de anticuerpos anti receptores FZD o anticuerpos de control por vía i.p. dos a cinco veces a la semana durante un total de 6 semanas. Se determina el tamaño del tumor dos veces a la semana durante estas 6 semanas. De este modo se determina la capacidad de los anticuerpos anti receptores FZD para evitar el crecimiento tumoral adicional o para reducir el tamaño del tumor en comparación con anticuerpos de control.

50 En el punto final del tratamiento con anticuerpos, los tumores se extirpan para análisis adicional. En determinadas realizaciones, una parte del tumor se analiza por inmunofluorescencia para determinar la penetración de los anticuerpos en el tumor y la respuesta del tumor. Una parte de cada tumor extirpado de los ratones tratados con anticuerpos anti receptor FZD y de los tratados con anticuerpo de control, se congela en fresco en nitrógeno líquido, 55 se incluye en O.C.T. y se corta en un criostato en secciones de 10  $\mu\text{m}$  sobre portaobjetos de vidrio. En algunas realizaciones, una parte de cada tumor se fija en formalina, se incluye en parafina y se corta en un microtomo como una sección de 10  $\mu\text{m}$  sobre portaobjetos de vidrio. Las secciones se fijan posteriormente y se incuban con anticuerpos marcados con cromóforo que reconocen específicamente anticuerpos inyectados para detectar los anticuerpos anti receptor FZD o anticuerpos de control presentes en la biopsia de tumor. Además, para determinar 60 los efectos del tratamiento con anticuerpos, por ejemplo, sobre la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la morfología de tumores, se pueden utilizar anticuerpos que detectan tipos diferentes de células tumorales y acumuladas en tumores, 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 proliferantes, análisis TUNEL para detectar 65 células que mueren, anticuerpos anti- $\beta$ -catenina para detectar señalización Wnt y anticuerpos anti fragmento Notch del dominio intracelular (DIC) para detectar señalización Notch.

En determinadas realizaciones, también se evaluó el efecto del tratamiento con anticuerpos anti receptor FZD sobre la expresión genica de células tumorales. Se extrae ARN total de una parte de cada tumor extirpado de ratones tratados con anticuerpo anti FZD o tratados con anticuerpo de control y se utilizó para realizar RT-PCR cuantitativa.

- 5 Los niveles de expresión de los receptores FZD, componentes de la vía de señalización Wnt, incluyen, por ejemplo, Wnt1 y  $\beta$ -catenina, así como marcadores de células madre cancerosas identificados anteriormente (por ejemplo CD44) se analizan en relación al gen constitutivo GAPDH como un control interno. De esta manera se determinan los cambios en la expresión génica de células tumorales después del tratamiento con anticuerpos anti receptor FZD.
- 10 Además, se evaluó el efecto del tratamiento con anticuerpos anti receptor FZD sobre la frecuencia de células madre cancerosas. Las muestras de tumor de ratones tratados con anticuerpos anti FZD frente a anticuerpos de control se cortan en trozos pequeños, se trituran completamente utilizando cuchillas estériles y se obtienen suspensiones de células disociadas por digestión enzimática y rotura mecánica. Las células tumorales disociadas se analizan después por análisis FACS para determinar la presencia de células madre cancerosas tumorigénicas basándose en la expresión de marcadores de células en superficie ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin-, como se describe con detalle anteriormente.

Después, se puede evaluar la tumorigenidad de células aisladas basándose en la expresión de ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin- tras el tratamiento con anticuerpos anti FZD. Las células madre cancerosas ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin-, aisladas de ratones tratados con anticuerpos anti FZD frente a anticuerpos de control, se inyectan de nuevo por vía subcutánea en los panículos adiposos mamarios de ratones NOD/SCID. Despues, basándose en el número de células inyectadas, necesarias para la formación de un tumor consistente, se determinó la tumorigenidad de células madre cancerosas.

## 25 Ejemplo 14

Identificación de una firma de gen Wnt

30 Se llevaron a cabo experimentos para identificar un grupo de genes cuya expresión es específica para la activación de la vía de señalización Wnt en tumores de colon humano.

*Anulación del crecimiento tumoral por sobreexpresión de axina*

35 La axina es un importante regulador de la vía Wnt canónica. Es parte del complejo multiproteico que desencadena la degradación de la  $\beta$ -catenina, manteniendo de esta manera el silencio de la vía en ausencia de Wnt. Este efecto lo invierte Wnt, que retira la axina del complejo de destrucción, lo que permite la traslocación de la  $\beta$ -catenina y la activación mediada por TCF de genes diana específicos. Tanto la sobreexpresión exógena de axina como la expresión de una forma truncada negativa dominante de TCF (DNTCF4) representan medios bien caracterizados para bloquear la vía de señalización Wnt.

40 Se demuestra que la sobreexpresión de axina mediada por lentivirus anula por completo el crecimiento de tumores de mama UM-PE13 y UM-T3, así como el crecimiento de tumores de colon OMP-C11 y OMP-C17 en ratones NOD/SCID. La expresión estable de DNTCF4 en células tumorales UM-T3 tiene el mismo efecto. Considerados en su conjunto, estos datos demuestran que el bloqueo de Wnt intracelular puede afectar de manera negativa al desarrollo de diferentes tipos de tumor, respaldando que la vía Wnt es una diana relevante para el tratamiento de canceres de mama y colon.

50 La vía de señalización Wnt se activa de manera constitutiva en muchos tipos de tumor. En la mayor parte de los tumores de colon esta activación se debe a una mutación de truncamiento de la poliposis adenomatosa colónica (PAC) o a mutaciones de activación de la  $\beta$ -catenina. Dichas mutaciones no se han descrito en otros tejidos, en los que la vía de señalización Wnt se puede activar a través de otro conjunto de mutaciones o de un mecanismo autocrino. En los tumores en los que la vía de señalización Wnt permanece sensible a estímulos autocrinos, el bloqueo de la vía utilizando medios extracelulares, tales como anticuerpos u otros inhibidores de proteína solubles, debe ser factible e incidir sobre el desarrollo del tumor. La identificación de dichos tumores dependientes de Wnt puede ser útil para desarrollar agentes anti Wnt y definir tipos de tumores que se tengan como diana en el entorno clínico.

55 Los datos inmunohistoquímicos muestran que la mayoría de las células tumorales OMP-C11 expresan niveles altos de  $\beta$ -catenina citoplasmática/nuclear, lo que sugiere que la vía de señalización Wnt está activada de manera constitutiva en este tipo de tumor. Esto se confirmó por la detección de niveles altos de  $\beta$ -catenina en células tumorales OMP-C11 por transferencia Western. La combinación de la activación de la vía Wnt y la sensibilidad a la sobreexpresión de axina, hace que las células tumorales OMP-C11 sean un buen tumor en el cual estudiar la regulación de la expresión genica en respuesta a Wnt y el bloqueo de Wnt, y a partir del cual obtener una firma del gen Wnt.

65

*Análisis de micromatriz de expresión genica diferencial en respuesta a la sobreexpresión de axina*

La expresión genica diferencial después de tratamiento de células de tumor de colon OMP-C11 con axina, se determinó por análisis de micromatriz.

- 5 Como fuente de células de tumor de colon, se utilizaron ratones NOD/SCID de los que se extirparon tumores OMP-C11 de colon humano recientes (modelo de tumor de xenoinjerto). Se generaron dos vectores lentivíricos para el suministro de un casete de expresión axina-IRES-GFP constitutivo y un casete de expresión IRES-GFP de control, que se denominaron, LOM91 y LOM92, respectivamente.
- 10 Los tumores OMP-C11 se procesaron a una suspensión de células disociadas y se empobrecieron de células de linaje (lin) de ratón. Las células con empobrecimiento de lin se infectaron con los vectores lentivíricos LOM91 (axina) o LOM92 (control) utilizando una multiplicidad de infección de 2,5 mantenida en cultivo durante 3-4 días y clasificada para expresión de GFP. Se extrajo ARN total de cada muestra de células clasificadas. Los ARN se analizaron en la micromatriz GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, California). Los experimentos se repitieron dos veces.

15 Se generó una firma génica que contenía un conjunto vital de genes regulados por la vía Wnt mediante el análisis de los genes que se expresaron de manera diferencial después del tratamiento con axina y que también mostraron correlación con la expresión de axina2 a través de un conjunto de muestras de tumor de colon normal y maligno. Se 20 identificaron genes del experimento de micromatriz de axina (anteriormente) que mostraron regulación por disminución en respuesta a la sobreexpresión de axina. El límite para esta selección fue la regulación por disminución en 50 % o más en muestras que sobreexpresan axina1, en comparación con muestras de control (la relación log2 de muestras que sobreexpresan axina1 con respecto a muestras de control debe ser de -1 o menor), con un valor de p con la prueba T menor de 0,1. Dado que se sabe que la axina1 es un inhibidor de la vía Wnt, los 25 genes regulados por disminución por sobreexpresión de axina1 serán dianas directas o indirectas de la vía Wnt. Después, esta selección se refinó adicionalmente por identificación de aquellos genes que mostraron una correlación alta (valor de correlación > 0,3) con axina2 entre un conjunto de muestras de tumor maligno de tejido de colon/intestino/otro (232 muestras). Puesto que la axina2 es una diana conocida de Wnt, los genes que muestran un 30 patrón de expresión similar al de la axina2 probablemente también sean dianas de Wnt. Este análisis produce una firma genica para la actividad de la vía Wnt (Tabla 6). Los niveles de expresión de los genes en esta firma se pueden utilizar para determinar si las muestras de tumor individuales o tipos diferentes de tumores muestran pruebas de señalización de vía Wnt alterada.

**Tabla 6. Listado de firma génica de tumores de colon**

35

ID de conjunto de sonda HG_U133_Plus_2	Correlación	relación de logaritmo 2	Símbolo del gen	Descripción
222696_at	1	-1,52705	AXIN2	axina 2 (conductina, axil)
206286_s_at	0,81941	-1,15086	TDGF1	factor 1 de crecimiento derivado de teratocarcinoma
213880_at	0,787599	-3,32482	LGR5	receptor 5 acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina
207217_s_at	0,781543	-1,15534	NOX1	NADPH oxidasa 1
209588_at	0,762464	-1,09556	EPHB2	receptor B2 de EPH
212850_s_at	0,75362	-2,00386	LRP4	proteína 4 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad
205107_s_at	0,744062	-1,01296	EFNA4	efrina-A4
214058_at	0,718735	-1,74381	MYCL1	homólogo 1 de oncogén vírico de mielocitomatosis v-myc, derivado de carcinoma de pulmón (aviar)
209864_at	0,714811	-1,25716	FRAT2	dispuesto frecuentemente en linfomas 2 de linfocitos T avanzados
208121_s_at	0,711694	-1,87702	PTPRO	proteína tirosina fosfatasa, receptor de tipo, O
229376_at	0,711672	-1,73296		etiqueta de secuencia expresada (EST) desconocida
202431_s_at	0,659255	-1,49975	MYC	homólogo del oncogén vírico de mielocitomatosis v-myc (aviar)
212444_at	0,656023	-2,15908	GPCR5A	receptor acoplado a proteína G, familia C, grupo 5, miembro A
222938_x_at	0,654955	-2,43139	ENPP3	pirofosfatasa ectonucleotídica/fosfodiesterasa 3
241607_at	0,640554	-1,00413	LOC730102	proteína hipotética LOC730102
227475_at	0,637963	-3,60987	FOXQ1	caja forkhead Q1

230398_at	0,628654	-1,65124	TNS4	tensina 4
40284_at	0,601382	-1,21862	FOXA2	caja forkhead A2
219704_at	0,557276	-1,33216	YBX2	proteína 2 de unión de caja Y

**Ejemplo 15**

Tratamiento de cáncer humano utilizando anticuerpos anti receptor FZD

- 5 Este ejemplo describe métodos para el tratamiento de cáncer utilizando anticuerpos contra un receptor FZD dirigido a tumores que comprenden células madre cancerosas y/o células tumorales en las que se ha detectado la expresión del receptor FZD y/o células tumorales que tienen una firma génica Wnt que indique que responden a la inhibición de señalización Wnt (por ejemplo, la firma génica Wnt del Ejemplo 14),
- 10 La presencia de un marcador de célula madre cancerosa o de receptor FZD o la expresión de uno o más genes en una firma génica Wnt se puede determinar primero a partir de una biopsia de tumor. Las células tumorales de una biopsia de un paciente a quien se le ha diagnosticado cáncer se extraen en condiciones estériles. En algunas realizaciones, la biopsia de tejido se congela en fresco en nitrógeno líquido, se incluye en O.C.T. y se corta en un criostato en secciones de 10 µm sobre portaobjetos de vidrio. En algunas realizaciones, la biopsia de tejido se fija en formalina, se incluye en parafina y se corta en un microtomo como una sección de 10 µm sobre portaobjetos de vidrio.
- 15 20 Las secciones se incuban con anticuerpos contra un receptor FZD para detectar expresión de proteína FZD. De manera alternativa, las secciones se pueden analizar para determinar la presencia de uno o más genes en la firma génica Wnt como se describe en el Ejemplo 14,
- 25 También se puede determinar la presencia de células madre cancerosas. Las muestras de biopsia de tejido se rompen en trozos pequeños, se Trituran completamente utilizando cuchillas estériles y las células se someten a digestión enzimática y rotura mecánica para obtener una suspensión de células disociadas. Despues, las células tumorales disociadas se incuban con anticuerpos anti ESA, CD44, -CD24, -Lin y -FZD para detectar células madre cancerosas y la presencia de células madre tumorales ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin-, FZD+ se determina por citometría de flujo como se describe con detalle anteriormente.
- 30 35 40 45 Los pacientes con cáncer cuyos tumores se diagnostican como que expresan un receptor FZD y/o uno o más genes en la firma génica Wnt, se tratan con anticuerpos anti receptor FZD. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti receptor FZD monoclonales, humanizados o humanos, generados como se describe anteriormente se purifican y formulan con un vehículo farmacéutico adecuado para inyección. En algunas realizaciones, los pacientes se tratan con 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 determinadas realizaciones, se administran entre aproximadamente 2 a aproximadamente 100 mg/ml de un anticuerpo anti FZD. En algunas realizaciones se administran entre aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mg/ml de anticuerpo anti FZD. El anticuerpo se puede administrar antes, de manera concurrente o después de regímenes de radioterapia estándar o regímenes de quimioterapia utilizando uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como oxaliplatino, fluorouracilo, leucovorina o estreptozocina. Se hace un control de los pacientes para determinar si dicho tratamiento produce una respuesta antitumoral, por ejemplo, basada en regresión de tumor, reducción de las incidencias de tumores nuevos, menor expresión de antígeno tumoral, números disminuidos de células madre cancerosas u otro medio para evaluar el pronóstico de la enfermedad,

**Ejemplo 16**

Diferenciación de células tumorales pancreáticas después del tratamiento con 18R5 y gemcitabina

- 50 *Análisis de expresión génica de células tumorales pancreáticas tratadas por PCR cuantitativa (Q-PCR)*

Tumores de xenoinjerto PN4 tratados con Ab de control, anticuerpo de IgG 18R5, gemcitabina, o la combinación de gemcitabina y anticuerpo de IgG 18R5, como se describe anteriormente (Ejemplo 7), se analizaron para determinar la expresión de cromogranina A (CHGA) por análisis de PCR cuantitativa, la CHGA es muy conocida como marcador de diferenciación neuroendocrina de diversos tumores que incluyen tumores de mama, colon, pulmón y pancreático y se ha descubierto que la expresión elevada de CHGA en tumores pancreáticos se relaciona con supervivencia mejorada (Tezel et al, 2000, Cáncer 89, 2230-6),

60 Se preparó ARN total de 5 tumores de cada grupo en el estudio de xenoinjerto PN4 y se evaluó por transcripción inversa (RT)-PCR de una etapa utilizando sondas registradas de Applied Biosystems Taqman® de acuerdo con protocolos estándar. El conjunto sonda-cebador (Hs00154441\_ml) utilizado para análisis de CHGA incluyó una sonda marcada con colorante FAM y el siguiente cebador: 5'- CGCTCTCCAAGGCGCCAAGGAGAGG-3' (SEQ ID NO: 75), Se utilizó Gus B como un control interno. Resumiendo, se realizó transcripción inversa a 48 °C durante 30

min, desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos y extensión a 60 °C durante 1 minuto y la amplificación/incorporación de las sondas fluorescentes se observó en tiempo real.

- 5 El marcador de células  $\beta$  de islotes, CHGA, solo aumenta significativamente en muestras de ratones tratados con 10 gemcitabina y 18R5. Los tumores de los grupos tratados con Ab de control, 18R5 y gemcitabina solo, expresaron niveles similares de ARN de CHGA, mientras que los tumores del grupo tratado con la combinación mostraron un claro incremento en la expresión de CHGA. Los niveles de CHGA aumentaron 10 y 7 veces en dos experimentos en tumores tratados tanto con 18R5 como con gemcitabina. En la Figura 42 se muestran los resultados de un experimento representativo.

*Análisis de expresión génica de células tumorales pancreáticas tratadas por inmunohistoquímica*

- 15 La expresión aumentada de CHGA también se observó a nivel de proteína por inmunohistoquímica en secciones de tejido preparadas a partir de tumores tratados (datos no mostrados). Los tumores tratados con Ab de control muestran una tinción intensa de un subconjunto pequeño de células dispersadas a través de los tumores. Los tumores tratados con 18R5 solo o gemcitabina sola expresaron CHGA a niveles similares a los de los controles. En cambio, los tumores tratados con la combinación de 18R5 y gemcitabina mostraron un incremento en el número de 20 células positivas a CHGA, lo que concuerda con la expresión aumentada de ARN detectada por Q-PCR.

*Tinción con azul alcián y anticuerpo contra ki67*

- 25 Otra característica de las células endocrinas, secretoras o ductales es la producción de mucina y estas células se detectan por tinción con azul alcián (van Es et al, 2005, *Nature* 435 959-63). Se observó durante la recogida y procesamiento de tumores que los tumores tratados con 18R5 eran mucho más mucinosos que los tumores tratados con anticuerpo de control. Por lo tanto, secciones de tumores PN4 de ratones tratados con anticuerpo de control, únicamente con gemcitabina, únicamente con 18R5 o con 18R5 más gemcitabina, se tiñeron con azul alcián. Los tumores tratados con 18R5 mostraron un claro incremento en la tinción con azul alcián en los grupos tratados tanto 30 con 18R5 solo como con 18R5 más gemcitabina, en relación a los controles y el grupo tratado únicamente con gemcitabina (datos no mostrados).

- 35 También se observó un aumento de células mucinosas en una segunda línea de tumor pancreático, PN13, después del tratamiento con 18R5 o con anticuerpo de control (Figura 43). En este experimento, los ratones portadores de tumores PN13 se trataron como se describe anteriormente (Ejemplo 7). Las secciones de tumores se tiñeron con azul alcián para mostrar células mucinosas y también se tiñeron por inmunohistoquímica con un anticuerpo contra 40 ki67 para mostrar células que experimentan proliferación. Los resultados muestran que el tratamiento con 18R5 produce una gran cantidad de células mucinosas positivas a azul alcián. Adicionalmente, se redujo la frecuencia de células positivas a ki67 por tratamiento con 18R5. De manera interesante, no hubo superposición entre las células mucinosas y las células que eran positivas a ki67, lo que sugiere que las células mucinosas no son proliferativas.

45 Esto proporciona pruebas de que el tratamiento con 18R5 promueve la diferenciación de células tumorales en descendencia no proliferativa,

En resumen, la expresión aumentada de CHGA, la producción aumentada de mucinas, como se pone de manifiesto por la tinción con azul alcián, y la producción de descendencia no proliferativa, como se pone de manifiesto por tinción con el anticuerpo contra ki67, concuerdan con un modelo que, al inhibir la señalización Wnt-FZD con tratamiento con 18R5, promueve la diferenciación de células tumorales pancreáticas hacia múltiples tipos de células distintas con características definitorias de células diferenciadas no proliferativas.

**Ejemplo 17**

- 50 Estudios adicionales de eficacia *in vivo* con 18R5 solo y/o en combinación con otros agentes anticancerosos

*Efecto sobre el crecimiento tumoral de xenoinjerto OMP-LU24*

- 55 Se determinó *in vivo*, la eficacia del anticuerpo 18R5, anti FZD, solo y en combinación con Taxol® (paclitaxel), para inhibir el crecimiento de tumores de pulmón humano OMP-LU24.

60 Por vía subcutánea, se inyectaron 50.000 células de tumor de pulmón humano OMP-LU24, a ratones NOD/SCID. Se permitió que los tumores crecieran durante 27 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 143 mm<sup>3</sup>. Los animales se distribuyeron al azar en 4 grupos (n = 9 por grupo) y se trataron con anticuerpo de control ("Ab de control"), anticuerpo 18R5, anti FZD ("18R5"), Taxol® ("Taxol") o la combinación de 18R5 más Taxol® ("18R5+Taxol"). Se realizaron mediciones del tumor los días indicados en la Figura 44. Los anticuerpos y el Taxol® se administraron por vía intraperitoneal (IP) una vez a la semana, a una dosis de 10 mg/kg y 15 mg/kg, respectivamente.

65 Los resultados se muestran en la Figura 44. Se observó que el tratamiento con anti FZD reduce el crecimiento

tumoral y el tratamiento combinado muestra actividad antitumoral aumentada en relación con Taxol® solo.  
*Efecto sobre el crecimiento tumoral de xenoinjerto OMP-LU33*

5 También se ensayó *in vivo* la eficacia del anticuerpo 18R5, anti FZD, solo y en combinación con Avastin® (bevacizumab) para inhibir el crecimiento de tumores de pulmón humano OMP-LU33.

10 Por vía subcutánea, se inyectaron 10.000 células de tumor de pulmón humano OMP-LU33 a ratones NOD/SCID. Se permitió que los tumores crecieran durante 30 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 124 mm<sup>3</sup>. Los animales se distribuyeron al azar en 4 grupos (n = 10 por grupo) y se trajeron con anticuerpo de control (cuadrados), Avastin® (triángulos que apuntan hacia abajo), anticuerpo 18R5, anti FZD (triángulos que apuntan hacia arriba) o la combinación de 18R5 más Avastin® (círculos). Se realizaron mediciones del tumor los días indicados en la Figura 45. Los anticuerpos se administraron por vía IP, a una dosis de 10 mg/kg, dos veces a la semana.

15 Los resultados se muestran en la Figura 45. Se observó que el tratamiento con anticuerpo anti FZD reduce el crecimiento tumoral y el tratamiento combinado muestra actividad antitumoral aumentada en relación a Avastin® solo.

*Efecto sobre el crecimiento tumoral de xenoinjerto T3*

20 También se determinó *in vivo* la eficacia del anticuerpo 18R5, anti FZD, tanto solo como combinado con Herceptin® (trastuzumab) para inhibir el crecimiento de tumores de mama humanos T3 positivos a HER2.

25 Por vía subcutánea, se inyectaron 50.000 células de tumor de mama humano T3 a ratones NOD/SCID. Se permitió que los tumores crecieran durante 32 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 125 mm<sup>3</sup>. Los animales se distribuyeron al azar en 4 grupos (n = 10 por grupo) y se trajeron con anticuerpo de control (cuadrados), anticuerpo 18R5, anti FZD (triángulos), Herceptin® (círculos negros pequeños) o la combinación de 18R5 más Herceptin® (círculos blancos). Se realizaron mediciones del tumor los días indicados en la Figura 46. Los anticuerpos se administraron por vía IP a una dosis de 10 mg/kg dos veces a la semana.

30 Los resultados se muestran en la Figura 46. El tratamiento de combinación con 18R5 y Herceptin® mostró actividad antitumoral aumentada en relación a Herceptin® solo.

**Ejemplo 18**

35 **Secuencias de los anticuerpos anti FZD**

40 Las CDR de cadena pesada y de cadena ligera de los anticuerpos anti FZD se proporcionan en las Tablas 7 y 8 a continuación, respectivamente. Las regiones variables de cadena pesada (VH, por las siglas *heavy chain variable regions*) y las regiones variables de cadena ligera (VL, por las siglas *light chain variable regions*) de los anticuerpos anti FZD y sus secuencias codificantes se identifican en la Tabla 9 a continuación. Las secuencias de aminoácidos y de polinucleótidos de VH y VL enumeradas en la Tabla 9 se proporcionan en las Figura 13-15 o en las Tablas 10 y 11 a continuación. Las secuencias que codifican las cadenas pesada o ligera de los anticuerpos anti FZD se proporcionan en las Figuras 14-15 o en la Tabla 12 más adelante.

45 Tabla 7. Las CDR de cadena pesada de anticuerpos humanos anti FZD

Anticuerpo(s)	Cadena pesada		
	CDR1	CDR 2	CDR3
18R8	GFTFSHYTLS (SEQ ID NO:1)	VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	NFIKYVFAN (SEQ ID NO:3)
18R5	GFTFSHYTLS (SEQ ID NO:1)	VIS GDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	NFIKYVFAN (SEQ ID NO:3)
18R4605			
18R4805			
44R24	GFTFSSYYIT (SEQ ID NO: 77)	TISYSSSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 78)	SIVFDY (SEQ ID NO: 79)

50 Tabla 8. Las CDR de cadena ligera de anticuerpos humanos anti FZD

Anticuerpo(s)	Cadena ligera		
	CDR1	CDR2	CDR3
18R8	SGDKLGKKYAS (SEQ ID NO: 4)	EKDNRPSG (SEQ ID NO: 5)	SSFAGNSLE (SEQ ID NO: 6)
18R5	SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7)	DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8)	QSYANTSL (SEQ ID NO: 9)
18R4605			

18R4805			
44R24	S GDALGNRYVY (SEQ ID NO: 80)	SG (SEQ ID NO: 81)	GSWDTRPYPKY (SEQ ID NO: 82)

Tabla 9. VH y VL de anticuerpos humanos anti FZD

Anticuerpo(s)	secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH)	secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL)	secuencia codificante de la región variable de cadena pesada (VH)	secuencia codificante de la región variable de cadena ligera (VL)
18R8	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 19
18R8 (optimizada con codones)	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 88
18R5	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
18R5 (optimizada con codones)	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 89
18R4605	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 90
18R4805	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 92
44R24	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 95

Tabla 10. Secuencias de aminoácidos de VH y VL de anti FZD adicionales

SECUENCIA (SEQ ID NO:)
44R24 VH (SEQ ID NO: 85):
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYITWVRQAPGKGLEWVSTISYSSNTYY
ADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIVFDYWGQQGTLTVS S
44R24 VL (SEQ ID NO: 86):
DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDALGNRYVYWYQQKPGQAPVLVIPSGIPERFSGSNS
GNATLTISGTQAEDeadYYCGSWDTRPYPKYVFGGGTAKLTVLG

5

Tabla 11. Secuencias de nucleótidos adicionales que codifican la VH y la VL de anticuerpos anti FZD

SECUENCIA (SEQ ID NO:)
secuencia codificante de VH de 18R5/18R8 (optimizada con codones)(SEQ ID NO: 87):
GAGGTGCAGCTGGTCGAGCTGGCGCGACTGGTGCAGCCTGGCGCTCCCTGAGACTG TCCTGCGCCGCCCTCGGCTTACCTCTCCACTACACCTGTCTGGTGCGCCAGGCA CCAGGGAAAGGGACTGGAGTGGGCTCCGTGATCTCCGGGACGGCTCTACACCTACTAC GCCGACTCCGTGAAGGGCGGTTACCATCTCTCCGACAACCTCAAGAACACCCCTGTAC CTGCAGATGAACCTCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTTACTACTGCGCCCGGAACITC ATCAAGTACGTGTTGCCAACCTGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCCCTC
secuencia codificante de VL de 18R8 (optimizada con codones) (SEQ ID NO: 88):
GACATCGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCGGCTCTGGCCAGACGCCGGATC TCCTGCTCCGGCGACAAGCTGGCAAGAAGTACGCCTCTGGTATCAGCAGAACCTGGA CAGGCCCTGTGCTGGTACGAGAAGGACAACCGCCACCTGACCATCTCCGGCACCCAGGCCAG TTCTCCGGCTCCAACCTCCGGCAACACCGCCACCTGACCATCTCCGGCACCCAGGCCAG GACGAGGCCGACTACTACTGCTCCCTCGCCGGCAACTCCCTGGAAGTGTCCGGCGA GGCACCAAGCTGACCGTGTGGC
secuencia codificante de VL de 18R5 (optimizada con codones) (SEQ ID NO: 89):
GACATCGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCGGCTCTGGCCAGACGCCGGATC TCCTGCTCCGGCGACAACATCGGCAGCTCTACGTGACTGGTATCAGCAGAACCTGGA CAGGCCCTGTGCTGGTACGACAAGTCCAACCGCCCTGGCAGACCCAGGCCAG TTCTCCGGCTCCAACCTCCGGCAACACCGCCACCTGACCATCTCCGGCACCCAGGCCAG GACGAGGCCGACTACTACTGCTCCCTCGCCGGCAACTCCCTGGAAGTGTCCGGCGA GGCACCAAGCTGACCGTGTGGC
secuencia codificante de VL de 18R4605 (SEQ ID NO: 90):

GACATAGAACTAACTCAGCCACCCCTGTTAGCGTTGCACCGGGACAGACGGCACGTATA TCGTGCTCGGGAGACAATATAGGAAGTTCTATGTACATTGGTATCAACAGAAACCTGGT CAAGCACCTGTATTAGTAATCTATGACAAAAGTAACCGACCTCCGGAAATACCTGAGCGT TTCAGTGGTTCGAACACTCCGGAACACTGCAACTTAACTATATCTGGAACTCAGGCGGAG GATGAGGCTGACTACTACTGCCAGAGTTACGCAAACACTCTGTCCCTGGTGTGGCGGC GGAACAAAGTTAACCGTGTGGC
secuencia codificante de VL de 18R4805 (SEQ ID NO: 92):
GACATAGAACTAACTCAGCCGCCGTGTTAGCGTTGCACCGGGACAGACGGCACGTATA TCGTGCTCGGGAGACAATATTGGTTCTTCTATGTACATTGGTATCAACAGAAACCTGGT CAAGCACCTGTATTAGTAATATGACAAAAGTAACCGACCTCCGGAAATACCTGAGCGT TTCAGTGGTTCGAACACTCCGGAACACTGCAACTTAACTATATCTGGAACCGCAGGCGGAG GATGAGGCGGACTACTATTGCCAAAGTTACGCAAACACTCTATCCTTAGTGTGGTGG GGAACAAAGTTAACCGTGTAGGC
secuencia codificante de VH de 44R24 (SEQ ID NO: 94):
GAGGTGCAAGCTGGTGGAGCTGGTGGAGGACTGGTGCAGCCTGGGGCTCCCTGAGACTG TCTTGGCCGCCCTCGGCTTCACCTCTCTTACTACATCACCTGGTGCAGGCCAGGCT CCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCACCATCTCTTACTACCTCCAGCAACACCTACTAC GCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCCTGTAC CTGCAGATGAACCTCCGTGAGGGCCGGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTCCATC GTGTTGCACTACTGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAACCGTGTCTCT
secuencia codificante de VL de 44R24 (SEQ ID NO: 95):
GACATCGAGCTGACCCAGCCTCCCTGCTGCTGGGCCAGACGCCAGGATC TCTTGTCTTGGCCAGCCTCGGCAACAGATACGTGTACTGGTATCAGCAGAACGCCAGGC CAGGCCCTGTGCTGGTGAATCCCTCCGGCATCCCTGAGCGGTTCTCCGGCTCCAACCTCC GGCAACACCGCCACCCCTGACCATCTCTGGCACCCAGGCCAGGACGAGGCCGACTACTAC TGCGGCTCTGGGACACCCGGCCTTACCTAAGTACGTGTCCGGGGAGGCACCAAGCTG ACCGTGTGGG

Tabla 12. Secuencias de nucleótidos adicionales que codifican las cadenas pesadas (HC) o las cadenas ligeras (LC) de anticuerpos de IgG anti FZD (que incluyen secuencias señal)

SECUENCIA (SEQ ID NO:)
secuencia codificante de HC de IgG2 18R5/18R8/18R4605/18R4805 (optimizada con codones) (SEQ ID NO: 96):
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTCTGCTGCTGGTCGCCGCTCCTAGATGGGTGCTGTCCGAG GTGCAGCTGGTGGAGCTGGCGGCCGACTGGTGCAGCCTGGGGCTCCCTGAGACTGTCC TGCGCCGCCCTCGGCTTCACCTCTCCACTACACCCCTGCTGGGTGCAGGCCAGGACCA GGGAAGGGACTGGAGTGGGTCTCGTGTGATCTCCGGCGACGGCTCCTACACCTACTACGCC GACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCTCCCGACAACCTCCAAGAACACCCCTGTACCTG CAGATGAACCTCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGAACCTCATC AAGTACGTGTTGCCAACCTGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAACCGTGTCTCCGGCTCCACC AAGGGCCCTTCCGTGTCCCTCTGGGCCCTTGTGCTCCGGTCCACCTCCGACTCCACCGCC GCTCTGGGCTGCCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACTCT GGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCTGTAC TCCCTGTCCTCCGTGGTGAACAGTGCCTTCCTCCAACCTCCGGCACCCAGACCTACACCTGC AACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAACCGTGGAGCGGAAGTGTGC GTGGAGTGCCTCTTGCCCTGCCCTCTGTGGCTGGTCTAGCGTGTCTCTGGTCCCT CCTAACGCTAACGGACACCCCTGATGATCTCCCGACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGG GACGTGCTCCACGGAGGATCTGAAGTCCAGTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CACAAACGCCAACAGGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTGCACCTCCACCTCCGGGGTGTCC GTGCTGACCGTGGTGCACCGAGGACTGGCTGAACGGCAAGAACATACAAGTGCACCGTCTCC AACAAAGGGCCTGCTGCCCTCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCTCGC GAGCCTCAGGTGTACACCCCTGCCCTCTCGCGAAGAGATGACCAAGAACCAAGGGTGTCC CTGACCTGTCGGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAGTGGAGTCCAC GGCCAGCCTGACAAACAACTACAAGACCAACCCCTCATGCTGGACTCCGACGGCTTTTC TTCCCTGTAACCTCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCC TGCTCCGTGATGCAACGAGGCCCTGACAATCACTACACCCAGAACGTCCTGTCCCTGTCT CCTGGCAAG
secuencia codificante de LC lambda de 18R8 (optimizada con codones) (SEQ ID NO: 97):
ATGGCCTGGGCCCTGCTGCTGACACAGGGCACCGGCTCTGGGCCAC ATCGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCTGTGGCTCCGGCCAGACCGCCGGATCTCC TGCTCCGGCAGAACGCTGGCAAGAAGTACGCCTCTGGTATCAGCAGAACGCTGGACAG GCCCTGCTGGTCACTACGAGAACAGAACCCGGCTAGCGGCATCCCTGAGCGGTTC

TCCGGCTCAAACCTCGGCAACACCGCCACCCCTGACCATCTCCGGCACCCAGGGCCAGGAC  
 GAGGCCGACTACTACTGCTCCTCCTCGCCGGCAACTCCCTGGAAGTGTTCGGCGGAGGC  
 ACCAAGCTGACCGTGTGGCCAGCTTAAGGCCGCTCCTCCGTGACCCCTGTCCCCTCCT  
 TCCTCCGAGGAACCTGCAGGCCAACAAAGGCCACCCCTGGTCTGCCGTGATCTCCGACTTCTAC  
 CCTGGGCCGTGACCGTGGCTGGAAGGCCACTCTCCCTGTGAAGGCCGGCTGGAG  
 ACAACCACCCCTTCCAAGCAGTCCAACAACAAGTACGCCGCCTCCTACCTGTCCCCTG  
 ACCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACCGGTCTACTCTTGCACAGGTACCCACGAGGGCTCC  
 ACCGTGGAAAAGACAGTGGCCCCCACCGAGTGTCC

secuencia codificante de LC de 18R5 (optimizada con codones) (SEQ ID NO: 76):

ATGGCCTGGGCCCTGCTGCTGACCCCTGCTGACACAGGGCACCCGCTTTGGCCGAC  
 ATCGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCCCGTGGCCAGACCGCCGGATCTCC  
 TGCTCCGGCACAACATCGCAGCTCTACGTGCACTGGTATCAGCAGAAACCTGGACAG  
 GCCCTGTGCTGGTATCTACGACAAGTCCAACCGGCCTCCGGCATCCCTGAGCGGTT  
 TCCGGCTCAAACCTCGGCAACACCGCCACCCGTGACCATCTCCGGCACCCAGGGCAGGAC  
 GAGGCCGACTACTACTGCCAGTCTACGCCAACACCCCTGTCCTGGTGTGCGGGCGGA  
 ACAAAAGCTGACCGTGTGGCCAGCTTAAGGCCGCTCCTCCGTGACCCGTGCCCCTCCT  
 TCCTCCGAGGAGCTGCAAGGCCAACAGGCCACCCCTGGTGTGCGCTGATCTCCGACTTCTAC  
 CCTGGCGCTGTGACTGTGGCTTGAAGGCCACTCTCCCTGTGAAGGCCGGCTGGAG  
 ACAACCACCCCTTCCAAGCAGTCCAACAACAAGTACGCCGCCTCCTACCTGTCCCCTG  
 ACCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACCGGTCTACTCTTGCACAGGTGACCCACGAGGGCTCC  
 ACCGTGGAAAAGACAGTGGCACCCACCGAGTGTCC

secuencia codificante de LC de 18R4605 (SEQ ID NO: 83):

ATGGCATGGCATTATTGCTACTTACTCTATTGACGCAAGGAACGGGTTATGGCAGAC  
 ATAGAACTAACTCAGCCACCCCTGTTAGCGTTGACCGGGACAGACGGCACGTATATCG  
 TGCTCGGAGACAATATAGGAAGTCTATGTACATTGGTATCAACAGAAACCTGGTCAA  
 GCACCTGTATTAGTAATCTATGACAAAAGTAACCGACCTCCGGAAATACCTGAGCGTTTC  
 AGTGGTTCGAACCTCGGCAACACTGCAACTTTAATATCTGAAACTCAGGGGGAGGAT  
 GAGGCTGACTACTACTGCCAGAGTTACGCAAACACTCTGTCCTGGTGTGCGGGCGGA  
 ACAAAAGTTAACCGTGTGGCCAGCTTAAGGCCGACCTCGGTGACCCATTCCCTCCT  
 TCATCCGAGGAGCTACAGGCCAACAGGCCACCTTAGTGTGCTTAATCTCCGACTTCTAT  
 CCTGGTGTGTAACGGTAGCGTGGAAAGGCCACTCATGCCGGTGAAGGCCGGTGTGGAG  
 ACAACGACTCCTTCCAAGCAGTCCAACAACAAATACGCCCGTCCCTACCTGTCCCTA  
 ACCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACCGTTCTACTCGTGCACAGGTGACGCACGAGGGTTCA  
 ACGGTGAAAAGACAGTAGCACCTACTGAATGCTCA

secuencia codificante de LC de 18R4805 (SEQ ID NO: 84):

ATGGCATGGCATTATTACTACTTACTCTACTTACGCAAGGAACGGGTTATGGCAGAC  
 ATAGAACTAACTCAGCCGCGTGTGTTAGCGTTGACCGGGACAGACGGCACGTATATCG  
 TGCTCGGAGACAATATTGGTCTTCTATGTACATTGGTATCAACAGAAACCTGGTCAA  
 GCACCTGTATTAGTAATATGACAAAAGTAACCGTCCTCGGGAAATACCTGAGCGTTTC  
 AGTGGTTCGAACCTCGGCAACACTGCAACTTTAATATCTGAAACGCAAGGGGGAGGAT  
 GAGGCGGACTACTATTGCCAACAGTTACGCAAACACTCTATCCTTAGTGTGCGCTAATCTCAGACTTTAT  
 TCATCCGAGGAGCTACAGGCCAACAGGCCACCTTAGTGTGCTTAATCTCAGACTTTAT  
 CCTGGTGTGTAACGGTAGCGTGGAAAGGCCACTCATGCCGGTGAAGGCCGGTGTGGAG  
 ACAACGACTCCTTCCAAGCAGTCCAACAACAAATACGCCCGTCCCTACCTGTCCCTA  
 ACCCTGAGCAGTGGAAAGTCCACCGTTCTACTCGTGCACAGGTACGCACGAGGGTTCA  
 ACGGTGAAAAGACAGTAGCACCTACGGAAATGCTCA

secuencia codificante de HC de 44R24 (SEQ ID NO: 91):

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTCTGCTGCTGGGGCGCTCCTAGATGGGTGCTGTCC  
 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCTGGCGGCTCCCTGAGACTG  
 TCTTGGCCGCCCTCCGGCTCACCTCTCCTACTACATCACCTGGTGCAGGCCAGGCT  
 CCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCACCATCTCCTACTCCTCCAGCAACACCTACTAC  
 GCCGACTCCGTGAAGGGCGGTTACCATCTCCGGACAACACTCCAAGAACACCCCTGTAC  
 CTGCAGATGAACCTCCGTAGGGCCGAGGACACCGCCGTGACTACTGCGCCGGTCCATC

```

GTGTTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCCCTTCCGTGTTCCCTCTG
GCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACCGCCGCTCTGGGCTGCGCTGGTGAAGGAC
TACTTCCCTGAGGCTGTGCTCTGGAAACTCTGGGCGGCTGACCTCTGGCGTGCGAC
ACCTTCCCTGCGGTGCTGCGAGTCCTCCGGCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTGAACCGTG
CCTTCCCTCCTCCTGGGACCCACTTCGGCACCCAGGAACTACACCTGCAAGCTGGACACCAAGCCCTTCCAAAC
ACCAAGGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGTGCGTGGAGTGCCTCCCTTGTGCTGCT
CCTCCCTGTTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCTGTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
ATCTCCCGGACCCCTGAAAGTGAACCTGCGTGGGGAGCTGACCGAGGACGGGACCCCTGAG
GTGCAAGTTCAATTGGTACGGTGGACGGCGTGGAGGTGACACAGCCTAAGGACACCCCTGATG
GAGGAACAGTTCACCTCCACCTTCCGGGGGGTGTCTGTGCTGACCGTGGTGCACCCAGGAC
TGGCTGAAACGGGAAAGAATACAAGTGCACGGTGTCCAACAAAGGGCTGGCTGCCCCCTATC
GAAAAGACCATCTCTAACAGGACAGGGCCAGGCTCGCGAGGCTCAGGTCTACACCCCTGCT
CCTAGCCGGGAGGAAATGACCAAGGAACCCAGGGTGTCCCTGACCTGCTGCTGGTGAAGGGCTTC
TACCCCTCCGATATCGCCGGTGGAGTGGAGTCTAACGGCCAGGCTGAGAACAACTACAAG
ACCACCCCTCTATGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTG
GACAAGTCCCGGTCAGCAGGCAACGTGTCTCCCTGATGCCACGAGGCCCCCTG
CACAACCACTAACCCAGAAGTCCCTGTCCTGGCAAGTGA

```

secuencia codificante de LC de 44R24 (SEC ID NO: 93):

```

ATGGCTGGGCTCTGCTGCTGACACAGGGCACGGCTTGGGCC
GACATCGAGCTGACCCAGCCTCCCTGTGCTGTGGCCAGACGCCAGGATC
TCTTGCTCTGGCGACGCCCTGGCAACAGATACTGTTACTGGTATCAGCAGAACGCCAGGC
CAGGCCCTGTGCTGGTGTCCCTGGCATCCCTGAGCGGTTCTCCGGCTCCAACCTCC
GGCAACACCGCCACCCCTGACCATCTCTGGCACCCAGGCCAGGACGAGGCCAGACTACTAC
TGCAGCTCTGGGACACCCGGCTTACCCCTAACGTTACGTGTTGGAGGCCAGGACAGCTG
ACCGTGTGGGCCCTCCGTGACCCCTGTTCCCTCCATCCTCCGAGGAACACTGCAGGCCAAC
AAGGCCACCCCTGGTGTGCTGATCTCGACTTCTACCCCTGGCGCCGTGACCGTGGCTTGG
AAGGCCAGCTCTAGCCCTGTGAAGGCCGGTGGAGACAACCACCCCTCAAGCAGTCC
AACAAACAAGTACGCCGCCTCCCTAACCTGTCCCTGACCCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCAC
CGGTCCACTCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCTCCACCGTGGAAAAGACCGTGGCCCT
ACCGAGTGTCCCTAG

```

Los plásmidos aislados de *E. coli* que codifican los anticuerpos de IgG, anti FZD, 18R4605 (ATCC, depósito no, PTA-10307), 18R4805 (ATCC, depósito no, PTA-10309) y 44R24 (ATCC, depósito no, PTA-10311) se depositaron en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, Estados Unidos, según las condiciones del tratado de Budapest el 26 de agosto del 2009.

5

### Ejemplo 19

Perfiles de unión de anticuerpos anti FZD

10 Se utilizó el análisis FACS para caracterizar los perfiles de unión a FZD1, 2, 5, 7 y 8 de los anticuerpos monoclonales (mAb) anti FZD.

15 Con un ADN plasmídico que expresaba FZD1, 2, 5, 7 u 8 de longitud completa, se cotransfectaron células HEK293 junto con otro plásmido que expresaba el gen indicador GFP utilizado como un marcador de transfección. Como reactivo de transfección se utilizó Fugene 6 (Roche) según las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se incubaron de veinticuatro a cuarenta y ocho horas a 37 °C y con CO<sub>2</sub> al 5 %. Despues, los mAb anti FZD se diluyeron en un volumen final de 50 µl comenzando con una concentración de 20 µg/ml y se diluyeron en serie en diluciones con factor 4 durante un total de 8 diluciones. Cada grupo de células HEK293, transfectado de manera 20 transitoria con FZD/GFP, se recogió en suspensión y durante 30-60 minutos se incubaron 100.000 células transfectadas en hielo con el mAb anti FZD diluido que se va a ensayar. Las células se lavaron y los anticuerpos anti FZD unidos se detectaron con un anticuerpo secundario anti ser humano conjugado con un cromóforo fluorescente. Las células marcadas se detectaron después y se contaron por análisis FACS. Los datos generados del análisis FACS se expresaron en unidades de intensidad de fluorescencia media (MFI, por sus siglas *Mean Fluorescence Intensity*). Para las representaciones gráficas y analizar los datos se utilizó el programa informático GraphPad Prism. Las MFI se representan gráficamente como una función de la concentración de Ab para establecer curvas de respuesta a la dosis. Para ajustar la curva y calcular las CE<sub>50</sub> se aplicó una regresión no lineal a los números.

25

30 Los perfiles de unión de los mAb 18R5 y 44R24 se determinaron y se compararon. En la Figura 47 se muestra la curva de respuesta a la dosis que representa la unión de cada uno de los mAb 18R5 y 44R24 con Fzd1, 2, 5, 7 y 8. Las CE<sub>50</sub> (nM) calculadas de los dos mAb se muestra en la Tabla 13. El mAb 44R24 se unió a Fzd5 y Fzd8 con buena afinidad. No se puede establecer una curva sigmoidal de respuesta a dosis para los otros 3 receptores Fzd, lo que sugiere que 44R24 no se une a Fzd1, 2 y 7. La unión de alta afinidad de Fzd1, 2, 5 y 7 se confirmó para el mAb 18R5.

35

Tabla 13. Valores de CE<sub>50</sub> (nM) de los mAb 18R5 Y 44R24

CE <sub>50</sub> (nM)	Fzd1	Fzd2	Fzd5	Fzd7	Fzd8
18R5	0,41	0,62	1,10	0,58	12,00
44R24	117,95	sin unión	1,89	92,31	1,09

**Ejemplo 20**

Evaluación de la actividad anti Wnt de los mAb anti FZD en análisis basados en células

- 5 Se determinó y se comparó la capacidad de 18R5 y 44R24 para inhibir la señalización Wnt en células STF-293. Las células STF son células de riñón embrionario humano (HEK, *Human Embryonic Kidney*)-293 transfectadas de manera estable con el casete indicador Super Top Flash (STF) en el que la expresión del gen indicador de luciferasa (Luc) es regulado por copias múltiples del sitio de unión a TCF hacia el extremo 5' prima de un promotor mínimo. Se puede inducir una expresión de Luc basal baja de 30-60 veces en respuesta a Wnt3a, lo que proporciona una
- 10 grande ventana para determinar la actividad inhibidora de los Ab anti FZD.

Para determinar los mAb, se hacen crecer células STF-293 en DMEM-FBS al 10 %. El día 1 se sembraron 10.000 células por pocillo en placas de fondo blanco óptico de 96 pocillos (Nunc nº 165306). Las células se incubaron durante la noche a 37 °C y con CO<sub>2</sub> al 5 %. El día 2, los Ab a ensayar se diluyeron a una concentración final de 40 µg/ml utilizando medio de cultivo. Se realizaron siete diluciones en serie con factor 5. El medio de cultivo de las células STF-293 se reemplazó con una mezcla que contenía 50 µl de dilución de Ab, 25 µl de medio acondicionado Wnt3a procedente de células L estables a Wnt3a y 25 µl de DMEM-FBS al 10 %. Para cada Ab, las concentraciones finales ensayadas eran de 20, 4, 0,8, 0,16, 0,03, 0,006, 0,0013 y 0,0003 µg/ml. Cada concentración de Ab se ensayó por triplicado. Como Ab de control negativo se utilizó LZ1, un Ab anti hapteno humano. Como inductor de control negativo se utilizó un medio acondicionado diferente de Wnt3a procedente de células L precursoras. Las placas volvieron a introducirse en la incubadora. La actividad de luciferasa se midió el día 3 utilizando el kit Promega Steady Glo (VWR nº PAE2550-A) según las especificaciones del fabricante. Los resultados se expresaron en fotones por segundo. Para las representaciones gráficas y analizar los datos se utilizó el programa informático GraphPad Prism. Las actividades de luciferasa se representan gráficamente como una función de la concentración de Ab para establecer curvas de respuesta a la dosis. Para ajustar la curva y calcular las Cl<sub>50</sub> se aplicó una regresión no lineal a los números.

Del mismo modo, la capacidad de 44R24 y 18R5 para inhibir señalización Wnt en células STF se determinó y se comparó como se describe anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 48 y en la Tabla 14. La actividad de 44R24 se detectó únicamente a concentraciones de Ab superiores, lo que refleja la baja actividad del anticuerpo en el ensayo. Se calculó que la Cl<sub>50</sub> de 44R24 era 13 veces menor que la de 18R5.

Tabla 14. Valores Cl<sub>50</sub> de inhibición de señalización Wnt en células ST-293 de 18R5 y 44R24

	18R5	44R24
Cl <sub>50</sub> (nM)	2,73	34,43

35 También se determinó la capacidad de 18R5 y 44R24 para inhibir la señalización Wnt en células A549. Las células A549 son células de carcinoma de pulmón humano en el que el gen Axin2 se expresa a de manera muy elevada, traduciendo actividad endógena de señalización Wnt. Axin2 es un gen diana Wnt bien conocido que responde a la activación de la vía regulando por aumento su transcripción y finalmente regulando por disminución la señalización Wnt a través de un mecanismo de retroalimentación en bucle. Este sistema se utilizó para ensayar el impacto de los Ab anti Fzd sobre los niveles de ARNm de Axin2 mediante PCR cuantitativa.

40 Se sembraron placas de 12 pocillos con 30.000 células A549 por pocillo y se hicieron crecer durante 3 días en DMEM + FBS al 10 %. Se añadieron anticuerpos a diversas concentraciones (5, 1, 0,2, 0,04, 0,008 µg/ml) durante 24 horas y se extrajo ARN total de las células. Como control negativo se utilizó LZ1, un anticuerpo que no se une, únicamente en la concentración más alta.

45 Se sembraron 30.000 células A549 en placas de 12 pocillos y se hicieron crecer durante 3 días en DMEM + FBS al 10 %. El anticuerpo 18R5 o 44R24, anti FZD, se añadió a diversas concentraciones (5, 1, 0,2, 0,04, 0,008 µg/ml) y como control negativo se utilizó LZ1, un anticuerpo que no se une, únicamente a la concentración más alta. Se elaboró ARN 24 horas después del tratamiento y después se trató con Dnasa,

50 Se sabe que el gen Axin2 es un gen diana contundente en la señalización Wnt y su nivel de expresión se examinó mediante análisis de expresión relativa Taqman ( $\Delta\Delta CT$ ) utilizando un aparato de Applied Biosystems 7900 HT. Se utilizaron 50 ng de ARN por punto, por triplicado, y se utilizó una sonda GUSB para el control endógeno. Todos los resultados se normalizan a niveles de Axin2 en la muestra de control LZ1.

55 La curva de respuesta a la dosis muestra la inhibición del nivel basal de la expresión del gen axin2 por 18R5 y 44R24 y los valores de CE<sub>50</sub> calculados para estos anticuerpos se muestran en la Figura 49. 18R5 y 44R24 inhiben los niveles básales de Axin2 en relación al control LZ1 con eficiencias comparables.

**Ejemplo 21**

Evaluación de la actividad antitumoral de los mAb anti FZD en modelos de xenoinjerto pancreático

*Tumores pancreáticos OMP-PN13:*

- Se obtuvieron células tumorales OMP-PN13 congeladas, que se habían sometido dos veces a pases en ratones, procedentes de un banco de tumores de Oncomed. Se descongelaron e inyectaron por vía subcutánea en el costado izquierdo de ratones NOD/SCID inmediatamente después de descongelar. Se inyectaron ~ 25.000 células viables por animal. Los ratones se vigilaron semanalmente para determinar el crecimiento de los tumores. Después de su aparición, con un calibrador se midió el tamaño de los tumores una vez a la semana. Los ratones portadores de tumores de 200-300 mm<sup>3</sup> se dispusieron en grupos de tratamiento, conteniendo cada uno de ellos 5 animales. El tamaño de tumor promedio era comparable en cada grupo. El tratamiento con Ab comenzó el día después de la distribución aleatoria. Se utilizó LZ1 como el Ab de control negativo. Se administraron 3 dosis de 10 mg/kg de Ab por inyección intraperitoneal durante un período de 12 días. Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la última inyección y se extirpó el tumor, el duodeno y el hígado.
- Los tejidos tumorales se fijaron en formalina se incluyeron en parafina y se cortaron. La detección de Muc16 se realizó mediante inmunohistoquímica (IHQ) para controlar la aparición de células productoras de mucina. Las mucinas son específicas de un subtipo de células diferenciadas en el páncreas, y como tal se utilizan como marcadores de diferenciación en el modelo de tumor.
- Los cortes incluidos en parafina y fijados en formalina (FFPE, por sus siglas en inglés *Formalin-fixed, paraffin-embedded*) se desparafinaron. Primero se desparafinaron los portaobjetos por tratamiento secuencial con xileno dos veces durante 5 minutos cada vez. Después, el tejido se rehidrató por inmersión en una serie de etanol de 100 % dos veces durante 3 minutos cada una, 90 % una vez durante 1 minuto, 80 % una vez durante 1 minuto y 70 % una vez 1 minuto en agua. El tejido se lavó durante 1 minuto con un flujo de agua destilada.
- Se utilizó el anticuerpo mucina 16 (clon X325 de AbCAM, catálogo ab10033) para la detección mediante IHQ de células que expresaban mucina 16 en secciones de tejido FFPE. La recuperación de antígeno termo inducida se realizó con tampón citrato 10 mM, pH 6,0 en una autoclave. Después, los portaobjetos se mantuvieron a temperatura ambiente y se permitió que las proteínas recuperasen la antigenicidad lentamente (aproximadamente 2 horas).
- Las secciones tisulares se bloquearon con solución de peróxido de hidrógeno al 3 % en agua, se lavaron y después se bloquearon nuevamente utilizando solución bloqueadora de suero normal de caballo (para 50 ml; PBS (38,5 ml), NHS al 10 % (5 ml), BSA al 1 % (5 ml), gelatina al 0,1 % (500 µl), Tx-100 al 0,1 % (500 µl), NaN<sub>3</sub> al 0,05 % (500 µl)) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las secciones se tiñeron con dilución 1:200 de anticuerpo primario Muc16 en un diluyente verde Da Vinci, pH 7,3 (PD 900, Biocare Medical) durante 1 hora a temperatura ambiente seguido de tres lavados utilizando solución salina tamponada con fosfato que contenía tritón X-100 al 0,1 %. Las secciones se tiñeron después con 3 gotas de anticuerpo anti IgG de ratón ImmPress conjugado con HRP (Catálogo 101098-260, VWR) durante 30 minutos a temperatura ambiente seguido de tres lavados utilizando solución salina tamponada con fosfato que contenía tritón X-100 al 0,1 %. Los portaobjetos se colocaron en placas de Petri y se revelaron utilizando el kit Vector NovaRed (SK4800, Vector labs) durante 1-2 minutos. La reacción se detuvo por la adición de agua destilada. Los portaobjetos se aclaron exhaustivamente con un flujo de agua destilada. Las secciones tisulares se sometieron después a tinción de contraste utilizando hematoxilina (fórmula de Vector Labs Gill's, catálogo H3401) durante 1 minuto, se lavaron y después se neutralizaron utilizando una solución de tinción azul durante 30 segundos. Los portaobjetos se dejaron secar durante la noche y se montaron utilizando VectaMount (Vector Labs).
- En la Figura 50 se muestran los campos representativos de los tumores tratados con Ab de control (LZ1), 18R5 o 44R24. Aunque LZ1 se asoció con tinción de baja intensidad, se detectaron niveles de tinción más altos con el anticuerpo Muc16 en los tumores tratados con 18R5. Esto sugiere que las células tumorales se indujeron para diferenciarse hacia el linaje de células productoras de mucina por 18R5. En este experimento, los niveles de tinción con Muc16 en los tumores tratados con 44R24 eran más moderados que en los tumores tratados con 18R5, pero aún parecían ser ligeramente más altos que en los tumores tratados con LZ1.
- Para el análisis de la expresión del gen diana Wnt, también se extrajo ARN total de tumor, duodeno e hígado utilizando PCR cuantitativa.
- En el momento de su recogida, los tejidos se transfirieron de inmediato a RNAlater (QIAGEN). El ARN se extrajo utilizando el mini kit QIAGEN RNeasy para tejido fibroso según las instrucciones del fabricante. Se enviaron 50 ng de ARN total para el análisis de expresión genética utilizando el protocolo y los reactivos de RT-PCR de una etapa ABI. Como control endógeno se utilizó la expresión del gen GusB. Se configuraron triplicados de cada muestra. Se analizaron los 5 tumores de cada grupo de tratamiento. Se utilizó un aparato ABI 7900 TaqMan para llevar a cabo los experimentos. Se utilizó el programa informático ABI SDS 2.2.1 para analizar los datos y calcular los valores DeltaCt que se transformaron a cantidades relativas. Se calculó el promedio de los valores por triplicado de los 5 tumores de cada grupo de tratamiento. Después, se calcularon los múltiplos de los factores de inhibición en relación al anticuerpo de control (LZ1).
- Los resultados se muestran en la Tabla 15. Los genes diana Wnt se vieron afectados de manera variable por los Ab

anti FZD. El anticuerpo 18R5 indujo la inhibición 2,3x y 8x en tumor e hígado, mientras que no se vio afectado en el duodeno. Los cambios inducidos por 44R24 eran más moderados.

Tabla 15. Análisis de expresión génica con qPCR de genes diana Wnt en tejidos tratados con 18R5 y 44R24

	tumor	hígado					duodeno	
	Axin2	Axin2	Rhbg	Glul	Lect2	Lgr5	Axin2	Lgr5
18R5	-2,3x	-8x	-6,5x	-19x	-8x	-26x	NS	-2,6x
	-2,5x	-13x	-5x					
44R24	-1,8x	-2,4x	-1,9x	NR	NR	NR	NR	NR

NR: no realizado  
Los distintos experimentos se muestran en cursiva

5

#### Tumores pancreáticos OMP-PN4

También se investigó el impacto de 18R5 en el estroma de tumor en el modelo de xenoinjerto de tumor pancreático OMP-PN4. Se identificaron varios genes por micromatriz, cuyos niveles de expresión se alteraron por el tratamiento.

10 Entre estos, ACTA2, que codifica la proteína actina de músculo liso (AML) es de interés particular. Se ha demostrado que la proteína AML se asocia a estroma de tumor activado. Por tanto, su regulación por disminución puede observarse como un signo de fenotipo tumorigénico disminuido.

15 Como se describe en el ejemplo 7 anterior, ratones NOD/SCID portadores de tumor OMP-PN4 se trataron con Ab de control (LZ-1), 18R5, gencitabina o la combinación de 18R5 y gencitabina, una vez a la semana durante 6 semanas. Los anticuerpos se administraron a una concentración de 10 mg/kg. Después de extirparse, los tumores de ese experimento se analizaron para determinar la expresión de genes diana Wnt a niveles tanto de ARN como de proteína, utilizando micromatriz e IHQ, respectivamente,

20 El ARN total se extrajo de los tumores, se amplificó y se sometió a análisis de micromatriz. Los ARN totales se amplificaron utilizando el sistema de amplificación de ARN V2 de Ovation (NuGEN, San Carlos, CA). Los ADNc de cadena sencilla antisentido amplificados resultantes se fragmentaron y se marcaron con biotina utilizando módulo FL-Ovation cDNA Biotin V2 (NuGEN) para uso en microplacas Affymetrix. En estos experimentos, (realizados en Almac Diagnostics, Durham, NC), se utilizaron micromatrices oligonucleotídicas Affymetrix HG-U133 plus 2 o MG

25 430 2.0. Después de la hibridación, los microplacas de genes se lavaron, se tiñeron y se exploraron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Affymetrix, Santa Clara, CA). La calidad del ADNc y del ADNc fragmentado se analizó con un espectrofotómetro y con un bioanalizador antes de la hibridación de la matriz. Los datos si procesar de la microplaca explorada se cuantificaron y se incrementaron utilizando el paquete del programa informático GCOS (Affymetrix) y se sometieron a una evaluación exhaustiva de control de calidad de microplaca de genes

30 recomendada por Affymetrix para detectar cualquier defecto en la microplaca y valores atípicos, los cuales se excluyeron de los análisis de datos posteriores.

35 El ajuste del fondo de la matriz y la normalización de la intensidad de señal se realizaron con el algoritmo GCRMA en el programa informático Bioconductor de fuente abierta ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)). Los genes que se expresaron de manera diferencial entre dos grupos o puntos de tiempo se identificaron con la prueba de la t de Bayes (Cyber-T), que combina la prueba de la t de Student con un cálculo Bayesiano de la varianza intragrupo obtenida a partir de la varianza observada de los conjuntos de sonda a niveles de expresión similares (Baldi P, Long AD, A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t -test and statistical inferences of gene changes, Bioinformatics, 2001; 1786): 509-19).

40 40 Para el análisis de micromatriz de genes de tumor humano, las muestras se evaluaron en micromatrices tanto de ser humano como de ratón para determinar los efectos del tratamiento sobre la masa de tumor humano y sobre el estroma de ratón, independientemente. Aquellos conjuntos de sonda Affymetrix que no eran específicos de especie se omitieron del análisis.

45 45 En la preparación para la inmunofluorescencia de la alfa actina de músculo liso (αML), el tejido tumoral se congeló utilizando OCT. Se obtuvieron secciones de 4 micrómetros que se conservaron congeladas a -80 °C. Para la tinción de αML, el tejido se fijó utilizando acetona enfriada a -20 °C durante 15 minutos y después se dejó secar y se llevó a temperatura ambiente y después se marcó utilizando una pluma PAP hidrófoba. Los portaobjetos se lavaron

50 después utilizando solución salina tamponada con fosfato (PBS). El tejido se bloqueó utilizando suero normal de caballo R.T.U. (Vector Labs) durante 2 horas a temperatura ambiente. La tinción del anticuerpo primario se realizó con una dilución 1:10.000 de anticuerpo anti alfa actina de músculo liso conjugado con FITC (cline 1A4, nº F3777, SIGMA) durante 1 hora. Las secciones se lavaron 3 veces utilizando PBS que contenía tritón X-100 al 0,1 %. Los portaobjetos se secaron después al aire y se montaron utilizando medio de montaje utilizando el medio de montaje del conjunto Hard que contenía DAPI (vectashield H-500).

55 La Figura 51A muestra los niveles de expresión del gen ACTA2 detectados por micromatriz. Los tumores tratados

con el anticuerpo 18R5, anti FZD, muestran niveles de expresión de ACTA-2 disminuidos. La Figura 51B muestra los resultados de la inmunofluorescencia de alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ AML) en tumores OMP-PN4 tratados con mAb de control (panel superior) o con 18R5 (panel inferior). Se detectaron cantidades reducidas de  $\alpha$ AML en los tumores tratados con 18R5. La expresión de ACTA2 y la cantidad de AMS se redujeron drásticamente en el estroma tumoral en respuesta a 18R5, lo que sugiere que el bloqueo de Wnt (i) incide en este compartimiento tumoral, y (ii) lo hace reduciendo un marcador de tumorigenidad bien establecido. Estos resultados sugieren que la reducción de la activación de miofibroblastos puede ser uno de los mecanismos de acción antitumorales de 18R5.

### Ejemplo 22

Evaluación del potencial tumorigénico de células OMP-PN13 positivas a Muc16

Como se describe anteriormente, el tratamiento con 18R5 induce la expresión de genes y cambios de fenotipo celular en tumores pancreáticos, incluyendo expresión aumentada de mucina. En particular, la IHQ realizada en tumores PN-13 tratados, revela un número aumentado de células positivas a Muc16. Los niveles de expresión del gen Muc16 también son más altos en tumores tratados que en tumores de control. La tumorigenidad de las células positivas a Muc16 inducidas por 18R5 se determinó para probar la hipótesis de que las células positivas a Muc16 inducidas por 18R5 son representativas de una subpoblación de células tumorales diferenciadas.

Ratones portadores de células OMP-PN13 se trataron con 18R5 de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 21. Los ratones se sacrificaron 12 días después de iniciar el tratamiento con el Ab. Los tumores se extirparon y se procesaron para obtener una suspensión de células disociadas utilizando colagenasa III para digerir los tejidos. Las células estromales de ratón se tiñeron con un anticuerpo antiH-2Kd biotinilado y un anticuerpo anti CD45 biotinilado. Despues, estas células se incubaron con esferas magnéticas conjugadas con estreptavidina (Thermo MagnaBind) y se empobrecieron utilizando un imán Dynal. Las células tumorales resultantes, desprovistas de lin, se tiñeron con un mAb anti-Muc16 detectado con un Ab secundario conjugado con PE. Las células positivas a Muc16 y negativas a Muc16 se clasificaron utilizando un aparato FACS ARIA que funciona con el programa informático DIVA. Véase la Figura 52A. Las células se reinyectaron por vía subcutánea en el costado izquierdo de ratones NOD/SCID para comparar sus potenciales tumorigénicos. Cada tipo de célula se inyectó en 10 ratones. Cada ratón recibió 75 células. En la Figura 52B se muestran imágenes representativas de los tumores resultantes de la inyección de células Muc16- (panel superior) y Muc16+ (panel inferior). En la Figura 52C se muestran las curvas de crecimiento para los tumores Muc16- y Muc16+ después de la inyección en los ratones. No hubo crecimiento tumoral después de la inyección de células Muc16+, mientras que 7 de los 10 ratones a los que se les inyectaron células Muc16- desarrollaron tumores. Los datos sugieren que las células Muc16+ inducidas por 18R5 no son tumorigénicas, lo que fundamenta la inducción de diferenciación como un mecanismo subyacente de actividad antitumoral del anticuerpo 18R5.

### Ejemplo 23

Estudios *in vivo* adicionales con anticuerpos anti FZD

Estudio de recidiva de tumor de mama PE13 con el mAb 18R5: se inyectaron células de tumor de mama PE13 en ratones NOD-SCID y se dejó que crecieran hasta que los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>. Los animales se distribuyeron al azar en dos grupos ( $n = 10$ ) y recibieron taxol (15 mg/kg, dos veces por semana) + anticuerpo de control (cuadrados negros) o la misma dosis de taxol + anticuerpo 18R5, anti FZD (círculos gris claro). Los anticuerpos se administraron a una dosis de 20 mg/kg una vez por semana. Los tratamientos con taxol se detuvieron el día 70 y los tratamientos con anticuerpo continuaron. Los resultados se muestran en la Figura 53. Se observó que 18R5 potenciaba la tasa de regresión tumoral y que retrasaba la recidiva tumoral después de detener el tratamiento con taxol.

Estudio de ensayo de dilución limitante (LDA) de tumor de mama PE13 con el mAb 18R5: animales portadores de tumores de mama PE13 se trataron con anticuerpo de control (círculos grises), 18R5 (triángulos blancos), taxol (círculos negros), o la combinación de taxol y 18R5 (cuadrados blancos). El taxol se administró a una dosis de 15 mg/kg dos veces por semana y los anticuerpos a una dosis de 20 mg/kg una vez a la semana. Se extirparon los tumores y las células tumorales humanas desprovistas de lin se purificaron. Se inyectaron 50, 150 o 500 células tumorales en una nueva cohorte de ratones ( $n = 10$  por dosis de célula). Los resultados se muestran en la Figura 54. La frecuencia de crecimiento tumoral se controló después de 59 días y se utilizó para calcular la frecuencia de CMC (L-calc).

Estudio de recidiva de tumor pancreático PN4 con el mAb 18R5: se inyectaron células tumorales pancreáticas PN4 en ratones NOD-SCID y se permitió que crecieran hasta que los tumores alcanzaron aproximadamente 250 mm<sup>3</sup>. A los animales se les suministró gemcitabina (75 mg/kg, una vez a la semana) durante 5 semanas hasta que los tumores remitieron. Los animales se distribuyeron al azar en dos grupos y se les proporcionó anticuerpo de control (cuadrados negros) o el anticuerpo anti FZD, 18R5 (círculos gris claro). Los anticuerpos se administraron a una dosis de 10 mg/kg, una vez a la semana. Los resultados se muestran en la Figura 55. Se observó que el anticuerpo 18R5 retrasaba la recidiva tumoral después del tratamiento con gemcitabina.

Estudio de crecimiento de tumor pancreático PN4 con el mAb 44R24: se inyectaron tumores pancreáticos PN4 en ratones NOD-SCID. Se permitió que los tumores crecieran hasta que alcanzaron un volumen de aproximadamente 150 mm<sup>3</sup>. Los animales se distribuyeron de manera aleatoria en 4 grupos (n = 10 por grupo) y recibieron un anticuerpo de control (cuadrados negros), anticuerpo 44R24, anti FZD5/8 (triángulos gris claro), gencitabina (triángulos negros) o una combinación de 44R24 más gencitabina (círculos gris claro). Se administró gencitabina a una dosis de 15 mg/kg una vez a la semana y los anticuerpos se administraron a una dosis de 20 mg/kg, dos veces a la semana. Los resultados se muestran en la Figura 56, se observó que el anticuerpo 44R24 reducía el crecimiento tumoral en combinación con gencitabina en relación con solo gencitabina.

10 **Ejemplo 24**

Mapeo epítópico del anticuerpo 44R24, anti FZD

15 El mapeo epítópico del anticuerpo 44R24, anti FZD, se realizó de una manera similar a la descrita anteriormente en el Ejemplo 5 para los anticuerpos 18R8 y 18R5. La capacidad del anticuerpo 44R24 para unirse a un epítopo similar al de 18R8 se determinó por citometría de flujo, utilizando una serie de variantes de aminoácidos de FZD8 que anteriormente se había demostrado que alteraba la unión de 18R8 (véase el Ejemplo 5 y las Figuras 6 y 7). Se descubrió que los aminoácidos 126-127 de FZD8 eran necesarios para la unión de 44R24, como se indica mediante tinción reducida dentro de la población de células cotransfектadas (positivas a GFP). Los resultados de los 20 experimentos FACS se muestran en la Figura 57. Estos resultados muestran que 44R24 se une a un epítopo que se solapa con el epítopo de 18R8 y que comprende los aminoácidos 126-127 compartidos,

**Ejemplo 25**

25 Estudio del crecimiento de tumor de colon C28 con los anticuerpos 18R5, 18R8 y 44R24, anti FZD,

Se inyectaron por vía subcutánea células de tumor C28 en ratones Nod-Scid. Se permitió que los tumores crecieran hasta que alcanzaron un volumen promedio de 126 mm<sup>3</sup>. Los animales portadores del tumor eran grupos que se distribuyeron al azar en cuatro grupos (n = 10 ratones por grupo) y se trataron con Ab de control (cuadrados negros),

30 18R8 (triángulos grises), 44R24 (círculos negros) o 18R5 (círculos grises) (Figura 58). Los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal a una dosis de 15 mg/kg, dos veces a la semana. Se indican los volúmenes tumorales. El tratamiento con los anticuerpos 44R24 y 18R5 reduce el crecimiento en relación con el grupo tratado con Ab de control, mientras que 18R8 no tuvo ningún efecto (Figura 58),

35 Despues del tratamiento de los animales en el experimento mostrado en la Figura 58, los tumores se extrajeron, se fijaron en formalina, se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 5 micrómetros. Las secciones de tumor se analizaron para determinar la expresión de citoqueratina 7, un marcador de diferenciación de células de colon por inmunohistoquímica (kit Vectastain, Vector Labs). Se observó que la expresión de la citoqueratina 7 era elevada después del tratamiento con 44R24 o 18R5 (Figura 59),

40 **LISTADO DE SECUENCIAS**

45 <110> oncomed Pharmaceuticals, Inc, Gurney, Austin L, Sato, Aaron Ken Axelrod, Fumiko Takada satyal, Sanjeev H,

45 <120> Agentes que se unen a receptores frizzled y usos de los mismos

50 <130> 2293,051PC04

50 <140> PCT/US09/58635  
<141> 28-09-2009

55 <150> 61/176,741  
<151> 08-05-2009

55 <150> 61/144,248  
<151> 13-01-2009

60 <150> 61/144,058  
<151> 12-01-2009

60 <150> 61/100,639  
<151> 26-09-2008

65 <160> 97

<170> PatentIn, versión 3,3

5 <210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> CDR1 de cadena pesada

<400> 1

**Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr Thr Leu Ser**  
1 5 10

15 <210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> CDR2 de cadena pesada

<400> 2

**Val Ile Ser Gly Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys**  
1 5 10 15

**Gly**

25 <210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> CDR3 de cadena pesada

<400> 3

**Asn Phe Ile Lys Tyr Val Phe Ala Asn**  
1 5

40 <210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> CDR1 de cadena ligera

<400> 4

**Ser Gly Asp Lys Leu Gly Lys Lys Tyr Ala Ser**  
1 5 10

50 <210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5                   <220>  
                   <223> CDR2 de cadena ligera

5                   <400> 5

**Glu Lys Asp Asn Arg Pro Ser Gly**  
                   **1**                                   **5**

10                  <210> 6  
                   <211> 9  
                   <212> PRT  
                   <213> Secuencia artificial

15                  <220>  
                   <223> CDR3 de cadena ligera  
  
                   <400> 6

**Ser Ser Phe Ala Gly Asn Ser Leu Glu**  
                   **1**                                   **5**

20                  <210> 7  
                   <211> 11  
                   <212> PRT  
                   <213> Secuencia artificial

25                  <220>  
                   <223> CDR1 de cadena ligera  
  
                   <400> 7

**Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Phe Tyr Val His**  
                   **1**                                   **5**                                   **10**

35                  <210> 8  
                   <211> 8  
                   <212> PRT  
                   <213> Secuencia artificial

40                  <220>  
                   <223> CDR2 de cadena ligera  
  
                   <400> 8

**Asp Lys Ser Asn Arg Pro Ser Gly**  
                   **1**                                   **5**

45                  <210> 9  
                   <211> 9  
                   <212> PRT  
                   <213> Secuencia artificial

50                  <220>  
                   <223> CDR3 de cadena ligera  
  
                   <400> 9

Gln Ser Tyr Ala Asn Thr Leu Ser Leu  
1 5

5 <210> 10  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> región variable de cadena pesada (VH) de 18R5/18R8  
<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr  
20 25 30

Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asn Phe Ile Lys Tyr Val Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

15 <210> 11  
<211> 463  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Cadena pesada (IgG2) de 18R5/18R8  
<400> 11

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
1 5 10 15

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

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
35 40 45

Ser His Tyr Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala  
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn  
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Phe Ile Lys Tyr Val Phe Ala Asn Trp Gly  
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 195 200 205

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His  
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys  
 225 230 235 240

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val  
 245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 275 280 285

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser  
 305 310 315 320

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 340 345 350

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 355 360 365

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser

405	410	415
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
425		430
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
440		445
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
455		460

<210> 12  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> región variable de cadena ligera (VL) de 18R8  
<400> 12

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Lys Lys Tyr Ala  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Glu Lys Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Ala Gly Asn Ser Leu Glu  
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105

15 <210> 13  
<211> 232  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Cadena ligera (lambda) de 18R8  
<400> 13

Met Ala Trp Ala Leu Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr Gln Gly Thr Gly  
 1 5 10 15

Ser Trp Ala Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala  
 20 25 30

Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Lys  
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu  
 50 55 60

Val Ile Tyr Glu Lys Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe  
 65 70 75 80

Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr  
 85 90 95

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Ala Gly Asn  
 100 105 110

Ser Leu Glu Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
 115 120 125

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu  
 130 135 140

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr  
 145 150 155 160

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys  
 165 170 175

Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr  
 180 185 190

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His  
 195 200 205

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys  
 210 215 220

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 225 230

<210> 14  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> región variable de cadena ligera de 18R5

&lt;400&gt; 14

Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Gln
1				5					10						15
Thr	Ala	Arg	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Asp	Asn	Ile	Gly	Ser	Phe	Tyr	Val
		20					25						30		
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
		35				40						45			
Asp	Lys	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50				55					60					
Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Ala	Glu
	65				70					75			80		
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Tyr	Ala	Asn	Thr	Leu	Ser	Leu
			85					90					95		
val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly				
	100						105								

5           <210> 15  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10           <220>  
 <223> Cadena ligera (lambda) de 18R5  
 <400> 15

Met	Ala	Trp	Ala	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Gln	Gly	Thr	Gly	
1				5				10					15		
Ser	Trp	Ala	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ala
			20				25					30			
Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Arg	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Asp	Asn	Ile	Gly	Ser
	35					40					45				
Phe	Tyr	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu
		50				55					60				
val	Ile	Tyr	Asp	Lys	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe
	65				70					75			80		

Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr  
 85 90 95

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Asn Thr  
 100 105 110

Leu Ser Leu Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
 115 120 125

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu  
 130 135 140

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr  
 145 150 155 160

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys  
 165 170 175

Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr  
 180 185 190

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His  
 195 200 205

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys  
 210 215 220

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 225 230

<210> 16

<211> 485

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión Fzd7 DEC FC

10

<400> 16

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

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

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

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

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

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

Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val  
 100 105 110

Leu Asp Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg  
 115 120 125

Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu  
 130 135 140

Arg Leu Arg Cys Glu Asn Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Ile Cys  
 145 150 155 160

Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly Ser Gly Gly Pro Gly Gly 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 Arg Arg Phe Ala Arg Leu Gly  
 245 250 255

Arg Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 260 265 270

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 275 280 285

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 290 295 300

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 305 310 315 320

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 325 330 335

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 340 345 350

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 355 360 365

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 370 375 380

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 385 390 395 400

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 405 410 415

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr  
 420 425 430

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 435 440 445

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 450 455 460

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 465 470 475 480

Leu Ser Pro Gly Lys  
 485

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 354

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Cadena pesada (VH) de 18R5/18R8

10

&lt;400&gt; 17

gaagtgcac	tggtgaaag	cggcgccgc	ctggtgac	ctggcgccag	cctgagactg	60
agctgcgt	cctccggatt	tacctttct	cattatactc	tgtcttggt	gcgccaagcc	120

cctgggaagg	gtctcgagtg	ggtgagcg	ttt atctctgg	ttt atggtagcta	tacctattat	180
gctgatagcg	tgaaaggcag	atttaccatt	tcaagtgata	attccaaaaa	caccctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agctgaagat	acagccgtgt	attattgcgc	tagaaatttt	300
attaagtatg	ttttgtctaa	ttggggccaa	ggcacccctgg	tgacagttag	ctca	354

5 &lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 1389

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

10 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Cadena pesada (IgG2) de 18R5/18R8

&lt;400&gt; 18

atgaaacacc	tgtggttctt	ccctctgctg	gtggcagctc	ccagatgggt	cctgtccgaa	60
gtgcaactgg	tggaaagcgg	cggcggcctg	gtgcaacctg	gcggcagcct	gagactgagc	120
tgcgtgcct	ccggattttac	cttttctcat	tatactctgt	cttgggtgcg	ccaagcccc	180
ggaaagggtc	tcgagtgggt	gagcgttatac	tctggtgatg	gtagctatac	ctattatgct	240
gatagcgtga	aaggcagatt	taccatttca	agtgataatt	ccaaaaaacac	cctgtatctg	300
caaatacgtaca	gcctgagagc	tgaagataca	gccgtgtatt	attgcgttag	aaattttatt	360
aagtatgttt	ttgctaattt	gggccaaggc	accctggtga	cagttagctc	agccagcaca	420
aagggcccta	gcgtcttccc	tctggctccc	tgcagcagga	gcaccagcga	gagcacagcc	480
gccctgggct	gcctggtcaa	ggactacttc	cccgaaccgg	tgacgggtc	gtggactca	540
ggcgctctga	ccagcggcgt	gcacaccttc	ccagctgtcc	tacagtcc	aggactctac	600
tccctcagca	gcgtggtgac	cgtccctcc	agcaacttcg	gcacccagac	ctacacctgc	660
aacgttagatc	acaagcccag	caacaccaag	gtggacaaga	cagttgagcg	caaatgttgt	720
gtcgagtgcc	caccgtgccc	agcaccacct	gtggcaggac	cgtcagtctt	cctcttcccc	780
ccaaaaccca	aggacaccct	catgatctcc	cggaaccctg	aggtcacgtg	cgtgggtgg	840
gacgtgagcc	acgaagaccc	cgaggtccag	ttcaactgg	acgtggacgg	cgtggaggt	900
cataatgcca	agacaaagcc	acgggaggag	cagttcaaca	gcacgttcc	tgtggtcagc	960
gtcctcaccg	ttgtgcacca	ggactggctg	aacggcaagg	agtacaagtg	caaggtctcc	1020
aacaaaggcc	tcccagcccc	catcgagaaa	accatctcca	aaaccaaagg	gcagccccga	1080
gaaccacagg	tgtacaccct	gccccatcc	cgggaggaga	tgaccaagaa	ccaggtcagc	1140
ctgacctgcc	tggtaaaagg	cttcttcccc	agcgacatcg	ccgtggagtg	ggagagcaat	1200
gggcagccgg	agaacaacta	caagaccaca	cctcccatgc	tggactccga	cggctcc	1260
ttcctctaca	gcaagctcac	cgtggacaag	agcaggtggc	agcaggggaa	cgtctctca	1320
tgctccgtga	tgcataggc	tctgcacaac	caactacacgc	agaagagcct	ctccctgtct	1380
ccgggtaaa						1389

15

&lt;210&gt; 19

<211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> región variable de cadena ligera (VL) de 18R8  
 <400> 19

	gatatcgaac tgacccagcc tccttcagtg agcggtgcac caggtcagac cgctagaatc	60
	tctttagcg gcgataagct gggtaagaag tatgcttctt ggtaccagca gaaaccggg	120
	caggctccag ttctggtgat ttatgagaag gataatagac cctcaggcat ccctgaacgc	180
	tttagcggat ccaacagcgg caacaccgct accctgacca ttagcggcac tcaggctgaa	240
	gacgaagccg attattatttgc ctcttctttt gctggtaatt ctctggaggt gtttggcggc	300
10	ggcaccaagt taaccgtcct ggg	324
	<210> 20	
	<211> 696	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cadena ligera (lambda) de 18R8	
20	<400> 20	
	atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacaggatc ctgggctgat	60
	atcgaactga cccagcctcc ttcaagtgc gttgcaccag gtcagaccgc tagaatctct	120
	tgttagcggcg ataagctggg taagaagtat gcttcttggt accagcagaa acccgggcag	180
	gctccagttc tggtgattta tgagaaggat aatagaccct caggcatccc tgaacgcttt	240
	agcggatcca acagcggcaa caccgctacc ctgaccattta gcggcactca ggctgaagac	300
	gaagccgatt attattgctc ttctttgct ggtaattctc tggaggtgtt tggcggcggc	360
	accaagttaa ccgtcctggg tcagcccaag gctgccccca gcgtcactct gttccctccc	420
	tcctctgagg agctgcaagc caacaaggcc acactggtgt gtctcataag tgacttctac	480
	cctggagccg tgacagtggc ctggaaggca gatagcagcc ccgtcaaggc tggagtggag	540
	accaccacac cctccaaaca aagcaacaac aagtacgctg ccagcagcta tctgagcctg	600
	acacctgagc agtggaaagtc ccacagaagc tacagctgcc aggtcacaca tgaagggagc	660
	accgtggaga agacagtggc ccctacagaa tggta	696
25	<210> 21	
	<211> 324	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> región variable de cadena ligera de 18R5	
	<400> 21	

	gatatcgagc tgactcagcc tccatccgtg agtgtggccc ctggtcagac agcacgcac	60
	agctgctccg gggacaatat cggatcttc tacgtcaact ggtatcagca gaagcctgg	120
	caggctccag ttctcggttat ctatgataag agtaatcgcc cctctggat tccagagcgc	180
	ttcagcggaa gcaacagcgg aaatactgca actctcacaa tttccggtac tcaggctgag	240
	gacgaagccg actattactg ccaaagctac gcaaacaccc tgcctcggtt cttcggaggc	300
	ggaacccaagt taaccgtcct gggt	324
	<210> 22	
	<211> 696	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Cadena ligera (lambda) de 18R5	
	<400> 22	
	atggcatggg cactgctgct gctcaactctg ctgacacaag gtactggctc ttggggcgat	60
	atcgagctga ctcagcctcc atccgtgagt gtggccctg gtcagacagc acgcacatcgc	120
	tgctccgggg acaatatcgg atctttctac gtgcactggt atcagcagaa gcctggtcag	180
	gctccagttc tcgttatcta tgataagagt aatcgccct ctgggattcc agagcgcttc	240
	agcggaaagca acagcggaaa tactgcaact ctcacaatcc ccggtaactca ggctgaggac	300
	gaagccgact attactgcca aagctacgca aacaccctgt ccctcgctt cggaggcggaa	360
	accaagttaa ccgtcctggg tcagcccaag gctgccccca gcgtcaactct gttccctccc	420
	tcctctgagg agctgcaagc caacaaggcc acactgggtgt gtctcataag tgacttctac	480
	cctggagccg tgacagtggc ctggaggca gatagcagcc ccgtcaaggc tggagtggag	540
	accaccacac cctccaaaca aagcaacaac aagtacgctg ccagcagcta tctgagcctg	600
	acacctgagc agtggaaagtc ccacagaagc tacagctgcc aggtcacaca tgaagggagc	660
	accgtggaga agacagtggc ccctacagaa tggtca	696
15	<210> 23	
	<211> 1455	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Proteína de fusión FC DEC Fzd7	
	<400> 23	

atgcgggacc	ccggcgcggc	cgctccgctt	tcgtccctgg	gcctctgtgc	cctggtgctg	60
gcgctgctgg	gchgactgtc	cgcggcgcc	ggggcgcagc	cgtaccacgg	agagaaggc	120
atctccgtgc	cggaccacgg	cttctgccag	cccatctcca	tcccgtgtg	cacggacatc	180
gcctacaacc	agaccatcct	gccaacctg	ctgggccaca	cgaaccaaga	ggacgcggc	240
ctcgaggtgc	accagttcta	cccgtggtg	aaggtgcagt	gttctcccga	actccgcttt	300
ttcttatgct	ccatgtatgc	gcccgtgtgc	accgtgtcg	atcaggccat	cccgcgtgt	360
cgttctctgt	gchagcgcgc	ccgcccaggc	tgcgaggcgc	tcatgaacaa	gttcggcttc	420
cagtggcccg	agcggctgcg	ctgcgagaac	ttcccgtgtc	acgggtgcggg	cgagatctgc	480
gtgggccaga	acacgtcgg	cggctccggg	ggcccaggcg	gcggccccac	tgcctaccct	540
accgcgcct	acctgcccga	cctgcccrtc	accgcgtgc	ccccgggggc	ctcagatggc	600
agggggcg	ccgccttccc	tttctcatgc	ccccgtcagc	tcaaggtgcc	cccgtacctg	660
ggcttaccgc	ttctgggtga	gctcgattgt	ggcgccccgt	gcgaaccggg	ccgtgccaac	720
ggcctgatgt	actttaagga	ggaggagagg	cgcttcgc	gcctcggcgc	cgccgacaaa	780
actcacacat	gcccaccgt	cccagcacct	gaactcctgg	ggggaccgtc	agtcttcctc	840
ttccccccaa	aacccaagga	caccctcatg	atctccgg	cccctgaggt	cacatgcgt	900
gtggtggacg	tgagccacga	agaccctgag	gtcaagttca	actgttacgt	ggacggcgt	960
gaggtgcata	atgcaagac	aaagccgcgg	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgt	1020
gtcagcgtcc	tcaccgtcct	gcaccaggac	tggctgaatg	gcaaggagta	caagtgc	1080
gtctccaaca	aagccctccc	agccccatc	gagaaaacca	tctccaaagc	caaaggcag	1140
ccccgagaac	cacaggtgta	caccctgccc	ccatcccggg	atgagctgac	caagaaccag	1200
gtcagcgt	cctgcctggt	caaaggcttc	tatcccagcg	acatgcgt	ggagtggag	1260
agcaatggc	agccggagaa	caactacaag	accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc	1320
tccttcttcc	tctacagcaa	gctcaccgt	gacaagagca	ggtggcagca	ggggAACgtc	1380
ttctcatgct	ccgtgatgca	tgaggctctg	cacaaccact	acacacagaa	gagcctctcc	1440
ctgtctccgg	gtaaa					1455

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fragmento de receptor frizzled humano

10

&lt;400&gt; 24

Gln	Asp	Glu	Glu	Asp	Ala	Gly	Leu	Glu	Val	His	Gln	Phe	Tyr	Trp	Pro
1															

Leu

15

&lt;210&gt; 25

<211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Fragmento de receptor frizzled humano  
 <400> 25

Gly Leu Glu Val His Gln  
 1 5

10 <210> 26  
 <211> 647  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Receptor frizzled humano FZD1  
 20 <400> 26

Met Ala Glu Glu Glu Ala Pro Lys Lys Ser Arg Ala Ala Gly Gly Gly  
 1 5 10 15

Ala Ser Trp Glu Leu Cys Ala Gly Ala Leu Ser Ala Arg Leu Ala Glu  
 20 25 30

Glu Gly Ser Gly Asp Ala Gly Gly Arg Arg Arg Pro Pro Val Asp Pro  
 35 40 45

Arg Arg Leu Ala Arg Gln Leu Leu Leu Leu Trp Leu Leu Glu Ala  
 50 55 60

Pro Leu Leu Leu Gly Val Arg Ala Gln Ala Ala Gly Gln Gly Pro Gly  
 65 70 75 80

Gln Gly Pro Gly Pro Gly Gln Gln Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln  
 85 90 95

Gln Ser Gly Gln Gln Tyr Asn Gly Glu Arg Gly Ile Ser Val Pro Asp  
 100 105 110

His Gly Tyr Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala  
 115 120 125

Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu  
 130 135 140

Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln  
 145 150 155 160

Cys Ser Ala Glu Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val  
 165 170 175

Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Leu Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu  
 180 185 190

Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln  
 195 200 205

Trp Pro Asp Thr Leu Lys Cys Glu Lys Phe Pro Val His Gly Ala Gly  
 210 215 220

Glu Leu Cys Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Lys Gly Thr Pro Thr Pro  
 225 230 235 240

Ser Leu Leu Pro Glu Phe Trp Thr Ser Asn Pro Gln His Gly Gly  
 245 250 255

Gly His Arg Gly Gly Phe Pro Gly Gly Ala Gly Ala Ser Glu Arg Gly  
 260 265 270

Lys Phe Ser Cys Pro Arg Ala Leu Lys Val Pro Ser Tyr Leu Asn Tyr  
 275 280 285

His Phe Leu Gly Glu Lys Asp Cys Gly Ala Pro Cys Glu Pro Thr Lys  
 290 295 300

Val Tyr Gly Leu Met Tyr Phe Gly Pro Glu Glu Leu Arg Phe Ser Arg  
 305 310 315 320

Thr Trp Ile Gly Ile Trp Ser Val Leu Cys Cys Ala Ser Thr Leu Phe  
 325 330 335

Thr Val Leu Thr Tyr Leu Val Asp Met Arg Arg Phe Ser Tyr Pro Glu  
 340 345 350

Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Gly Cys Tyr Thr Ala Val Ala Val Ala  
 355 360 365

Tyr Ile Ala Gly Phe Leu Leu Glu Asp Arg Val Val Cys Asn Asp Lys  
 370 375 380

Phe Ala Glu Asp Gly Ala Arg Thr Val Ala Gln Gly Thr Lys Lys Glu

385	390	395	400
Gly Cys Thr Ile Leu Phe Met Met Leu Tyr Phe Phe Ser Met Ala Ser			
405 410 415			
Ser Ile Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly			
420 425 430			
Met Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser Gln Tyr Phe His			
435 440 445			
Leu Ala Ala Trp Ala Val Pro Ala Ile Lys Thr Ile Thr Ile Leu Ala			
450 455 460			
Leu Gly Gln Val Asp Gly Asp Val Leu Ser Gly Val Cys Phe Val Gly			
465 470 475 480			
Leu Asn Asn Val Asp Ala Leu Arg Gly Phe Val Leu Ala Pro Leu Phe			
485 490 495			
Val Tyr Leu Phe Ile Gly Thr Ser Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser			
500 505 510			
Leu Phe Arg Ile Arg Thr Ile Met Lys His Asp Gly Thr Lys Thr Glu			
515 520 525			
Lys Leu Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Val Phe Ser Val Leu Tyr			
530 535 540			
Thr Val Pro Ala Thr Ile Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Gln Ala			
545 550 555 560			
Phe Arg Asp Gln Trp Glu Arg Ser Trp Val Ala Gln Ser Cys Lys Ser			
565 570 575			
Tyr Ala Ile Pro Cys Pro His Leu Gln Ala Gly Gly Ala Pro Pro			
580 585 590			
His Pro Pro Met Ser Pro Asp Phe Thr Val Phe Met Ile Lys Tyr Leu			
595 600 605			
Met Thr Leu Ile Val Gly Ile Thr Ser Gly Phe Trp Ile Trp Ser Gly			
610 615 620			
Lys Thr Leu Asn Ser Trp Arg Lys Phe Tyr Thr Arg Leu Thr Asn Ser			
625 630 635 640			
Lys Gln Gly Glu Thr Thr Val			
645			

<211> 321  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Dominio extracelular (DEC) de FZD1

<400> 27

Met Ala Glu Glu Glu Ala Pro Lys Lys Ser Arg Ala Ala Gly Gly Gly  
 1 5 10 15

Ala Ser Trp Glu Leu Cys Ala Gly Ala Leu Ser Ala Arg Leu Ala Glu  
 20 25 30

Glu Gly Ser Gly Asp Ala Gly Gly Arg Arg Arg Pro Pro Val Asp Pro  
 35 40 45

Arg Arg Leu Ala Arg Gln Leu Leu Leu Leu Trp Leu Leu Glu Ala  
 50 55 60

Pro Leu Leu Leu Gly Val Arg Ala Gln Ala Ala Gly Gln Gly Pro Gly  
 65 70 75 80

Gln Gly Pro Gly Pro Gly Gln Gln Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln  
 85 90 95

Gln Ser Gly Gln Gln Tyr Asn Gly Glu Arg Gly Ile Ser Val Pro Asp  
 100 105 110

His Gly Tyr Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala  
 115 120 125

Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu  
 130 135 140

Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln  
 145 150 155 160

Cys Ser Ala Glu Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val  
 165 170 175

Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Leu Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu  
 180 185 190

Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln

195

200

205

Trp Pro Asp Thr Leu Lys Cys Glu Lys Phe Pro Val His Gly Ala Gly  
 210 215 220

Glu Leu Cys Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Lys Gly Thr Pro Thr Pro  
 225 230 235 240

Ser Leu Leu Pro Glu Phe Trp Thr Ser Asn Pro Gln His Gly Gly  
 245 250 255

Gly His Arg Gly Gly Phe Pro Gly Gly Ala Gly Ala Ser Glu Arg Gly  
 260 265 270

Lys Phe Ser Cys Pro Arg Ala Leu Lys Val Pro Ser Tyr Leu Asn Tyr  
 275 280 285

His Phe Leu Gly Glu Lys Asp Cys Gly Ala Pro Cys Glu Pro Thr Lys  
 290 295 300

Val Tyr Gly Leu Met Tyr Phe Gly Pro Glu Glu Leu Arg Phe Ser Arg  
 305 310 315 320

Thr

<210> 28

<211> 151

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio Fri de FZD1 humano

10

<400> 28

Gln Gln Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln Ser Gly Gln Gln Tyr  
 1 5 10 15

Asn Gly Glu Arg Gly Ile Ser Val Pro Asp His Gly Tyr Cys Gln Pro  
 20 25 30

Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Met  
 35 40 45

Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val  
 50 55 60

His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Ala Glu Leu Lys  
 65 70 75 80

Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val Leu Glu Gln  
 85 90 95

Ala Leu Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys  
 100 105 110

Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Asp Thr Leu Lys  
 115 120 125

Cys Glu Lys Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Leu Cys Val Gly Gln  
 130 135 140

Asn Thr Ser Asp Lys Gly Thr  
 145 150

<210> 29

<211> 1944

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FZD1 humano

10

<400> 29

atggctgagg	aggaggcgcc	taagaagtcc	cgggcccggc	gcgggtggcgc	gagctggaa	60
ctttgtgccg	ggcgctctc	ggcccggtcg	gcggaggagg	gcagcgggga	cggccgtggc	120
cgccgcccgc	cgcagggtga	ccccggcga	ttggcgcgc	agctgctgct	gctgctttgg	180
ctgctggagg	ctccgctgct	gctgggggtc	cgggcccagg	cggcgggcca	ggggccaggc	240
caggggcccgg	ggccggggca	gcaaccgccc	ccggccgc	agcagcaaca	gagcgggcag	300
cagtacaacg	gcgagcgggg	catctccgtc	ccggaccacg	gctattgcca	gcccatactcc	360
atcccgctgt	gcacggacat	cgcgtacaac	cagaccatca	tgcccaac	gctggggcac	420
acgaaccagg	aggacgcggg	cctggaggtg	caccagg	accctcttagt	gaaagtgcag	480
tgttccgctg	agctcaagtt	tttcctgtgc	tccatgtacg	cgcccggtg	caccgtgcta	540
gagcaggcgc	tgccgccc	ccgctccctg	tgcgagcgc	cgcgc	ctgcgaggcg	600
ctcatgaaca	agttcggtt	ccagtggcca	gacacgctca	agtgtgagaa	gttcccggtg	660
cacggcgccg	gcgagctgtg	cgtggccag	aacacgtccg	acaagggcac	cccgacgccc	720
tcgctgcttc	cagagttctg	gaccagcaac	cctcagcacg	gcggcggagg	gcaccgtggc	780
ggcttcccg	ggggcgccgg	cgcgtcgag	cgaggcaagt	tctcctgccc	gcgccccc	840
aagggtccct	cctacactaa	ctaccacttc	ctgggggaga	aggactgcgg	cgcaccc	900
gagccgacca	agggttatgg	gctcatgtac	ttcgggcccc	aggagctgcg	cttctcgcc	960

acctggattg gcatttggtc agtgctgtgc tgcgcctcca cgctcttacac ggtgcttacg 1020  
 tacctggtgg acatgcggcg cttcagctac ccggagcggc ccatcatctt cttgtccggc 1080  
 ttttacacgg ccgtggccgt ggcctacatc gccggcttcc tccttggaaaga ccgagtggtg 1140  
 tttaatgaca agttcggccga ggacggggca cgcactgtgg cgccaggcac caagaaggag 1200  
 ggctgcacca tcctcttcat gatgctctac ttcttcagca tggccagctc catctggtg 1260  
 gtgatccctgt cgctcacctg gttcctggcg gctggcatga agtggggcca cgaggccatc 1320  
 gaagccaaact cacagtattt tcacctggcc gcctggctg tgccggccat caagaccatc 1380  
 accatcctgg cgctggccca ggtggacggc gatgtgtga gcggagtgtg cttcgtgggg 1440  
 cttaacaacg tggacgcgct gcgtggcttc gtgctggcgc ccctcttcgt gtacctgttt 1500  
 atcggcacgt cctttctgct ggccggcttt gtgtcgtct tccgcattcg caccatcatg 1560  
 aagcacgatg gcaccaagac cgagaagctg gagaagctca tggtgcgcatt tggcgttttc 1620  
 agcgtgtgt acactgtgcc agccaccatc gtcattgcct gctacttcta cgagcaggcc 1680  
 ttccgggacc agtggaaacg cagctgggtg gcccagagct gcaagagcta cgctatcccc 1740  
 tgccctcacc tccaggcggg cggaggcgcc ccgcccgcacc cgcccatgag cccggacttc 1800  
 acggtcttca tgattaagta ctttatgacg ctgatcgtgg gcatcacgtc gggcttctgg 1860  
 atctggtccg gcaagaccct caactcctgg aggaagttct acacgaggct caccaacagc 1920  
 aaacaagggg agactacagt ctga 1944

5 <210> 30  
 <211> 565  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 10 <220>  
 <223> FZD2 humano  
 <400> 30

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

Leu Pro Ala Ala Gly Pro Ala Gln Phe His Gly Glu Lys Gly Ile Ser  
 20 25 30

Ile Pro Asp His Gly Phe Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr  
 35 40 45

Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr  
 50 55 60

Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val  
 65 70 75 80

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

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

Ile Cys Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe  
 115 120 125

Gly Phe Gln Trp Pro Glu Arg Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg His  
 130 135 140

Gly Ala Glu Gln Ile Cys Val Gly Gln Asn His Ser Glu Asp Gly Ala  
 145 150 155 160

Pro Ala Leu Leu Thr Thr Ala Pro Pro Pro Gly Leu Gln Pro Gly Ala  
 165 170 175

Gly Gly Thr Pro Gly Gly Pro Gly Gly Gly Ala Pro Pro Arg Tyr  
 180 185 190

Ala Thr Leu Glu His Pro Phe His Cys Pro Arg Val Leu Lys Val Pro  
 195 200 205

Ser Tyr Leu Ser Tyr Lys Phe Leu Gly Glu Arg Asp Cys Ala Ala Pro  
 210 215 220

Cys Glu Pro Ala Arg Pro Asp Gly Ser Met Phe Phe Ser Gln Glu Glu  
 225 230 235 240

Thr Arg Phe Ala Arg Leu Trp Ile Leu Thr Trp Ser Val Leu Cys Cys  
 245 250 255

Ala Ser Thr Phe Phe Thr Val Thr Tyr Leu Val Asp Met Gln Arg  
 260 265 270

Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Gly Cys Tyr Thr  
 275 280 285

Met Val Ser Val Ala Tyr Ile Ala Gly Phe Val Leu Gln Glu Arg Val  
 290 295 300

Val Cys Asn Glu Arg Phe Ser Glu Asp Gly Tyr Arg Thr Val Val Gln  
 305 310 315 320

Gly Thr Lys Lys Glu Gly Cys Thr Ile Leu Phe Met Met Leu Tyr Phe

325

330

335

Phe Ser Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp  
 340 345 350

Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn  
 355 360 365

Ser Gln Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Ala Val Pro Ala Val Lys Thr  
 370 375 380

Ile Thr Ile Leu Ala Met Gly Gln Ile Asp Gly Asp Leu Leu Ser Gly  
 385 390 395 400

Val Cys Phe Val Gly Leu Asn Ser Leu Asp Pro Leu Arg Gly Phe Val  
 405 410 415

Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr Leu Phe Ile Gly Thr Ser Phe Leu Leu  
 420 425 430

Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Thr Ile Met Lys His Asp  
 435 440 445

Gly Thr Lys Thr Glu Lys Leu Glu Arg Leu Met Val Arg Ile Gly Val  
 450 455 460

Phe Ser Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Ile Val Ile Ala Cys Tyr  
 465 470 475 480

Phe Tyr Glu Gln Ala Phe Arg Glu His Trp Glu Arg Ser Trp Val Ser  
 485 490 495

Gln His Cys Lys Ser Leu Ala Ile Pro Cys Pro Ala His Tyr Thr Pro  
 500 505 510

Arg Met Ser Pro Asp Phe Thr Val Tyr Met Ile Lys Tyr Leu Met Thr  
 515 520 525

Leu Ile Val Gly Ile Thr Ser Gly Phe Trp Ile Trp Ser Gly Lys Thr  
 530 535 540

Leu His Ser Trp Arg Lys Phe Tyr Thr Arg Leu Thr Asn Ser Arg His  
 545 550 555 560

Gly Glu Thr Thr Val  
 565

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 250

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Dominio extracelular (DEC) de FZD2

&lt;400&gt; 31

5

Met	Arg	Pro	Arg	Ser	Ala	Leu	Pro	Arg	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu
1																15
Leu Pro Ala Ala Gly Pro Ala Gln Phe His Gly Glu Lys Gly Ile Ser																
																30
Ile Pro Asp His Gly Phe Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr																
																45
Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr																
																50
Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val																
																65
Lys Val Gln Cys Ser Pro Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr																
																85
Ala Pro Val Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser																
																100
Ile Cys Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe																
																115
Gly Phe Gln Trp Pro Glu Arg Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg His																
																130
Gly Ala Glu Gln Ile Cys Val Gly Gln Asn His Ser Glu Asp Gly Ala																
																145
Pro Ala Leu Leu Thr Thr Ala Pro Pro Pro Gly Leu Gln Pro Gly Ala																
																165
Gly Gly Thr Pro Gly Gly Pro Gly Gly Gly Ala Pro Pro Arg Tyr																
																180
Ala Thr Leu Glu His Pro Phe His Cys Pro Arg Val Leu Lys Val Pro																
																195
Ser Tyr Leu Ser Tyr Lys Phe Leu Gly Glu Arg Asp Cys Ala Ala Pro																
																200
Ser Tyr Leu Ser Tyr Lys Phe Leu Gly Glu Arg Asp Cys Ala Ala Pro																
																205

210

215

220

Cys Glu Pro Ala Arg Pro Asp Gly Ser Met Phe Phe Ser Gln Glu Glu  
 225 230 235 240

Thr Arg Phe Ala Arg Leu Trp Ile Leu Thr  
 245 250

5 <210> 32

<211> 136

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Dominio Fri de FZD1 humano

<400> 32

Gln Phe His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Ile Pro Asp His Gly Phe Cys  
 1 5 10 15

Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr  
 20 25 30

Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu  
 35 40 45

Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Pro Glu  
 50 55 60

Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val Leu  
 65 70 75 80

Glu Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Ile Cys Glu Arg Ala Arg Gln  
 85 90 95

Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu Arg  
 100 105 110

Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg His Gly Ala Glu Gln Ile Cys Val  
 115 120 125

Gly Gln Asn His Ser Glu Asp Gly  
 130 135

15

<210> 33

<211> 1698

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> FZD2 humano

<400> 33

atgcggcccc	gcagcgccct	gccccgcctg	ctgctgccgc	tgctgctgct	gcccgcgc	60
ggccggccc	agttccacgg	ggagaagggc	atctccatcc	cggaccacgg	cttctgccag	120
cccatctcca	tcccgtgtg	cacggacatc	gcctacaacc	agaccatcat	gccccacctt	180
ctgggccaca	cgaaccagga	ggacgcagggc	ctagagggtgc	accagttcta	tccgctggtg	240
aaggtgcagt	gctcgcccga	actgcgttc	ttccctgtgct	ccatgtacgc	accctgtgtgc	300
accgtgtgg	aacaggccat	cccgcgtgc	cgctctatct	gtgagcgcgc	gcgcgcaggc	360
tgcgaagccc	tcatgaacaa	gttcgggttt	cagtggccc	agcgcctgcg	ctgcgagcac	420
ttcccgcgc	acggcgccga	gcagatctgc	gtcggccaga	accactccga	ggacggagct	480
cccgcgctac	tcaccaccgc	gccgcgcgc	ggactgcagc	cgggtgccgg	gggcaccccg	540
ggtgtggccgg	gcggcggcgg	cgtcccccg	cgctacgcca	cgctggagca	ccccttccac	600
tgcccgcgc	tcctcaaggt	gccatcttat	ctcagctaca	agtttctggg	cgagcgtgat	660
tgtgctgcgc	cctgcgaacc	tgcgcggccc	gatggttcca	tgttcttctc	acaggaggag	720
acgcgtttcg	cgcgcctctg	gatcctcacc	tggtcgggtc	tgtgctgcgc	ttccaccccttc	780
ttcactgtca	ccacgtactt	ggttagacatg	cagcgccttc	gctacccaga	gcggcctatc	840
attttctgt	cgggctgcta	caccatggtg	tcggtggcct	acatgcggg	cttcgtgctc	900
caggagcgcg	tggtgtgcaa	cgagcgccttc	tccgaggacg	gttaccgcac	ggtgggtcag	960
ggcaccaaga	aggagggctg	caccatcctc	ttcatgatgc	tctacttctt	cagcatggcc	1020
agctccatct	ggtgggtcat	cctgtcgctc	acctggttcc	tggcagccgg	catgaagtgg	1080
ggccacgagg	ccatcgaggc	caactctcag	tacttccacc	tggccgcctg	ggccgtgcgg	1140
gccgtcaaga	ccatcaccat	cctggccatg	ggccagatcg	acggcgacct	gctgagcggc	1200
gtgtgcttcg	taggcctcaa	cagcctggac	ccgctgcggg	gcttcgtgct	agcgcgcgctc	1260
ttcgtgtacc	tgttcatcg	cacgtccttc	ctcctggccg	gcttcgtgtc	gctcttccgc	1320
atccgcacca	tcatgaagca	cgacggcacc	aagaccgaaa	agctggagcg	gctcatggtg	1380
cgcacatggcg	tcttctccgt	gctctacaca	gtgcccgc	ccatcgatcg	cgcttgctac	1440
ttctacgagc	aggccttccg	cgagcactgg	gagcgctcgt	gggtgagcca	gcactgcaag	1500
agcctggcca	tcccgtgccc	ggcgcaactac	acgcccgcga	tgtcgcccga	cttcacggtc	1560
tacatgatca	aataacctcat	gacgctcatc	gtgggcatca	cgtcgggctt	ctggatctgg	1620
tcgggcaaga	cgctgcactc	gtggaggaag	ttctacactc	gcctcaccaa	cagccgacac	1680
ggtgagacca	ccgtgtga					1698

5 <210> 34  
 <211> 666  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> FZD3 humano  
 <400> 34

Met Ala Met Thr Trp Ile Val Phe Ser Leu Trp Pro Leu Thr Val Phe  
 1 5 10 15

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

Leu Arg Met Cys Gln Asp Leu Pro Tyr Asn Thr Thr Phe Met Pro Asn  
 35 40 45

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

Phe His Pro Met Val Asn Leu Asp Cys Ser Arg Asp Phe Arg Pro Phe  
 65 70 75 80

Leu Cys Ala Leu Tyr Ala Pro Ile Cys Met Glu Tyr Gly Arg Val Thr  
 85 90 95

Leu Pro Cys Arg Arg Leu Cys Gln Arg Ala Tyr Ser Glu Cys Ser Lys  
 100 105 110

Leu Met Glu Met Phe Gly Val Pro Trp Pro Glu Asp Met Glu Cys Ser  
 115 120 125

Arg Phe Pro Asp Cys Asp Glu Pro Tyr Pro Arg Leu Val Asp Leu Asn  
 130 135 140

Leu Ala Gly Glu Pro Thr Glu Gly Ala Pro Val Ala Val Gln Arg Asp  
 145 150 155 160

Tyr Gly Phe Trp Cys Pro Arg Glu Leu Lys Ile Asp Pro Asp Leu Gly  
 165 170 175

Tyr Ser Phe Leu His Val Arg Asp Cys Ser Pro Pro Cys Pro Asn Met  
 180 185 190

Tyr Phe Arg Arg Glu Glu Leu Ser Phe Ala Arg Tyr Phe Ile Gly Leu  
 195 200 205

Ile Ser Ile Ile Cys Leu Ser Ala Thr Leu Phe Thr Phe Leu Thr Phe  
 210 215 220

Leu Ile Asp Val Thr Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe  
 225 230 235 240  
 Tyr Ala Val Cys Tyr Met Met Val Ser Leu Ile Phe Phe Ile Gly Phe  
 245 250 255  
 Leu Leu Glu Asp Arg Val Ala Cys Asn Ala Ser Ile Pro Ala Gln Tyr  
 260 265 270  
 Lys Ala Ser Thr Val Thr Gln Gly Ser His Asn Lys Ala Cys Thr Met  
 275 280 285  
 Leu Phe Met Ile Leu Tyr Phe Phe Thr Met Ala Gly Ser Val Trp Trp  
 290 295 300  
 Val Ile Leu Thr Ile Thr Trp Phe Leu Ala Ala Val Pro Lys Trp Gly  
 305 310 315 320  
 Ser Glu Ala Ile Glu Lys Lys Ala Leu Leu Phe His Ala Ser Ala Trp  
 325 330 335  
 Gly Ile Pro Gly Thr Leu Thr Ile Ile Leu Leu Ala Met Asn Lys Ile  
 340 345 350  
 Glu Gly Asp Asn Ile Ser Gly Val Cys Phe Val Gly Leu Tyr Asp Val  
 355 360 365  
 Asp Ala Leu Arg Tyr Phe Val Leu Ala Pro Leu Cys Leu Tyr Val Val  
 370 375 380  
 Val Gly Val Ser Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Leu Asn Arg Val  
 385 390 395 400  
 Arg Ile Glu Ile Pro Leu Glu Lys Glu Asn Gln Asp Lys Leu Val Lys  
 405 410 415  
 Phe Met Ile Arg Ile Gly Val Phe Ser Ile Leu Tyr Leu Val Pro Leu  
 420 425 430  
 Leu Val Val Ile Gly Cys Tyr Phe Tyr Glu Gln Ala Tyr Arg Gly Ile  
 435 440 445  
 Trp Glu Thr Thr Trp Ile Gln Glu Arg Cys Arg Glu Tyr His Ile Pro  
 450 455 460  
 Cys Pro Tyr Gln Val Thr Gln Met Ser Arg Pro Asp Leu Ile Leu Phe

## ES 2 663 536 T3

465

470

475

480

Leu Met Lys Tyr Leu Met Ala Leu Ile Val Gly Ile Pro Ser Val Phe  
 485 490 495

Trp Val Gly Ser Lys Lys Thr Cys Phe Glu Trp Ala Ser Phe Phe His  
 500 505 510

Gly Arg Arg Lys Lys Glu Ile Val Asn Glu Ser Arg Gln Val Leu Gln  
 515 520 525

Glu Pro Asp Phe Ala Gln Ser Leu Leu Arg Asp Pro Asn Thr Pro Ile  
 530 535 540

Ile Arg Lys Ser Arg Gly Thr Ser Thr Gln Gly Thr Ser Thr His Ala  
 545 550 555 560

Ser Ser Thr Gln Leu Ala Met Val Asp Asp Gln Arg Ser Lys Ala Gly  
 565 570 575

Ser Ile His Ser Lys Val Ser Ser Tyr His Gly Ser Leu His Arg Ser  
 580 585 590

Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Pro Cys Ser Tyr Arg Gly Met Glu Glu Arg  
 595 600 605

Leu Pro His Gly Ser Met Ser Arg Leu Thr Asp His Ser Arg His Ser  
 610 615 620

Ser Ser His Arg Leu Asn Glu Gln Ser Arg His Ser Ser Ile Arg Asp  
 625 630 635 640

Leu Ser Asn Asn Pro Met Thr His Ile Thr His Gly Thr Ser Met Asn  
 645 650 655

Arg Val Ile Glu Glu Asp Gly Thr Ser Ala  
 660 665

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 204

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Dominio extracelular (DEC) de FZD3

5

&lt;400&gt; 35

Met Ala Met Thr Trp Ile Val Phe Ser Leu Trp Pro Leu Thr Val Phe  
 1 5 10 15

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

Leu Arg Met Cys Gln Asp Leu Pro Tyr Asn Thr Thr Phe Met Pro Asn  
 35 40 45

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

Phe His Pro Met Val Asn Leu Asp Cys Ser Arg Asp Phe Arg Pro Phe  
 65 70 75 80

Leu Cys Ala Leu Tyr Ala Pro Ile Cys Met Glu Tyr Gly Arg Val Thr  
 85 90 95

Leu Pro Cys Arg Arg Leu Cys Gln Arg Ala Tyr Ser Glu Cys Ser Lys  
 100 105 110

Leu Met Glu Met Phe Gly Val Pro Trp Pro Glu Asp Met Glu Cys Ser  
 115 120 125

Arg Phe Pro Asp Cys Asp Glu Pro Tyr Pro Arg Leu Val Asp Leu Asn  
 130 135 140

Leu Ala Gly Glu Pro Thr Glu Gly Ala Pro Val Ala Val Gln Arg Asp  
 145 150 155 160

Tyr Gly Phe Trp Cys Pro Arg Glu Leu Lys Ile Asp Pro Asp Leu Gly  
 165 170 175

Tyr Ser Phe Leu His Val Arg Asp Cys Ser Pro Pro Cys Pro Asn Met  
 180 185 190

Tyr Phe Arg Arg Glu Glu Leu Ser Phe Ala Arg Tyr  
 195 200

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Dominio Fri FZD3 humano

10

&lt;400&gt; 36

Gly His Ile Gly Gly His Ser Leu Phe Ser Cys Glu Pro Ile Thr Leu  
 1 5 10 15

Arg Met Cys Gln Asp Leu Pro Tyr Asn Thr Thr Phe Met Pro Asn Leu  
 20 25 30

Leu Asn His Tyr Asp Gln Gln Thr Ala Ala Leu Ala Met Glu Pro Phe  
 35 40 45

His Pro Met Val Asn Leu Asp Cys Ser Arg Asp Phe Arg Pro Phe Leu  
 50 55 60

Cys Ala Leu Tyr Ala Pro Ile Cys Met Glu Tyr Gly Arg Val Thr Leu  
 65 70 75 80

Pro Cys Arg Arg Leu Cys Gln Arg Ala Tyr Ser Glu Cys Ser Lys Leu  
 85 90 95

Met Glu Met Phe Gly Val Pro Trp Pro Glu Asp Met Glu Cys Ser Arg  
 100 105 110

Phe Pro Asp Cys Asp Glu Pro Tyr Pro Arg Leu Val Asp Leu  
 115 120 125

5 <210> 37  
 <211> 2001  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> FZD3 humano  
 <400> 37

atggctatga	cttggattgt	cttctcttt	tggcccttga	ctgtgttcat	ggggcatata	60
ggtgggcaca	gtttgttttc	ttgtgaacct	attaccttga	ggatgtgcca	agatttgcct	120
tataatacta	ctttcatgcc	taatcttctg	aatcattatg	accaacagac	agcagcttg	180
gcaatggagc	cattccaccc	tatggtaat	ctggattgtt	ctcgggattt	ccggcccttt	240
ctttgtcac	tctacgtcc	tatttgtatg	aatatggac	gtgtcacact	tccctgtcgt	300
aggctgtgtc	agcgggctta	cagtgagtgt	tcgaagctca	tggagatgtt	tggtgttcct	360
tggcctgaag	atatggaatg	cagtaggttc	ccagattgtg	atgagccata	tcctcgactt	420
gtggatctga	atttagctgg	agaaccaact	gaaggagccc	cagtggcagt	gcagagagac	480
tatggttttt	ggtgtccccg	agagttaaaa	attgatcctg	atctgggtta	ttctttctg	540
catgtgcgtg	attgttcacc	tccttgcacc	aatatgtact	tcagaagaga	agaactgtca	600
tttgctcgct	atttcatagg	attgattca	atcatttgcc	tctcgccac	attgttact	660
tttttaactt	tttgattga	tgtcacaaga	ttccgttatac	ctgaaaggcc	tattatattt	720
tatgcagtct	gctacatgat	ggtatcctta	atttcttca	ttggattttt	gcttgaagat	780

cgagtagcct	gcaatgcac	catccctgca	caatataagg	cttccacagt	gacacaagga	840
tctcataata	aaggctgtac	catgctttt	atgatactct	attttttac	tatggctggc	900
agtgtatgg	gggttaattct	taccatcaca	tggtttttag	cagctgtgcc	aaagtgggt	960
agtgaagcta	ttgagaagaa	agcattgctg	tttcacgcca	gtgcatgggg	catccccgga	1020
actctaacca	tcatcccttt	agcgatgaat	aaaattgaag	gtgacaatat	tagtggcgtg	1080
tgtttgtt	gcctctacga	tgttgatgca	ttgagatatt	ttgttcttgc	tccccctgc	1140
ctgtatgtgg	tagttgggt	ttctctcctc	tttagctggca	ttatatccct	aaacagagtt	1200
cgaattgaga	ttccattttaga	aaaggagaac	caagataaat	tagtgaagtt	tatgatccgg	1260
atcggtgttt	tcagcattct	ttatctcgta	ccactcttgg	ttgtaattgg	atgctacttt	1320
tatgagcaag	tttaccgggg	catctggaa	acaacgtgga	tacaagaacg	ctgcagagaa	1380
tatcacattc	catgtccata	tcaggttact	caaatgagtc	gtccagactt	gattctcttt	1440
ctgatgaaat	acctgatggc	tctcatagtt	ggcattccct	ctgtatttt	ggttggaagc	1500
aaaaagacat	gctttgaatg	ggccagtttt	tttcatggc	gttagaaaaaa	agagatagt	1560
aatgagagcc	gacaggtact	ccaggaacct	gatttgctc	agtctctcct	gagggatcca	1620
aatactccta	tcataagaaa	gtcaagggga	acttccactc	aaggaacatc	cacccatgct	1680
tcttcaactc	agctggctat	ggtggatgat	caaagaagca	aagcaggaag	catccacagc	1740
aaagtgagca	gctaccacgg	cagcctccac	agatcacgt	atggcaggta	cacgcctgc	1800
agttacagag	gaatggagga	gagactacct	catggcagca	tgtcacgact	aacagatcac	1860
tccaggcata	gtagttctca	tcggctcaat	gaacagtac	gacatagcag	catcagagat	1920
ctcagtaata	atcccatgac	tcatacaca	catggcacca	gcatgaatcg	ggttattgaa	1980
gaagatggaa	ccagtgccta	a				2001

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 540

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FZD4 humano

10

&lt;400&gt; 38

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

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

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		
Trp Met Ala Val Trp Ala Ser Leu Cys Phe Ile Ser Thr Ala Phe Thr		
225 230 235 240		
Val Leu Thr Phe Leu Ile Asp Ser Ser Arg Phe Ser Tyr Pro Glu Arg		
245 250 255		
Pro Ile Ile Phe Leu Ser Met Cys Tyr Asn Ile Tyr Ser Ile Ala Tyr		
260 265 270		
Ile Val Arg Leu Thr Val Gly Arg Glu Arg Ile Ser Cys Asp Phe Glu		
275 280 285		

Glu Ala Ala Glu Pro Val Leu Ile Gln Glu Gly Leu Lys Asn Thr Gly  
 290 295 300  
 Cys Ala Ile Ile Phe Leu Leu Met Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser  
 305 310 315 320  
 Ile Trp Trp Val Ile Leu Thr Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Leu  
 325 330 335  
 Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Met His Ser Ser Tyr Phe His Ile  
 340 345 350  
 Ala Ala Trp Ala Ile Pro Ala Val Lys Thr Ile Val Ile Leu Ile Met  
 355 360 365  
 Arg Leu Val Asp Ala Asp Glu Leu Thr Gly Leu Cys Tyr Val Gly Asn  
 370 375 380  
 Gln Asn Leu Asp Ala Leu Thr Gly Phe Val Val Ala Pro Leu Phe Thr  
 385 390 395 400  
 Tyr Leu Val Ile Gly Thr Leu Phe Ile Ala Ala Gly Leu Val Ala Leu  
 405 410 415  
 Phe Lys Ile Arg Ser Asn Leu Gln Lys Asp Gly Thr Lys Thr Asp Lys  
 420 425 430  
 Leu Glu Arg Leu Met Val Lys Ile Gly Val Phe Ser Val Leu Tyr Thr  
 435 440 445  
 Val Pro Ala Thr Cys Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Ile Ser Asn  
 450 455 460  
 Trp Ala Leu Phe Arg Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Asn Met Ala Val Glu  
 465 470 475 480  
 Met Leu Lys Ile Phe Met Ser Leu Leu Val Gly Ile Thr Ser Gly Met  
 485 490 495  
 Trp Ile Trp Ser Ala Lys Thr Leu His Thr Trp Gln Lys Cys Ser Asn  
 500 505 510  
 Arg Leu Val Asn Ser Gly Lys Val Lys Arg Glu Lys Arg Gly Asn Gly  
 515 520 525  
 Trp Val Lys Pro Gly Lys Gly Ser Glu Thr Val Val  
 530 535 540

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 224

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Dominio extracelular (DEC) de FZD4

5 &lt;400&gt; 39

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

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 131

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

10

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Dominio Fri de FZD4 humano

&lt;400&gt; 40

5

Phe	Gly	Asp	Glu	Glu	Glu	Arg	Arg	Cys	Asp	Pro	Ile	Arg	Ile	Ser	Met
1				5					10						15

Cys	Gln	Asn	Leu	Gly	Tyr	Asn	Val	Thr	Lys	Met	Pro	Asn	Leu	Val	Gly
							20	25							30

His	Glu	Leu	Gln	Thr	Asp	Ala	Glu	Leu	Gln	Leu	Thr	Thr	Phe	Thr	Pro
						35	40						45		

Leu	Ile	Gln	Tyr	Gly	Cys	Ser	Ser	Gln	Leu	Gln	Phe	Phe	Leu	Cys	Ser
						50	55				60				

Val	Tyr	Val	Pro	Met	Cys	Thr	Glu	Lys	Ile	Asn	Ile	Pro	Ile	Gly	Pro
65					70				75						80

Cys	Gly	Gly	Met	Cys	Leu	Ser	Val	Lys	Arg	Arg	Cys	Glu	Pro	Val	Leu
							85	90						95	

Lys	Glu	Phe	Gly	Phe	Ala	Trp	Pro	Glu	Ser	Leu	Asn	Cys	Ser	Lys	Phe
					100			105						110	

Pro	Pro	Gln	Asn	Asp	His	Asn	His	Met	Cys	Met	Glu	Gly	Pro	Gly	Asp
						115		120					125		

Glu	Glu	Val
		130

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 1623

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

10

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FZD4 humano

15

&lt;400&gt; 41

atgctggcca	tggcctggcg	gggcgcaggg	ccgagcgtcc	cggggggcgcc	cggggggcgtc	60
ggtctcagtc	tggggttgct	cctgcagttg	ctgctgctcc	tggggccggc	gcggggcttc	120

ggggacgagg aagagcggcg ctgcgacccc	180
tacaacgtga ccaagatgcc caacctgggtt	240
gggcacgagc tgcagacgga cgccgagctg	
cagctgacaa ctttcacacc gctcatccag tacggctgct	300
ccagccagct gcagttcttc	
cttggttctg tttatgtgcc aatgtgcaca gagaagatca	360
acatccccat tggcccatgc	
ggcggcatgt gtctttcagt caagagacgc tgcgaa	420
cccttacctc acaaaacccc catccagcct	
gggaaagagt gtcactctgt gggAACCAAT tctgatcagt	600
acatctgggt gaaaaggagc	
ctgaactgtg tgctcaagtg tggctatgat	660
gctggcttat acagccgctc agccaaggag	
ttcaactgata tctggatggc tgcgtggcc	720
agcctgtgtt tcatctccac tgccttcaca	
gtactgacct tcctgatcga ttcttctagg	780
ttttcctacc ctgagcgccc catcatattt	
ctcagttatgt gctataatat ttatagcatt	840
gcttatatttgc tcaaggctgac tgcgtggcc	
gaaaggatatt cctgtgattt tgaagaggca	900
gcagaacctg ttctcatcca agaaggactt	
aagaacacag gatgtgcaat aatttcttgc	960
ctgatgtact ttttggaaat ggccagctcc	
atttggtggg ttattctgac actcaacttgg	1020
tttttggcag caggactcaa atggggtcata	
gaagccattt gaaatgcacag ctcttatttc	1080
cacattgcag cctggccat ccccgagtg	
aaaaccattt tcatttttgc tatgagactg	1140
gtggatgcag atgaaactgac tggcttg	
tatgttggaa accaaaaatct cgatgccctc	1200
accgggttcg tggctggctcc ccttttact	
tatgttggca ttggaaacttt gttcattgct	1260
gcagggttgg tggcttggtt caaaaattcg	
tcaaatttttca aaaaggatgg gacaaagaca	1320
gacaagtttag aaagactgat ggtcaagatt	
gggggtttct cagttactgta cacagttcct	1380
gcaacgtgtg tgattgcctg ttatttttat	
gaaaatctcca actgggact ttttcggat	1440
tctgcagatg attccaaacat ggctgttga	
atgttggaaa ttgtttagtc ttgttggtg	1500
ggcatcaattt caggcatgtg gatgggtct	
gccaactc ttcacacgtg gcagaagtgt	1560
tccaaacagat tggtaattc tggaaaggta	
aagagagaga agagaggaaa tgggtgggtg	1620
aaggctggaa aaggcagtga gactgtggta	
taa	1623

5 <210> 42  
 <211> 585  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> FZD5 humano

<400> 42

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 Phe Ala Thr Phe Trp Ile Gly  
 225 230 235 240

Leu Trp Ser Val Leu Cys Phe Ile Ser Thr Ser Thr Thr Val Ala Thr  
 245 250 255

Phe Leu Ile Asp Met Glu Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile  
 260 265 270  
  
 Phe Leu Ser Ala Cys Tyr Leu Cys Val Ser Leu Gly Phe Leu Val Arg  
 275 280 285  
  
 Leu Val Val Gly His Ala Ser Val Ala Cys Ser Arg Glu His Asn His  
 290 295 300  
  
 Ile His Tyr Glu Thr Thr Gly Pro Ala Leu Cys Thr Ile Val Phe Leu  
 305 310 315 320  
  
 Leu Val Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile Leu  
 325 330 335  
  
 Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys Trp Gly Asn Glu Ala  
 340 345 350  
  
 Ile Ala Gly Tyr Ala Gln Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Leu Ile Pro  
 355 360 365  
  
 Ser Val Lys Ser Ile Thr Ala Leu Ala Leu Ser Ser Val Asp Gly Asp  
 370 375 380  
  
 Pro Val Ala Gly Ile Cys Tyr Val Gly Asn Gln Asn Leu Asn Ser Leu  
 385 390 395 400  
  
 Arg Gly Phe Val Leu Gly Pro Leu Val Leu Tyr Leu Leu Val Gly Thr  
 405 410 415  
  
 Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Ser Val  
 420 425 430  
  
 Ile Lys Gln Gly Gly Thr Lys Thr Asp Lys Leu Glu Lys Leu Met Ile  
 435 440 445  
  
 Arg Ile Gly Ile Phe Thr Leu Leu Tyr Thr Val Pro Ala Ser Ile Val  
 450 455 460  
  
 Val Ala Cys Tyr Leu Tyr Glu Gln His Tyr Arg Glu Ser Trp Glu Ala  
 465 470 475 480  
  
 Ala Leu Thr Cys Ala Cys Pro Gly His Asp Thr Gly Gln Pro Arg Ala  
 485 490 495  
  
 Lys Pro Glu Tyr Trp Val Leu Met Leu Lys Tyr Phe Met Cys Leu Val  
 500 505 510

Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Ile Trp Ser Gly Lys Thr Val Glu  
 515 520 525

Ser Trp Arg Arg Phe Thr Ser Arg Cys Cys Cys Arg Pro Arg Arg Gly  
 530 535 540

His Lys Ser Gly Gly Ala Met Ala Ala Gly Asp Tyr Pro Glu Ala Ser  
 545 550 555 560

Ala Ala Leu Thr Gly Arg Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Ala Thr Tyr  
 565 570 575

His Lys Gln Val Ser Leu Ser His Val  
 580 585

<210> 43

<211> 233

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio extracelular (DEC) de FZD5

10

<400> 43

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 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> 44

<211> 131

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio Fri de FZD5 humano

10

<400> 44

Ala Ser Lys Ala Pro Val Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg  
 1 5 10 15

Gly Ile Gly Tyr Asn Leu Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp  
 20 25 30

Thr Gln Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val  
 35 40 45

Glu Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr  
 50 55 60

Thr Pro Ile Cys Leu Pro Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg  
 65 70 75 80

Ser Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met Arg Gln  
 85 90 95

Tyr Gly Phe Ala Trp Pro Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg Leu Pro Val  
 100 105 110

Leu Gly Arg Asp Ala Glu Val Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Ser Glu  
 115 120 125

Ala Thr Thr  
 130

<210> 45

<211> 1758

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FZD5 humano

10 <400> 45

atggctcggc	ctgacccatc	cgcgccgccc	tcgctgttgc	tgctgctcct	ggcgagctg	60
gtgggcccggg	cggccgcgc	gtccaaggcc	ccggtgtgcc	aggaaatcac	ggtgcggcatg	120
tgccgcggca	tcggctacaa	cctgacgcac	atgcccacc	agttcaacca	cgacacgcag	180
gacgaggcgg	gcctggaggt	gcaccagttc	tggccgctgg	tggagatcca	atgctcgccg	240
gacctgcgt	tcttcctatg	ctctatgtac	acgcccattct	gtctgcccga	ctaccacaag	300
ccgctgcgc	cctgcgcgc	ggtgtgcag	cgcgcacaagg	ccggctgctc	ggcgctgtatg	360
cgccagtacg	gtttgcctg	gcccgcgc	atgagctgc	accgcctccc	gtgtctgggc	420
cgcgacgcg	aggtcctctg	catggattac	aaccgcagcg	aggccaccac	ggcgcccccc	480
aggcctttcc	cagccaagcc	cacccttcca	ggccgcgcag	gggcgcggc	ctcggggggc	540
gaatgccccg	ctgggggccc	gttcgtgtgc	aagtgtcg	agcccttcgt	gcccattctg	600
aaggagtac	acccgctcta	caacaagg	cgacgggccc	aggtgc	ctgcgcggta	660
ccctgctacc	agccgtcctt	cagtgcgc	gagcgcacgt	tcgcccac	ttggataggc	720
ctgtggtcgg	tgctgtgc	catctccac	tccaccac	tggccac	cctcatcgac	780
atgaaacgt	tccgctatcc	tgagcgcccc	atcatcttcc	tgtcagcctg	ctacctgtgc	840
gtgtcgctgg	gtttcctgg	gcgtctgg	gtggccatg	ccagcgtggc	ctgcagccgc	900
gagcacaacc	acatccacta	cgagaccac	ggccctgcac	tgtgcac	cgctttcctc	960
ctggtctact	tcttcggcat	ggccagctcc	atctggtgg	tcatcctgtc	gctcacctgg	1020
ttcctggccg	ccggcatgaa	gtggggcaac	gaggccatcg	cggtacgc	gcagtacttc	1080
cacctggctg	cgtggctcat	ccccagcg	aagtccatca	cgccactggc	gctgagctcc	1140
gtggacgggg	acccagtggc	cggcac	tacgtggca	accagaacct	gaactcgctg	1200
cgcggcttcg	tgctgggccc	gctggtgctc	tacctgtgg	tggcacgct	cttcctgt	1260

gcgggcttcg tgcgtcttt ccgcattccgc' agcgtcatca 'agcagggcgg caccaagacg 1320  
 gacaagctgg agaagctcat gatccgcattc ggcattttca cgctgctcta cacggcccc 1380  
 gccagcattg tggtggcctg ctacctgtac gagcagcact accgcgagag ctgggaggcg 1440  
 ggcgtcacct ggcctgccc gggccacgac accggccagc cgccgcggaa gcccggatc 1500  
 tgggtgctca tgctcaagta cttcatgtgc ctggtggtgg gcatcacgtc gggcgcttgg 1560  
 atctggtcgg gcaagacggt ggagtcgtgg cggcggttca ccagccgctg ctgctgccgc 1620  
 ccgcggcgcg gccacaagag cgggggcgcc atggccgcag gggactaccc cgaggcgagc 1680  
 gccgcgtca caggcaggac cggccgcgg ggcccccgg ccacctacca caagcagggtg 1740  
 tccctgtcgc acgtgtag 1758

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 706

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FZD6 humano

&lt;400&gt; 46

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 Phe  
 195 200 205

Cys Leu Cys Ala Thr Leu Phe Thr Phe Leu Thr Phe Leu Ile Asp Val  
 210 215 220

Arg Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Tyr Tyr Ser Val Cys  
 225 230 235 240

Tyr Ser Ile Val Ser Leu Met Tyr Phe Ile Gly Phe Leu Leu Gly Asp  
 245 250 255

Ser Thr Ala Cys Asn Lys Ala Asp Glu Lys Leu Glu Leu Gly Asp Thr  
 260 265 270

Val Val Leu Gly Ser Gln Asn Lys Ala Cys Thr Val Leu Phe Met Leu  
 275 280 285

Leu Tyr Phe Phe Thr Met Ala Gly Thr Val Trp Trp Val Ile Leu Thr  
 290 295 300

Ile Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Arg Lys Trp Ser Cys Glu Ala Ile  
 305 310 315 320

Glu Gln Lys Ala Val Trp Phe His Ala Val Ala Trp Gly Thr Pro Gly  
 325 330 335

Phe Leu Thr Val Met Leu Leu Ala Met Asn Lys Val Glu Gly Asp Asn  
 340 345 350 355

Ile Ser Gly Val Cys Phe Val Gly Leu Tyr Asp Leu Asp Ala Ser Arg  
 355 360 365

Tyr Phe Val Leu Leu Pro Leu Cys Leu Cys Val Phe Val Gly Leu Ser  
 370 375 380

Leu Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Leu Asn His Val Arg Gln Val Ile

385	390	395	400
Gln His Asp Gly Arg Asn Gln Glu Lys Leu Lys Lys Phe Met Ile Arg			
405 410 415			
Ile Gly Val Phe Ser Gly Leu Tyr Leu Val Pro Leu Val Thr Leu Leu			
420 425 430			
Gly Cys Tyr Val Tyr Glu Gln Val Asn Arg Ile Thr Trp Glu Ile Thr			
435 440 445			
Trp Val Ser Asp His Cys Arg Gln Tyr His Ile Pro Cys Pro Tyr Gln			
450 455 460			
Ala Lys Ala Lys Ala Arg Pro Glu Leu Ala Leu Phe Met Ile Lys Tyr			
465 470 475 480			
Leu Met Thr Leu Ile Val Gly Ile Ser Ala Val Phe Trp Val Gly Ser			
485 490 495			
Lys Lys Thr Cys Thr Glu Trp Ala Gly Phe Phe Lys Arg Asn Arg Lys			
500 505 510			
Arg Asp Pro Ile Ser Glu Ser Arg Arg Val Leu Gln Glu Ser Cys Glu			
515 520 525			
Phe Phe Leu Lys His Asn Ser Lys Val Lys His Lys Lys His Tyr			
530 535 540			
Lys Pro Ser Ser His Lys Leu Lys Val Ile Ser Lys Ser Met Gly Thr			
545 550 555 560			
Ser Thr Gly Ala Thr Ala Asn His Gly Thr Ser Ala Val Ala Ile Thr			
565 570 575			
Ser His Asp Tyr Leu Gly Gln Glu Thr Leu Thr Glu Ile Gln Thr Ser			
580 585 590			
Pro Glu Thr Ser Met Arg Glu Val Lys Ala Asp Gly Ala Ser Thr Pro			
595 600 605			
Arg Leu Arg Glu Gln Asp Cys Gly Glu Pro Ala Ser Pro Ala Ala Ser			
610 615 620			
Ile Ser Arg Leu Ser Gly Glu Gln Val Asp Gly Lys Gly Gln Ala Gly			
625 630 635 640			

Ser Val Ser Glu Ser Ala Arg Ser Glu Gly Arg Ile Ser Pro Lys Ser  
645 650 655

Asp Ile Thr Asp Thr Gly Leu Ala Gln Ser Asn Asn Leu Gln Val Pro  
660 665 670

Ser Ser Ser Glu Pro Ser Ser Leu Lys Gly Ser Thr Ser Leu Leu Val  
675 680 685

His Pro Val Ser Gly Val Arg Lys Glu Gln Gly Gly Cys His Ser  
690 695 700

Asp Thr  
705

<210> 47

<211> 207

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio extracelular (DEC) de FZD6

10

<400> 47

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

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 127

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Dominio Fri de FZD6 humano

10

&lt;400&gt; 48

His Ser Leu Phe Thr Cys Glu Pro Ile Thr Val Pro Arg Cys Met Lys  
 1 5 10 15

Met Ala Tyr Asn Met Thr Phe Phe Pro Asn Leu Met Gly His Tyr Asp  
 20 25 30

Gln Ser Ile Ala Ala Val Glu Met Glu His Phe Leu Pro Leu Ala Asn  
 35 40 45

Leu Glu Cys Ser Pro Asn Ile Glu Thr Phe Leu Cys Lys Ala Phe Val  
 50 55 60

Pro Thr Cys Ile Glu Gln Ile His Val Val Pro Pro Cys Arg Lys Leu  
 65 70 75 80

Cys Glu Lys Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr Phe Gly  
 85 90 95

Ile Arg Trp Pro Glu Glu Leu Glu Cys Asp Arg Leu Gln Tyr Cys Asp  
 100 105 110

Glu Thr Val Pro Val Thr Phe Asp Pro His Thr Glu Phe Leu Gly  
 115 120 125

15

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 2121

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

20

&lt;220&gt;

<223> FZD6 humano

<400> 49

atggaaatgt ttacattttt gttgacgtgt atttttctac ccctcctaag agggcacagt 60  
ctcttcacct gtgaaccaat tactgttccc agatgtatga aatggccta caacatgacg 120  
ttttcccta atctgatggg tcattatgac cagagtattg ccgcgggtgga aatggagcat 180  
tttcttcctc tcgcaaattct ggaatgttca ccaaacattt aactttcct ctgcaaagca 240  
tttgcaccaa cctgcataga acaaattcat gtggttccac cttgtcgtaa actttgtgag 300  
aaagtatatt ctgattgcaa aaaattaatt gacacttttggatccgatg gcctgaggag 360  
cttgcaccaatgtg acagattaca atactgtgat gagactgttc ctgtaacttt tgatccacac 420  
acagaatttc ttggcctca gaagaaaaca gaacaagtcc aaagagacat tggattttgg 480  
tgtccaaggc atcttaagac ttctggggca caaggatata agtttctggg aattgaccag 540  
tgtgcgcctc catgccccaa catgtatattt aaaagtgtatg agcttagagtt tgcaaaaaagt 600  
tttattggaa cagttcaat atttgtctt tgtcaactc tgttcacatt ccttactttt 660  
ttaattgtatg tttagaagatt cagataccca gagagaccaa ttatataattt ctctgtctgt 720  
tacagcatttgc tatctcttgcgtacttcatt ggattttgc taggcgatag cacagcctgc 780  
aataaggcag atgagaagct agaacttggt gacactgttgc ttcttaggctc tcaaaaataag 840  
gcttgcaccg ttttgcatttgcgtat ttttcaccaa tggctggcac tgtgtgggg 900  
gtgattctta ccattacttgcgttgcatttgcgtat gcaaggaaatggatggatggatggccatc 960  
gagcaaaaag cagtgtggtt tcatgctgtt gcatggggaa caccaggatggtgcactgtt 1020  
atgcttcttgcgtat gcaaggaaatggatggatggatggccatc 1080  
ctttatgacc tggatgcttc tcgctacttttgcgtat gcatgttgcactgttgcgtat 1140  
gttgggcatttgcgtat gcatgttgcactgttgcgtat gcaaggatggatggatggccatc 1200  
caacatgtatg gcccggacca agaaaaacta aagaaatttgcgtat gcatgttgcactgttgcgtat 1260  
agcggcttgcgtat gcatgttgcactgttgcgtat gcaaggatggatggatggccatc 1320  
aacaggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggccatc 1380  
tgccttgcgtat gcatgttgcactgttgcgtat gcaaggatggatggatggccatc 1440  
ctgatgacat taaatgttgg catctctgcgtat gcatgttgcactgttgcgtat gcaaggatggatggccatc 1500  
acagaatggatggatggatggatggatggatggatggatggccatc 1560  
agagtactac aggaatcatg tgatggatggatggatggatggatggccatc 1620  
aagaagcact ataaaccaag ttcacacaag ctgaaatgtca tttccaaatc catggggaccc 1680

agcacaggag ctacagcaaa tcatggcact tctgcagtag caattactag ccatgattac 1740  
 ctaggacaag aaactttgac agaaatccaa acctcaccag aaacatcaat gagagaggta 1800  
 aaagcggacg gagctagcac ccccaggtta agagaacagg actgtggtga acctgcctcg 1860  
 ccagcagcat ccatctccag actctctggg gaacaggtcg acgggaaggg ccaggcaggc 1920  
 agtgtatctg aaagtgcgcg gagtgaagga aggattagtc caaagagtga tattactgac 1980  
 actggcctgg cacagagcaa caatggcag gtccccagtt cttcagaacc aagcagcctc 2040  
 aaaggttcca catctctgct tgttcacccg gtttcaggag tgagaaaaga gcagggaggt 2100  
 gttgtcatt cagatacttg a 2121

5 <210> 50  
 <211> 574  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 10 <220>  
 <223> FZD7 humano  
 <400> 50

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

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

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

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

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

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

Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val  
 100 105 110

Leu Asp Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg  
 115 120 125

Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu  
 130 135 140

Arg Leu Arg Cys Glu Asn Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Ile Cys  
 145 150 155 160  
 Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly Ser Gly Gly Pro Gly Gly 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 Trp  
 245 250 255  
 Val Gly Val Trp Ser Val Leu Cys Cys Ala Ser Thr Leu Phe Thr Val  
 260 265 270  
 Leu Thr Tyr Leu Val Asp Met Arg Arg Phe Ser Tyr Pro Glu Arg Pro  
 275 280 285  
 Ile Ile Phe Leu Ser Gly Cys Tyr Phe Met Val Ala Val Ala His Val  
 290 295 300  
 Ala Gly Phe Leu Leu Glu Asp Arg Ala Val Cys Val Glu Arg Phe Ser  
 305 310 315 320  
 Asp Asp Gly Tyr Arg Thr Val Ala Gln Gly Thr Lys Lys Glu Gly Cys  
 325 330 335  
 Thr Ile Leu Phe Met Val Leu Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile  
 340 345 350  
 Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys  
 355 360 365  
 Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser Gln Tyr Phe His Leu Ala  
 370 375 380  
 Ala Trp Ala Val Pro Ala Val Lys Thr Ile Thr Ile Leu Ala Met Gly  
 385 390 395 400

Gln Val Asp Gly Asp Leu Leu Ser Gly Val Cys Tyr Val Gly Leu Ser  
 405 410 415

Ser Val Asp Ala Leu Arg Gly Phe Val Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr  
 420 425 430

Leu Phe Ile Gly Thr Ser Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe  
 435 440 445

Arg Ile Arg Thr Ile Met Lys His Asp Gly Thr Lys Thr Glu Lys Leu  
 450 455 460

Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Val Phe Ser Val Leu Tyr Thr Val  
 465 470 475 480

Pro Ala Thr Ile Val Leu Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Gln Ala Phe Arg  
 485 490 495

Glu His Trp Glu Arg Thr Trp Leu Leu Gln Thr Cys Lys Ser Tyr Ala  
 500 505 510

Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Pro Pro Met Ser Pro Asp Phe Thr  
 515 520 525

Val Phe Met Ile Lys Tyr Leu Met Thr Met Ile Val Gly Ile Thr Thr  
 530 535 540

Gly Phe Trp Ile Trp Ser Gly Lys Thr Leu Gln Ser Trp Arg Arg Phe  
 545 550 555 560

Tyr His Arg Leu Ser His Ser Ser Lys Gly Glu Thr Ala Val  
 565 570

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 255

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Dominio extracelular (DEC) de FZD7

10

&lt;400&gt; 51

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

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

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

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

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

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

Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val  
 100 105 110

Leu Asp Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg  
 115 120 125

Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu  
 130 135 140

Arg Leu Arg Cys Glu Asn Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Ile Cys  
 145 150 155 160

Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly Ser Gly Gly Pro Gly Gly 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 Arg Arg Phe Ala Arg Leu  
 245 250 255

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 139

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Dominio Fri de FZD7 humano

5

10

&lt;400&gt; 52

Ala Gln Pro Tyr His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Val Pro Asp His Gly  
 1 5 10 15

Phe Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn  
 20 25 30

Gln Thr Ile Leu Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala  
 35 40 45

Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser  
 50 55 60

Pro Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr  
 65 70 75 80

Val Leu Asp Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala  
 85 90 95

Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro  
 100 105 110

Glu Arg Leu Arg Cys Glu Asn Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Ile  
 115 120 125

Cys Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly Ser Gly  
 130 135

<210> 53  
 <211> 1725  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> FZD7 humano

5  
10

<400> 53

atgcgggacc	ccggcgcggc	cgctccgctt	tcgtccctgg	gcctctgtgc	cctggtgctg	60
gcgctgctgg	gcmcactgtc	cgcgccgcgc	ggggcgcagc	cgtaaccacgg	agagaaggc	120
atctccgtgc	cggaccacgg	cttctgccag	cccatctcca	tcccgctgtg	cacggacatc	180
gcctacaacc	agaccatcct	gcccaacctg	ctggggccaca	cgaaccaaga	ggacgcggc	240
ctcgaggtgc	accagttcta	cccgcgtgtg	aaggtgcagt	gttctcccga	actccgctt	300
ttcttatgct	ccatgtatgc	gcccgtgtgc	accgtgctcg	atcaggccat	cccgccgtgt	360
cgttctctgt	gcgagcgcgc	ccgccagggc	tgcgaggcgc	tcatgaacaa	gttcggcttc	420
cagtggcccg	agcggctgcg	ctgcgagaac	ttccccgtgc	acggtgccgg	cgagatctgc	480

gtgggccaga	acacgtcaga	cggctccggg	ggcccaggcg	gcggcccccac	tgcctaccct	540
accgcgcct	acctgccgga	cctgccttc	accgcgtgc	ccccgggggc	ctcagatggc	600
agggggcgtc	ccgccttccc	cttctcatgc	ccccgtcagc	tcaaggtgcc	cccgtacctg	660
ggctaccgct	tcctgggtga	gcgcgattgt	ggcgccccgt	gcaaccggg	ccgtgccaac	720
ggcctgatgt	actttaagga	ggaggagagg	cgcttcgccc	gcctctgggt	gggcgtgtgg	780
tccgtgctgt	gctgcgcctc	gacgctctt	accgttctca	cctacctgggt	ggacatgcgg	840
cgcttcagct	acccagagcg	gcccatcatc	ttcctgtcgg	gctgctactt	catggtgccc	900
gtggcgcacg	tggccggctt	ccittctagag	gaccgcgcgg	tgtgcgtgga	gcgcttctcg	960
gacgatggct	accgcacggt	ggcgcagggc	accaagaagg	agggctgcac	catcctcttc	1020
atggtgctct	acttcttcgg	catggccagc	tccatctgggt	gggtcattct	gtctctca	1080
tggttcctgg	cggccggcat	gaagtggggc	cacgaggcca	tcgaggccaa	ctcgca	1140
ttccacctgg	ccgcgtggc	cgtcccccc	gtcaagacca	tcaactatcct	ggccatggc	1200
caggttagacg	gggacctgct	gagcggggtg	tgctacgttg	gcctctccag	tgtggacgcg	1260
ctgcggggct	tcgtgctggc	gcctctgttc	gtctacctct	tcataggcac	gtccttcttg	1320
ctggccggct	tcgtgtccct	cttccgtatc	cgcaccatca	tgaaacacga	cggcacca	1380
accgagaagc	tggagaagct	catggtgccgc	atcggcgtct	tcagcgtgct	ctacacagtg	1440
ccgcacccacca	tcgtcctggc	ctgctacttc	tacgagcagg	ccttccgcga	gcactgggag	1500
cgcacccatggc	tcctgcagac	gtcaagagc	tatgccgtgc	cctgcccgc	cggccacttc	1560
ccgcccattga	gccccgactt	caccgtcttc	atgatcaagt	acctgatgac	catgatgtc	1620
ggcatcacca	ctggcttctg	gatctggtcg	ggcaagaccc	tgcagtcgtg	gcccgc	1680
taccacagac	ttagccacag	cagcaagggg	gagactgcgg	tatga		1725

5 <210> 54  
 <211> 694  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> FZD8 humano  
 <400> 54

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 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	Ala	Ala
145					150					155				160	
Pro	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Gly	Glu	Gln	Pro	
165						170							175		
Pro	Ser	Gly	Ser	Gly	His	Gly	Arg	Pro	Pro	Gly	Ala	Arg	Pro	Pro	His
180						185								190	
Arg	Gly	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	Ala	Ala	Ala	Pro	Pro
195					200								205		
Ala	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Lys	Ala	Arg	Pro	Pro	Gly	Gly		
210					215								220		
Ala	Ala	Pro	Cys	Glu	Pro	Gly	Cys	Gln	Cys	Arg	Ala	Pro	Met	Val	Ser
225					230			235						240	
Val	Ser	Ser	Glu	Arg	His	Pro	Leu	Tyr	Asn	Arg	Val	Lys	Thr	Gly	Gln
245						250							255		
Ile	Ala	Asn	Cys	Ala	Leu	Pro	Cys	His	Asn	Pro	Phe	Phe	Ser	Gln	Asp
260						265							270		
Glu	Arg	Ala	Phe	Thr	Val	Phe	Trp	Ile	Gly	Leu	Trp	Ser	Val	Leu	Cys
275					280								285		

Phe Val Ser Thr Phe Ala Thr Val Ser Thr Phe Leu Ile Asp Met Glu  
 290 295 300  
 Arg Phe Lys Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Ala Cys Tyr  
 305 310 315 320  
 Leu Phe Val Ser Val Gly Tyr Leu Val Arg Leu Val Ala Gly His Glu  
 325 330 335  
 Lys Val Ala Cys Ser Gly Gly Ala Pro Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly  
 340 345 350  
 Ala Gly Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly  
 355 360 365  
 Gly Pro Gly Gly Arg Gly Glu Tyr Glu Glu Leu Gly Ala Val Glu Gln  
 370 375 380  
 His Val Arg Tyr Glu Thr Thr Gly Pro Ala Leu Cys Thr Val Val Phe  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Val Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile  
 405 410 415  
 Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys Trp Gly Asn Glu  
 420 425 430  
 Ala Ile Ala Gly Tyr Ser Gln Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Leu Val  
 435 440 445  
 Pro Ser Val Lys Ser Ile Ala Val Leu Ala Leu Ser Ser Val Asp Gly  
 450 455 460  
 Asp Pro Val Ala Gly Ile Cys Tyr Val Gly Asn Gln Ser Leu Asp Asn  
 465 470 475 480  
 Leu Arg Gly Phe Val Leu Ala Pro Leu Val Ile Tyr Leu Phe Ile Gly  
 485 490 495  
 Thr Met Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Ser  
 500 505 510  
 Val Ile Lys Gln Gln Asp Gly Pro Thr Lys Thr His Lys Leu Glu Lys  
 515 520 525  
 Leu Met Ile Arg Leu Gly Leu Phe Thr Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala  
 530 535 540

Ala Val Val Val Ala Cys Leu Phe Tyr Glu Gln His Asn Arg Pro Arg  
 545 550 555 560  
 Trp Glu Ala Thr His Asn Cys Pro Cys Leu Arg Asp Leu Gln Pro Asp  
 565 570 575  
 Gln Ala Arg Arg Pro Asp Tyr Ala Val Phe Met Leu Lys Tyr Phe Met  
 580 585 590  
 Cys Leu Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Val Trp Ser Gly Lys  
 595 600 605  
 Thr Leu Glu Ser Trp Arg Ser Leu Cys Thr Arg Cys Cys Trp Ala Ser  
 610 615 620  
 Lys Gly Ala Ala Val Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ala Ala Gly Gly  
 625 630 635 640  
 Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly  
 645 650 655  
 Gly Pro Gly Gly Gly Ser Leu Tyr Ser Asp Val Ser Thr Gly  
 660 665 670  
 Leu Thr Trp Arg Ser Gly Thr Ala Ser Ser Val Ser Tyr Pro Lys Gln  
 675 680 685  
 Met Pro Leu Ser Gln Val  
 690

<210> 55  
 <211> 277  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Dominio extracelular (DEC) de FZD8

10 <400> 55

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 Ala Ala  
 145 150 155 160

Pro Ser Pro Pro Arg Arg Leu Pro Pro Pro Pro Gly Glu Gln Pro  
 165 170 175

Pro Ser Gly Ser Gly His Gly Arg Pro Pro Gly Ala Arg Pro Pro His  
 180 185 190

Arg Gly Gly Gly Arg Gly Gly Gly Gly Asp Ala Ala Ala Pro Pro  
 195 200 205

Ala Arg Gly Gly Gly Gly Gly Lys Ala Arg Pro Pro Gly Gly Gly  
 210 215 220

Ala Ala Pro Cys Glu Pro Gly Cys Gln Cys Arg Ala Pro Met Val Ser  
 225 230 235 240

Val Ser Ser Glu Arg His Pro Leu Tyr Asn Arg Val Lys Thr Gly Gln  
 245 250 255

Ile Ala Asn Cys Ala Leu Pro Cys His Asn Pro Phe Phe Ser Gln Asp  
 260 265 270

Glu Arg Ala Phe Thr  
 275

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 131

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Dominio Fri de FZD8 humano

&lt;400&gt; 56

Ala Ser Ala Lys Glu Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys  
 1 5 10 15

Lys Gly Ile Gly Tyr Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His  
 20 25 30

Asp Thr Gln Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu  
 35 40 45

Val Glu Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met  
 50 55 60

Tyr Thr Pro Ile Cys Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys  
 65 70 75 80

Arg Ser Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg  
 85 90 95

Gln Tyr Gly Phe Ala Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro  
 100 105 110

Glu Gln Gly Asn Pro Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp  
 115 120 125

Leu Thr Thr  
 130

5           <210> 57  
 <211> 2085  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10          <220>  
 <223> FZD8 humano  
 <400> 57

atggagtgcc gttacctgtt ggaagtgacc tcgctgtgg ccgccttggc gctgctgcag 60  
 cgctctagcg gcgctgcggc cgccctggcc aaggagctgg catgccaaga gatcaccgtg 120  
 ccgctgtgta agggcatcg ctacaactac acctacatgc ccaatcagtt caaccacgac 180  
 acgcaagacg aggcgggcct ggaggtgcac cagttctggc cgctggtgg aatccagtgc 240  
 tcgcccgatc tcaagttctt cctgtgcagc atgtacacgc ccatctgcct agaggactac 300  
 aagaagccgc tgccgcccgtt ccgctcggtg tgcgagcgcg ccaaggccgg ctgcgcgcg 360

ctcatgcgcc	agtacggctt	cgccctggccc	gaccgcatgc	gctgcgaccg	gctgcccag	420
caaggcaacc	ctgacacgct	gtgcacatggac	tacaaccgca	ccgacctaac	caccgcccgc	480
cccagccccgc	cgcgcccgcct	gccgcccgcgc	ccgcccggcg	agcagccgccc	ttcgggcagc	540
ggccacggcc	gcccggccgg	ggccaggccc	ccgcacccgc	gaggcggcag	gggcgggtggc	600
ggcggggacg	cggcggcgcc	cccagctcgc	ggcggcggcg	gtggcgggaa	ggcgcggccc	660
cctggcggcg	gcgcggctcc	ctgcgagccc	gggtgccagt	gccgcgcgccc	tatggtggc	720
gtgtccagcg	agcgcacccc	gctctacaac	cgcgtcaaga	caggccagat	cgctaactgc	780
gcgcgtccct	gccacaaccc	cttttcagc	caggacgagc	gcgccttcac	cgtttctgg	840
atcggcctgt	ggtcggtgct	ctgcgttcgt	tccacccctcg	ccaccgtctc	cacccctt	900
atcgacatgg	agcgcttcaa	gtacccggag	cggccattta	tccctctctc	ggcctgtac	960
ctttcgtgt	cggtgggcta	cctagtgcgc	ctgggtggcg	gccacgagaa	ggtggcgtgc	1020
agcggtggcg	cgcggggcgc	ggggggcgct	ggggggcgcg	gcggcgcggc	ggcggggcg	1080
ggcgcggcg	gcgcgggcgc	gggcggcccg	ggcggcgcgc	gcgagtcgaa	ggagctggc	1140
gcggtggagc	agcacgtgcg	ctacgagacc	accggccccc	cgtgtgcac	cgtggcttc	1200
ttgctggtct	acttcttcgg	catggccagc	tccatctgg	gggtgatctt	gtcgctcaca	1260
tggttcctgg	cggccggtat	gaagtggggc	aacgaagcca	tcgcggcta	ctcgcaagtac	1320
ttccacctgg	ccgcgtggct	tgtgcccagc	gtcaagtcca	tcgcgtgt	ggcgcctcagc	1380
tcgggtggacg	gcgacccgg	ggcgggcatac	tgctacgtgg	gcaaccagag	cctggacaac	1440
ctgcgcggct	tcgtgtggc	gccgcgtggc	atctacctct	tcatcggcac	catgttccctg	1500
ctggccggct	tcgtgtccct	gttccgcatac	cgctcggta	tcaagcaaca	ggacggcccc	1560
accaagacgc	acaagctgga	gaagctgatg	atccgcctgg	gcctgttac	cgtgtctac	1620
accgtgccc	ccgcgggtgg	ggtcgcctgc	ctttctacg	agcagcacaa	ccgcggcg	1680
tgggaggcca	cgcacaactg	cccgtgcctg	cgggacctgc	agcccgacca	ggcacgcagg	1740
cccgactacg	ccgtcttcat	gctcaagtac	ttcatgtgcc	tagtggtggg	catcacctcg	1800
ggcgtgtgg	tctggtccgg	caagacgtg	gagtcctggc	gctccctgt	cacccgctgc	1860
tgctgggcca	gcaagggcgc	cgcgggtggc	ggggggcgcg	gcgcacggc	cgcggggggt	1920
ggcggcgggc	cggggggcg	cggcggcg	ggacccggcg	gcggcggggg	gccgggccc	1980
ggcgggggct	ccctctacag	cgacgtcagc	actggcctga	cgtggcggtc	gggcacggcg	2040
agctccgtgt	cttatccaaa	gcagatgcca	ttgtccagg	tctga		2085

<210> 58  
 <211> 591  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> FZD9 humano  
 <400> 58

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

Ala Ala Gly Gly Ala Ala Leu Glu Ile Gly Arg Phe Asp Pro Glu Arg  
 20 25 30

Gly Arg Gly Ala Ala Pro Cys Gln Ala Val Glu Ile Pro Met Cys Arg  
 35 40 45

Gly Ile Gly Tyr Asn Leu Thr Arg Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr  
 50 55 60

Ser Gln Gly Glu Ala Ala Glu Leu Ala Glu Phe Ala Pro Leu Val  
 65 70 75 80

Gln Tyr Gly Cys His Ser His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr  
 85 90 95

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

Pro Met Cys Glu Gln Ala Arg Leu Arg Cys Ala Pro Ile Met Glu Gln  
 115 120 125

Phe Asn Phe Gly Trp Pro Asp Ser Leu Asp Cys Ala Arg Leu Pro Thr  
 130 135 140

Arg Asn Asp Pro His Ala Leu Cys Met Glu Ala Pro Glu Asn Ala Thr  
 145 150 155 160

Ala Gly Pro Ala Glu Pro His Lys Gly Leu Gly Met Leu Pro Val Ala  
 165 170 175

Pro Arg Pro Ala Arg Pro Pro Gly Asp Leu Gly Pro Gly Ala Gly Gly  
 180 185 190

Ser Gly Thr Cys Glu Asn Pro Glu Lys Phe Gln Tyr Val Glu Lys Ser  
 195 200 205

Arg Ser Cys Ala Pro Arg Cys Gly Pro Gly Val Glu Val Phe Trp Ser  
 210 215 220

Arg Arg Asp Lys Asp Phe Ala Leu Val Trp Met Ala Val Trp Ser Ala  
 225 230 235 240  
 Leu Cys Phe Phe Ser Thr Ala Phe Thr Val Leu Thr Phe Leu Leu Glu  
 245 250 255  
 Pro His Arg Phe Gln Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Met  
 260 265 270  
 Cys Tyr Asn Val Tyr Ser Leu Ala Phe Leu Ile Arg Ala Val Ala Gly  
 275 280 285  
 Ala Gln Ser Val Ala Cys Asp Gln Glu Ala Gly Ala Leu Tyr Val Ile  
 290 295 300  
 Gln Glu Gly Leu Glu Asn Thr Gly Cys Thr Leu Val Phe Leu Leu Leu  
 305 310 315 320  
 Tyr Tyr Phe Gly Met Ala Ser Ser Leu Trp Trp Val Val Leu Thr Leu  
 325 330 335  
 Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Lys Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu  
 340 345 350  
 Ala His Gly Ser Tyr Phe His Met Ala Ala Trp Gly Leu Pro Ala Leu  
 355 360 365  
 Lys Thr Ile Val Ile Leu Thr Leu Arg Lys Val Ala Gly Asp Glu Leu  
 370 375 380  
 Thr Gly Leu Cys Tyr Val Ala Ser Thr Asp Ala Ala Ala Leu Thr Gly  
 385 390 395 400  
 Phe Val Leu Val Pro Leu Ser Gly Tyr Leu Val Leu Gly Ser Ser Phe  
 405 410 415  
 Leu Leu Thr Gly Phe Val Ala Leu Phe His Ile Arg Lys Ile Met Lys  
 420 425 430  
 Thr Gly Gly Thr Asn Thr Glu Lys Leu Glu Lys Leu Met Val Lys Ile  
 435 440 445  
 Gly Val Phe Ser Ile Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Cys Val Ile Val  
 450 455 460  
 Cys Tyr Val Tyr Glu Arg Leu Asn Met Asp Phe Trp Arg Leu Arg Ala  
 465 470 475 480

Thr Glu Gln Pro Cys Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gly Arg Arg Asp  
 485 490 495

Cys Ser Leu Pro Gly Gly Ser Val Pro Thr Val Ala Val Phe Met Leu  
 500 505 510

Lys Ile Phe Met Ser Leu Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Val  
 515 520 525

Trp Ser Ser Lys Thr Phe Gln Thr Trp Gln Ser Leu Cys Tyr Arg Lys  
 530 535 540

Ile Ala Ala Gly Arg Ala Arg Ala Lys Ala Cys Arg Ala Pro Gly Ser  
 545 550 555 560

Tyr Gly Arg Gly Thr His Cys His Tyr Lys Ala Pro Thr Val Val Leu  
 565 570 575

His Met Thr Lys Thr Asp Pro Ser Leu Glu Asn Pro Thr His Leu  
 580 585 590

<210> 59

<211> 230

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio extracelular (DEC) de FZD9

10

<400> 59

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

Ala Ala Gly Gly Ala Ala Leu Glu Ile Gly Arg Phe Asp Pro Glu Arg  
 20 25 30

Gly Arg Gly Ala Ala Pro Cys Gln Ala Val Glu Ile Pro Met Cys Arg  
 35 40 45

Gly Ile Gly Tyr Asn Leu Thr Arg Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr  
 50 55 60

Ser Gln Gly Glu Ala Ala Ala Glu Leu Ala Glu Phe Ala Pro Leu Val  
 65 70 75 80

Gln Tyr Gly Cys His Ser His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr  
 85 90 95

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

Pro Met Cys Glu Gln Ala Arg Leu Arg Cys Ala Pro Ile Met Glu Gln  
115 120 125

Phe Asn Phe Gly Trp Pro Asp Ser Leu Asp Cys Ala Arg Leu Pro Thr  
130 135 140

Arg Asn Asp Pro His Ala Leu Cys Met Glu Ala Pro Glu Asn Ala Thr  
145 150 155 160

Ala Gly Pro Ala Glu Pro His Lys Gly Leu Gly Met Leu Pro Val Ala  
165 170 175

Pro Arg Pro Ala Arg Pro Pro Gly Asp Leu Gly Pro Gly Ala Gly Gly  
180 185 190

Ser Gly Thr Cys Glu Asn Pro Glu Lys Phe Gln Tyr Val Glu Lys Ser  
195 200 205

Arg Ser Cys Ala Pro Arg Cys Gly Pro Gly Val Glu Val Phe Trp Ser  
210 215 220

Arg Arg Asp Lys Asp Phe  
225 230

<210> 60

<211> 137

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio Fri de FZD9 humano

10 <400> 60

Leu Glu Ile Gly Arg Phe Asp Pro Glu Arg Gly Arg Gly Ala Ala Pro  
1 5 10 15

Cys Gln Ala Val Glu Ile Pro Met Cys Arg Gly Ile Gly Tyr Asn Leu  
20 25 30

Thr Arg Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Ser Gln Gly Glu Ala Ala  
35 40 45

Ala Glu Leu Ala Glu Phe Ala Pro Leu Val Gln Tyr Gly Cys His Ser  
50 55 60

His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr Asp

65	70	75	80
Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Pro Met Cys Glu Gln Ala			
85	90	95	
Arg Leu Arg Cys Ala Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Gly Trp Pro			
100	105	110	
Asp Ser Leu Asp Cys Ala Arg Leu Pro Thr Arg Asn Asp Pro His Ala			
115	120	125	
Leu Cys Met Glu Ala Pro Glu Asn Ala			
130	135		

<210> 61  
<211> 1776  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> FZD9 humano  
<400> 61

atggccgtgg	cgccctctgcg	gggggcgctg	ctgctgtggc	agctgctggc	ggcggggcggc	60
gcggcactgg	agatcggccg	cttcgacccg	gagcgcgggc	gcggggctgc	gccgtgccag	120
gcggtggaga	tccccatgtg	ccgcggcattc	ggctacaacc	tgacccgcatt	gccccaaacctg	180
ctggggccaca	cgtcgacagg	cgaggcggct	gccgagctag	cggagttcgc	gccgctgggt	240
cagtacggct	gccacagcca	cctgcgcattc	ttcctgtgct	cgctctacgc	gccccatgtgc	300
accgaccagg	tctcgacgcc	cattcccgcc	tgccggccca	tgtgcgagca	ggcgcgcctg	360
cgctgcgcgc	ccatcatatgg	gcagttcaac	ttcggctggc	cggactcgct	cgactgcgc	420
cggctgcccc	cgcgcaacga	ccgcacgcg	ctgtgcattgg	aggcgccccg	gaacgcccacg	480
gccggccccg	cggagcccc	caagggcctg	ggcatgctgc	ccgtggcgcc	gcggcccccg	540
cgcctcccg	gagacctggg	cccgggcgcg	ggcggcagtg	gcacctgcga	gaaccccgag	600
aagttccagt	acgtggagaa	gagccgctcg	tgcgcaccgc	gctgcgggccc	cggcgctcgag	660
gtgttctgg	cccgccgcga	caaggacttc	gcgcgttgtct	ggatggccgt	gtggtcggcg	720
ctgtgtttct	tctccaccgc	ttcactgtg	ctcaccttct	tgctggagcc	ccaccgcattc	780
cagtaccccg	agcgccccat	catcttcctc	tccatgtgct	acaacgtcta	ctcgctggcc	840
ttcctgatcc	gtgcgggtggc	cggagcgcag	agcgtggcct	tgaccaggaa	ggcggggcgcg	900
ctctacgtga	tccaggaggg	cctggagaac	acgggctgca	cgctggtctt	cctactgctc	960
tactacttcg	gcatggccag	ctcgctctgg	tgggtggtcc	tgacgctcac	ctggttccctg	1020
qctocccqqqa	aaaaatqqqq	ccacqaaqqcc	atcqaaqqccc	acqcaqcta	tttccacatq	1080

gctgcctggg gcctgcccgc gctcaagacc atcgtcatcc tgaccctgcg caaggtggcg 1140  
 ggtgatgagc tgactgggct ttgctacgtg gccagcacgg atgcagcagc gctcacggc 1200  
 ttcgtgctgg tgccccctc tcggctacctg gtgctggca gtagtttccct cctgaccggc 1260  
 ttcgtggccc tcttccacat ccgcaagatc atgaagacgg gcggcaccaa cacagagaag 1320  
 ctggagaagc tcataggtaa gatcggggtc ttctccatcc tctacacggt gcccgcacc 1380  
 tgcgtcatcg tttgctatgt ctacgaacgc ctcaacatgg acttctggcg ctttcgggccc 1440  
 acagagcagc catgcgcagc ggccgcgggg cccggaggcc ggagggactg ctcgctgcca 1500  
 gggggctcg gccccaccgt ggccgtcttc atgctaaaaa ttttcatgtc actgggttg 1560  
 gggatcacca gcggcgtctg ggtgtggagc tccaagactt tccagacctg gcagagcctg 1620  
 tgctaccgca agatagcagc tggccgggccc cgggccaagg cctgcccgc ccccccggagc 1680  
 tacggacgtg gcacgcactg ccactataag gctcccaccg tggtcttgca catgactaag 1740  
 acggaccctt ctttgagaa ccccacacac ctctag 1776

5 <210> 62  
 <211> 581  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> FZD10 humano  
 <400> 62

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 Cys  
 180 185 190

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

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

Arg Phe Ala Val Val Trp Leu Ala Ile Trp Ala Val Leu Cys Phe Phe  
 225 230 235 240

Ser Ser Ala Phe Thr Val Leu Thr Phe Leu Ile Asp Pro Ala Arg Phe  
 245 250 255

Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Met Cys Tyr Cys Val  
 260 265 270

Tyr Ser Val Gly Tyr Leu Ile Arg Leu Phe Ala Gly Ala Glu Ser Ile  
 275 280 285

Ala Cys Asp Arg Asp Ser Gly Gln Leu Tyr Val Ile Gln Glu Gly Leu  
 290 295 300

Glu Ser Thr Gly Cys Thr Leu Val Phe Leu Val Leu Tyr Tyr Phe Gly  
 305 310 315 320

Met Ala Ser Ser Leu Trp Trp Val Val Leu Thr Leu Thr Trp Phe Leu  
 325 330 335

Ala Ala Gly Lys Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser Ser  
 340 345 350

Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Ala Ile Pro Ala Val Lys Thr Ile Leu  
 355 360 365

Ile Leu Val Met Arg Arg Val Ala Gly Asp Glu Leu Thr Gly Val Cys  
 370 375 380  
 Tyr Val Gly Ser Met Asp Val Asn Ala Leu Thr Gly Phe Val Leu Ile  
 385 390 395 400  
 Pro Leu Ala Cys Tyr Leu Val Ile Gly Thr Ser Phe Ile Leu Ser Gly  
 405 410 415  
 Phe Val Ala Leu Phe His Ile Arg Arg Val Met Lys Thr Gly Gly Glu  
 420 425 430  
 Asn Thr Asp Lys Leu Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Leu Phe Ser  
 435 440 445  
 Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Cys Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr  
 450 455 460  
 Glu Arg Leu Asn Met Asp Tyr Trp Lys Ile Leu Ala Ala Gln His Lys  
 465 470 475 480  
 Cys Lys Met Asn Asn Gln Thr Lys Thr Leu Asp Cys Leu Met Ala Ala  
 485 490 495  
 Ser Ile Pro Ala Val Glu Ile Phe Met Val Lys Ile Phe Met Leu Leu  
 500 505 510  
 Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Met Trp Ile Trp Thr Ser Lys Thr Leu  
 515 520 525  
 Gln Ser Trp Gln Gln Val Cys Ser Arg Arg Leu Lys Lys Lys Ser Arg  
 530 535 540  
 Arg Lys Pro Ala Ser Val Ile Thr Ser Gly Gly Ile Tyr Lys Lys Ala  
 545 550 555 560  
 Gln His Pro Gln Lys Thr His His Gly Lys Tyr Glu Ile Pro Ala Gln  
 565 570 575  
 Ser Pro Thr Cys Val  
 580

<210> 63  
 <211> 227  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Dominio extracelular (DEC) de FZD10

10 <400> 63

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Phe Ala  
 225

<210> 64  
 <211> 134  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Dominio Fri de FZD10 humano

&lt;400&gt; 64

Ile Ser Ser Met Asp Met Glu Arg Pro Gly Asp Gly Lys Cys Gln Pro  
 1 5 10 15

Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr Asn Met Thr Arg Met  
 20 25 30

Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu Ala Ala Ile Gln Leu  
 35 40 45

His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys His Gly His Leu Arg  
 50 55 60

Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr Glu Gln Val Ser  
 65 70 75 80

Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu Gln Ala Arg Leu Lys  
 85 90 95

Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Lys Trp Pro Asp Ser Leu  
 100 105 110

Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro Asn Tyr Leu Cys Met  
 115 120 125

Glu Ala Pro Asn Asn Gly  
 130

5 <210> 65  
 <211> 1746  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> FZD10 humano  
 <400> 65

atgcagcgcc cgggcccccg cctgtggctg gtcctgcagg tcatggctc gtgcgcggcc 60  
 atcagctcca tggacatgga gcgcggggc gacggcaaat gccagccat cgagatccc 120  
 atgtgcaagg acatcggtca caacatgact cgtatgcca acctgatggg ccacgagaac 180

15

cagcgcgagg	cagccatcca	gttgcacgag	ttcgcgcgc	tggtggagta	cggctgccac	240
ggccacctcc	gcttcttcc	gtgtcgctg	tacgcgcga	tgtgcaccga	gcaggtctct	300
accccccattcc	ccgcctgccg	ggtcatgtgc	gagcaggccc	ggctcaagtg	ctcccccatt	360
atggagcagt	tcaacttcaa	gtggcccac	tccctggact	gccggaaact	ccccaaacaag	420
aacgacccca	actacacgtg	catggaggcg	cccaacaacg	gctcgacga	gcccacccgg	480
ggctcgcc	tgttcccgc	gctgttccgg	ccgcagcggc	cccacagcgc	gcaggagcac	540
ccgctgaagg	acgggggccc	cgggcgcggc	ggctgcgaca	accggggcaa	gttccaccac	600
gtggagaaga	gcgcgtcgtg	cgcgcgctc	tgcacgccc	gcgtggacgt	gtactggagc	660
cgcgaggaca	agcgcttcgc	agtggtctgg	ctggccatct	ggcggtgct	gtgcttcttc	720
tccagcgct	tcaccgtgct	cacccctc	atcgaccgg	cccgcttcc	ctaccccgag	780
cgcgcgcctca	tcttcctctc	catgtctac	tgcgtctact	ccgtgggcta	cctcatccgc	840
ctcttcgc	gcgcgcagag	catgcctgc	gaccggaca	gcggccagct	ctatgtcatc	900
caggagggac	tggagagcac	cggctgcacg	ctggtcttcc	tggcctcta	ctacttcggc	960
atggccagct	cgcgtgtgt	ggtggtcctc	acgctcacct	ggttcctggc	cgcggcaag	1020
aagtggggcc	acgaggccat	cgaagccaa	acgagctact	tccacctggc	agcctgggccc	1080
atccggcgg	tgaagaccat	cctgatcctg	gtcatgcga	gggtggcggg	ggacgagctc	1140
accgggtct	gctacgtgg	cagcatggac	gtcaacgcgc	tcaccggctt	cgtgctcatt	1200
cccctggcct	gctacctgg	catcgac	tccttcatcc	tctcggc	cgtggccctg	1260
ttccacatcc	ggagggtgat	gaagacgggc	ggcgagaaca	cggacaagct	ggagaagctc	1320
atggtgcgt	tcgggctt	ctctgtgctg	tacaccgtgc	cggccacctg	tgtgatcgcc	1380
tgctacttt	acgaacgcct	caacatggat	tactggaaga	tcctggcggc	gcagcacaag	1440
tgcaaaatga	acaaccagac	taaaacgctg	gactgcctga	tggccgcctc	catcccccc	1500
gtggagatct	tcatggtaa	gatcttatg	ctgctggtgg	tggggatcac	cagcgggatg	1560
tggatttgga	cctccaagac	tctgcagtcc	tggcagcagg	tgtcagccg	taggttaaag	1620
aagaagagcc	ggagaaaacc	ggccagcgtg	atcaccagcg	gtgggattta	caaaaaagcc	1680
cagcatcccc	agaaaaactca	ccacggaaa	tatgagatcc	ctgcccagtc	gcccacctgc	1740
	gtgtga					1746

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fragmento sintético de receptor frizzled humano

&lt;400&gt; 66

Gln	Tyr	Gly	Phe	Ala
1				5

15 &lt;210&gt; 67

<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Fragmento sintético de receptor frizzled humano  
  
<400> 67

Gln Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu  
1 5 10

10

<210> 68  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Fragmento sintético de receptor frizzled humano

20 <400> 68

Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe  
1 5

25 <210> 69  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Fragmento sintético de receptor frizzled humano

<400> 69

Lys Gln Phe Tyr Gly Phe Gln Ala  
1 5

35

<210> 70  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Epítopo conformacional de FZD8

<400> 70

Phe Pro Leu Ile Tyr Leu Met Trp Pro Asp Arg  
1 5 10

50 <210> 71  
<211> 17  
<212> PRT  
<212> Sequencia artificial

55 <220>  
<223> CDR1 de cadena ligera  
<400> 71

Ser Gly Asp Lys Asn Leu Ile Gly Lys Ser Lys Phe Tyr Ala Val Ser  
 1 5 10 15

**His**

5                   <210> 72  
       <211> 10  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial  
  
 10                <220>  
       <223> Una CDR2 de cadena ligera  
  
       <400> 72

Glu Asp Lys Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly  
 1 5 10

15                <210> 73  
       <211> 14  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial  
  
 20                <220>  
       <223> CDR3 de cadena ligera  
  
       <400> 73

Ser Gln Ser Phe Tyr Ala Gly Asn Asn Thr Leu Ser Leu Glu  
 1 5 10

30                <210> 74  
       <211> 4  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial  
  
 35                <220>  
       <223> Fragmento de FZD8  
       <400> 74

Tyr Gly Phe Ala  
 1

40                <210> 75  
       <211> 25  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
  
 45                <220>  
       <223> Cebador sintético  
  
       <400> 75  
       cgctctccaa ggcgccaagg agagg        25

50                <210> 76  
       <211> 696

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

5 &lt;223&gt; Cadena ligera de anticuerpos anti IgG de FZD de 18R5

&lt;400&gt; 76

atggcctggg	ccctgctgct	gctgaccctg	ctgacacagg	gcaccggctc	ttggggccgac	60
atcgagctga	cccagcctcc	ctccgtgtcc	gtggcccccgt	gccagaccgc	ccggatctcc	120
tgctccggcg	acaacatcg	gagttctac	gtgcactgtt	atcagcagaa	acctggacag	180
gccccctgtgc	tggtgatcta	cgacaagtcc	aaccggcctt	ccggcatccc	tgagcgggttc	240
tccggctcca	actccggcaa	caccgccacc	ctgaccatct	ccggcaccca	ggccgaggac	300
gaggccgact	actactgcca	gtcctacgccc	aacaccctgt	ccctggtgtt	tggcggcggaa	360
acaagactga	ccgtgctggg	ccagcctaag	gccgctcctt	ccgtgaccct	gttccctcct	420
tcctccgagg	agctgcaggc	caacaaggcc	accctggtgt	gcctgatctc	cgacttctac	480
cctggcgctg	tgactgtggc	ttggaaaggcc	gactcctccc	ctgtgaaggc	cggcgtggag	540
acaaccaccc	cttccaagca	gtccaacaac	aagtacgccc	cctccctcta	cctgtccctg	600
accctgagc	agtggaaagtc	ccaccggtcc	tactcttgc	aggtgaccca	cgagggctcc	660
accgtggaaa	agacagtggc	acccaccgag	tgctcc			696

10

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

15

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR1 de cadena pesada

20

&lt;400&gt; 77

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Thr
1				5					10

25

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

30

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR2 de cadena pesada

&lt;400&gt; 78

Thr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Ser	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

35

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

<220>  
<223> CDR3 de cadena pesada

5 <400> 79

Ser Ile Val Phe Asp Tyr  
1 5

10 <210> 80  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> CDR1 de cadena ligera  
<400> 80

Ser Gly Asp Ala Leu Gly Asn Arg Tyr Val Tyr  
1 5 10

20 <210> 81  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> CDR2 de cadena ligera  
<400> 81

30 <210> 82  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> CDR3 de cadena ligera  
<400> 82

Gly Ser Trp Asp Thr Arg Pro Tyr Pro Lys Tyr  
1 5 10

45 <210> 83  
<211> 696  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Cadena ligera de anticuerpos anti FZD de 18R4605  
<400> 83

	atggcatggg cattattgct acttactcta ttgacgcaag gaacgggttc atgggcagac	60
	atagaactaa ctcagccacc ctctgttagc gttgcacccgg gacagacggc acgtatatcg	120
	tgctcgggag acaatataagg aagtttctat gtacattgtt atcaacagaa acctggtcaa	180
	gcacctgtat tagtaatcta tgacaaaagt aaccgacctt cggaaatacc tgagcgtttc	240
	agtggttcga actccggcaa cactgcaact ttaactatat ctggaaactca ggcggaggat	300
	gaggctgact actactgcc aagttacgca aacactctgt ccctgggttt tggcggcgga	360
	acaaagttaa ccgtgctggg ccagcctaag gccgcacctt cggtgaccct attccctcct	420
	tcatccgagg agctacaggc caacaaggcc accttagtgt gcctaatttc cgacttctat	480
	cctggtgctg taacggtagc gtggaaaggcc gactcatcgc cggtgaaggc cggtgtggag	540
	acaacgactc cttccaagca gtccaacaac aaatacgcgg cgtcctccta cctgtcccta	600
	acccctgagc agtggaaagtc ccaccgttca tactcgtgcc aggtgacgca cgagggttca	660
	acggtcgaaa agacagttagc acctactgaa tgctca	696
5	<210> 84	
	<211> 696	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cadena ligera de anticuerpos anti FZD de 18R4805	
	<400> 84	
	atggcatggg cattattact acttactcta cttacgcaag gaacgggttc atgggcagac	60
	atagaactaa ctcagccgcc gtctgttagc gttgcacccgg gacagacggc acgtatatcg	120
	tgctcgggag acaatattgg ttctttctat gtacattgtt atcaacagaa acctggtcaa	180
	gcacctgtat tagtaatata tgacaaaagt aaccgtcctt cggaaatacc tgagcgtttc	240
	agtggttcga actccggcaa cactgcaact ttaactatat ctggaaacgca ggcggaggat	300
	gaggcggact actattgcca aagttacgca aacactctat ccttagtgtt tggtggagga	360
	acaaagttaa ccgtgctagg ccagcctaag gccgcacctt cggtgaccct attccctcct	420
	tcatccgagg agctacaggc gaacaaagcc accttagtgt gcctaatttc agactttat	480
	cctggtgctg taacggtagc gtggaaaggcg gactcatcgc cggtgaaggc cggtgtggag	540
	acaacgactc cttccaagca gtccaacaac aaatacgcag cgagtagtta cctgtcccta	600
	acccctgagc agtggaaagtc gcaccgttca tactcgtgcc aggttacgca cgagggttca	660
	acggtcgaaa agacagttagc acctacggaa tgctca	696
15	<210> 85	
	<211> 115	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cadena pesada de anticuerpos anti FZD de 44R24	
	<400> 85	

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Ser Thr Ile Ser Tyr Ser Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Ile Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 86

5 <211> 104

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cadena ligera de anticuerpos anti FZD de 44R24

<400> 86

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

ES 2 663 536 T3

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ala Leu Gly Asn Arg Tyr Val  
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Pro  
 35 40 45

Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala  
 50 55 60

Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr  
 65 70 75 80

Cys Gly Ser Trp Asp Thr Arg Pro Tyr Pro Lys Tyr Val Phe Gly Gly  
 85 90 95

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100

<210> 87

<211> 354

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpos anti FZD de 18R5/18R8

10 <400> 87

gaggtgcagc	tggtcgagtc	tggcgccgga	ctgggtgcagc	ctggcggttc	cctgagactg	60
tcctgcgccc	cctccggctt	caccccttcc	cactacaccc	tgtccctgggt	gcccaggca	120
ccaggaaagg	gactggagtg	ggtctccgtg	atctccggcg	acggctccta	cacctactac	180
gccgactccg	tgaaggggccg	gttaccatc	tcctccgaca	actccaagaa	caccctgtac	240
ctgcagatga	actctctgag	agccgaggac	accgcccgtgt	actactgcgc	ccggaacttc	300
atcaagtacg	tgttcgccaa	ctggggccag	ggcacccctgg	tgaccgtgtc	ctcc	354

15 <210> 88

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos anti FZD de 18R8

<400> 88

gacatcgagc	tgacccagcc	tccctccgtg	tctgtggctc	ctggccagac	cgcggatc	60
tcctgctccg	gcgacaagct	gggcaagaag	tacgcctcct	ggtatcagca	gaagcctgga	120
caggccccctg	tgctggtcat	ctacgagaag	gacaaccggc	ctagcggcat	ccctgagcgg	180

25

	ttctccggct ccaactccgg caacaccgccc accctgacca tctccggcac ccaggccgag	240
	gacgaggccg actactactg ctccctcccttc gccggcaact ccctggaagt gttcggcgga	300
	ggcaccaagc tgaccgtgct gggc	324
5	<210> 89	
	<211> 324	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cadena ligera de anticuerpos anti FZD de 18R5	60
	<400> 89	
	gacatcgagc tgacccagcc tccctccgtg tccgtggccc ctggccagac cgcccgatc	60
	tcctgctccg gcgacaacat cggcagcttc tacgtgcact ggtatcagca gaaacctgga	120
	caggccccctg tgctggtgat ctacgacaag tccaaaccggc cttccggcat ccctgagcgg	180
	ttctccggct ccaactccgg caacaccgccc accctgacca tctccggcac ccaggccgag	240
	gacgaggccg actactactg ccagtcctac gccaacacccc tgtccctggt gtttggcgcc	300
	ggaacaaaagc tgaccgtgct gggc	324
15	<210> 90	
	<211> 324	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Anticuerpos anti FZD 18R4605	
	<400> 90	
	gacatagaac taactcagcc accctctgtt agcgttgcac cgggacagac ggcacgtata	60
	tcgtgctcgagagacaatat aggaagtttc tatgtacatt ggtatcaaca gaaacctggt	120
	caagcacctg tattagtaat ctatgacaaa agtaaccgac cttccggaat acctgagcgt	180
	ttcagtggtt cgaactccgg caacactgca actttaacta tatctggaac tcaggcggag	240
	gatgaggctg actactactg ccagagttac gcaaacactc tgtccctggt gtttggcgcc	300
	ggaacaaaagt taaccgtgct gggc	324
25	<210> 91	
	<211> 1365	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cadena pesada de anticuerpos anti FZD de 44R24	
35	<400> 91	

atgaagcacc	tgtggttctt	tctgctgctg	gtggccgctc	ctagatgggt	gctgtccgag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	cgaggactg	gtgcagcctg	gcggctccct	gagactgtct	120
tgccgcgcct	ccggcttcac	cttctccctct	tactacatca	cctgggtgcg	ccaggctcct	180
ggcaagggac	tggaatgggt	gtccaccatc	tcctactcct	ccagcaacac	ctactacgcc	240
gactccgtga	agggccgggt	caccatctcc	cgggacaact	ccaagaacac	cctgtacctg	300
cagatgaact	ccctgagggc	cgaggacacc	gccgtgtact	actgcgccc	gtccatcg	360
ttcgactact	ggggccaggg	caccctggtg	accgtgtcct	cttccgtgtt	ccctctggcc	420
ccttgctccc	ggtccaccc	tgagtctacc	gccgctctgg	gctgcctgg	gaaggactac	480
ttccctgagc	ctgtgaccgt	gtcctggAAC	tctggc	ccc	tgac	540
ttccctgccc	tgctgcagtc	ctccggcctg	tactccctgt	cctccgtgg	gaccgtgcct	600
tcctccaact	tcggcaccca	gacctacacc	tgcaacgtgg	accacaagcc	ttccaacacc	660
aagg	tgaca	agaccgtgga	gcggaa	gtgc	tgag	720
cctgtggctg	gcccttctgt	gttcctgttc	cctccta	aga	cc	780
tcccgaccc	ctgaagtgac	ctgcgtgg	gtggacgtgt	cccacgagga	ccctgaggtg	840
cagttcaatt	ggtacgtgga	cggcgtggag	gtgcacaacg	ccaagaccaa	gcctcgggag	900
gaacagttca	actccac	ccgggtgg	tctgtctga	ccgtgg	ccaggactgg	960
ctgaacggca	aagaata	caaa	gtgc	aaagg	tcc	1020
aagaccatct	ctaagac	aa	ggcc	agc	c	1080
agccggagg	aaatgac	aa	gaacc	agg	gtc	1140
ccttccgata	tcgccc	gtgg	ggtct	aa	cc	1200
acccctcc	ta	gtgg	actc	cgac	ggct	1260
aagtcccgt	ggc	agc	agg	caac	gtgt	1320
aaccactaca	ccc	aga	agtc	cct	gtcc	1365

<210> 92  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Anticuerpos anti FZD 18R4805

<400> 92

gacatagaac	taactcagcc	gccgtctgtt	agcgttgcac	cggcacagac	ggcacgtata	60
tcgtgctcgg	gagacaat	tgg	ttt	tat	gtac	120
caagcacctg	tatt	at	at	at	gac	180
ttcagtgg	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	240
gatgaggcgg	act	act	act	act	act	300
ggaacaaagt	taacc	gtgt	aggc			324

5                   <210> 93  
 <211> 672  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cadena ligera de anticuerpos anti FZD de 44R24  
 10                  <400> 93  
 atggcttggg ctctgctgct gctgaccctg ctgacacagg gcaccggctc ttgggcccac   60  
 atcgagctga cccagcctcc ctctgtgtct gtggccctg gccagaccgc caggatctct   120  
 tgctctggcg acgcccctggg caacagatac gtgtactggc atcagcagaa gccaggccag   180  
 gccccctgtgc tgggtatccc ttccggcattc cctgagcggc tctccggctc caactccggc   240  
 aacaccgcca ccctgaccat ctctggcacc caggccgagg acgaggccga ctactactgc   300  
 ggctccttggg acacccggcc ttaccctaag tacgtgttcg gcggaggcac caagctgacc   360  
 gtgctgggcc cttccgtgac cctgttccct ccattcctccg aggaactgca ggccaacaag   420  
 gccacccctgg tggcctgat ctccgacttc taccctggcg ccgtgaccgt ggcttggaaag   480  
 gccgactcta gcccctgtgaa ggccggcgtg gagacaacca ccccttccaa gcagtccaac   540  
 aacaagtacg ccgcctcctc ctacctgtcc ctgaccctg agcagtggaa gtcccaccgg   600  
 tcctactctt gccaggtgac ccacgagggc tccaccgtgg aaaagaccgt ggcccttacc   660  
 gagtgctcct ag   672  
 15                  <210> 94  
 <211> 345  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cadena pesada de anticuerpos anti FZD de 44R24  
 <400> 94  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctgggtgcagc ctggcggctc cctgagactg   60  
 tcttgcggcc cctccggctt caccttctcc tcttactaca tcacctgggt ggcggccaggct   120  
 cctggcaagg gactggaaatg ggtgtccacc atctcctact cctccagcaa cacctactac   180  
 gccgactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca actccaagaa caccctgtac   240  
 ctgcagatga actccctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccggccatc   300  
 gtgttcgact actggggcca gggcaccctg gtgaccgtgt cctct                           345  
 25                  <210> 95  
 <211> 312  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30                  <220>  
 <223> Cadena ligera de anticuerpos anti FZD de 44R24  
 <400> 95

gacatcgagc tgacccagcc tccctctgtg tctgtggccc ctggccagac cgccaggatc	60
tcttgctctg gcgacgccc gggcaacaga tacgtgtact ggtatcagca gaagccaggc	120
caggccccctg tgctggtgat cccttccggc atccctgagc ggttctccgg ctccaaactcc	180
ggcaacacccg ccacccctgac catctctggc acccaggccg aggacgaggc cgactactac	240
tgcggctcct gggacaccccg gccttaccct aagtacgtgt tcggcggagg caccaagctg	300
accgtgctgg gc	312

<210> 96  
<211> 1389  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Cadena pesada IgG2 de anticuerpos anti FZD de 18R5/18R8/18R4605/18R4805  
<400> 96

atgaagcacc	tgtggttctt	tctgctgctg	gtcgccgctc	ctagatgggt	gctgtccgag	60
gtcagctgg	tcgagtcgtgg	cggcggactg	gtcagccctg	gcccgtccct	gagactgtcc	120
tgcgccgcct	ccggcttcac	cttctccac	tacaccctgt	cctgggtgcg	ccaggcacca	180
ggaaagggac	tggagtgggt	ctccgtgate	tccggcgcacg	gctcctacac	ctactacgcc	240
gactccgtga	agggccggtt	caccatctcc	tccgacaact	ccaagaacac	cctgtacctg	300
cagatgaact	ctctgagagc	cgaggacacc	gccgtgtact	actgcgcgg	gaacttcatc	360
aagtacgtgt	tcgccaactg	gggccagggc	accctggtga	ccgtgtccctc	cgccctccacc	420
aaggccctt	ccgtgttccc	tctggccctt	tgctcccggt	ccacctccga	gtccaccgccc	480
gctctggct	gcctggtgaa	ggactacttc	cctgagccctg	tgacagtgtc	ctggaactct	540
ggcgccctga	cctccggcgt	gcacacccctc	cctgcccgtgc	tgcagtcctc	cggcctgtac	600
tccctgtcct	ccgtggtgac	agtgccttcc	tccaacttcg	gcacccagac	ctacacccgtc	660
aacgtggacc	acaagccctc	caacaccaag	gtggacaaga	ccgtggagcg	gaagtgtgc	720
gtggagtgcc	ctcccttgc	tgcccccct	gtggctggtc	ctagcgtgtt	cctgtccct	780
cctaagcccta	aggacacccct	gatgatctcc	cggacccctg	aggtgacctg	cgtggtggtg	840
gacgtgtccc	acgaggatcc	tgaagtccag	ttcaattgg	acgtggacgg	cgtggaggtg	900
cacaacgcca	agaccaagcc	tcggggaggag	cagttcaact	ccacccctccg	ggtgtgtcc	960
gtgctgaccg	tggtgaccca	ggactggctg	aacggcaaag	aatacaagtg	caaagtctcc	1020
aacaagggcc	tgcctgcccc	tatcgaaaag	accatcagca	agaccaaggg	ccagcctcgc	1080

gagcctcagg	tgtacaccct	gcctccctct	cgcgaagaga	tgaccaagaa	ccaggtgtcc	1140
ctgacctgtc	tggtaaggg	cttctaccct	tccgatatcg	ccgtggagtg	ggagtccaaac	1200
ggccagcctg	agaacaacta	caagaccacc	cctcctatgc	tggactccga	cggcttttc	1260
ttccctgtact	ccaagctgac	agtggacaag	tcccggtg	agcaggc	cgtgttctcc	1320
tgctccgtga	tgcacgaggc	cctgcacaat	cactacaccc	agaagtccct	gtccctgtct	1380
	cctggcaag					1389

5  
 <210> 97  
 <211> 696  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10  
 <220>  
 <223> Cadena ligera lambda de anticuerpos 18R8, anti FZD,  
 <400> 97

atggcctggg ccctgctgct gctgaccctg ctgacacagg gcaccggctc ttggggccac	60
atcgagctga cccagcctcc ctccgtgtct gtggctctg gccagaccgc ccggatctcc	120
tgctccggcg acaagctggg caagaagtac gcctccttgtt atcagcagaa gcctggacag	180
gccccctgtgc tggtcatcta cgagaaggac aaccggccta gcggcatccc tgagcggttc	240
tccggctcca actccggcaa caccgcccacc ctgaccatct ccggcacccca ggccgaggac	300
gaggccgact actactgctc ctccctcgcc ggcaactccc tggaaagtgtt cggcggaggc	360
accaagctga ccgtgctggg ccagcctaag gccgctcctt ccgtgaccct gttccctcct	420
tcctccgagg aactgcaggc caacaaggcc accctggtct gcctgatctc cgacttctac	480
cctggcgccg tgaccgtggc ctggaaggcc gactcctccc ctgtgaaggc cggcgtggag	540
acaaccaccc cttccaagca gtccaacaac aagtacgccc ctcctccta cctgtccctg	600
accctgagc agtggaaagtc ccaccggtcc tactcttgcc aggtcacccca cgagggctcc	660
accgtggaaa agacagtggc ccccaccgag tgctcc	696

## REIVINDICACIONES

- 1., Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un receptor frizzled humano seleccionado del grupo que consiste en FZD8, FZD5, FZD1, FZD2 y FZD7, y que inhibe la unión de Wnt con el receptor frizzled humano, en donde el anticuerpo:
- (a) se une a la secuencia (K/Q)(F/Y)GF(Q/A) (SEQ ID NO: 69) y/o a la secuencia Q(DE/ED)AGLEVHQF(Y/W)PL (SEQ ID NO: 24) dentro del receptor frizzled humano;
- (b) en un ensayo de unión competitiva, compite por la unión específica a los receptores FZD8, FZD5, FZD1, FZD2 o FZD7 humanos con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID NO: 14 o SEC ID NO: 12 y/o
- (c) comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSHYTLS (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2); y una CDR3 de cadena pesada que comprende NFIKYVFAN (SEQ ID NO: 3); y una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de cadena ligera que comprende DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QSYANTTLS (SEQ ID NO: 9).
2. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, que se une específicamente a más de un receptor frizzled humano seleccionado del grupo que consiste en FZD8, FZD5, FZD1, FZD2 y FZD7.
3. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2, en el que los receptores frizzled humanos a los que se une el anticuerpo comprenden FZD8 y FZD5.
4. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 3, que se une específicamente a FZD8, FZD5, FZD1, FZD2 y FZD7.
5. El anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un antagonista del receptor (o de los receptores) frizzled humano(s).
6. El anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se une específicamente a FZD8 humano, en donde el anticuerpo:
- (a) se une a la secuencia QYGFA (SEQ ID NO: 66); y/o
- (b) se une a la secuencia QDEAGLEVHQFWPL (SEQ ID NO: 67).
7. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 6, que se une específicamente a FZD8 humano, en donde el anticuerpo:
- (a) se une a la secuencia QYGFA (SEQ ID NO: 66) dentro de FZD8; y/o
- (b) se une a la secuencia GLEVHQ (SEQ ID NO: 25) dentro de FZD8.
8. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un fragmento de anticuerpo.
9. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende:
- (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSHYTLS (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2); una CDR3 de cadena pesada que comprende NFIKYVFAN (SEQ ID NO: 3); y
- (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7) o SGDKLGKKYAS (SEQ ID NO: 4); una CDR2 de cadena ligera que comprende DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8) o EKDNRPSG (SEQ ID NO: 5); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QSYANTTLS (SEQ ID NO: 9) o SSFAGNSLE (SEQ ID NO: 6).
10. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 9 en donde el anticuerpo comprende:
- (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSHYTLS (SEQ ID NO: 1); un CDR2 de cadena pesada que comprende VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2); una CDR3 de cadena pesada que comprende NFIKYVFAN (SEQ ID NO: 3); y
- (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7) o SGDKLGKKYAS (SEQ ID NO: 4); una CDR2 de cadena ligera que comprende DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8) y una CDR3 de cadena ligera que comprende QSYANTTLS (SEQ ID NO: 9).
11. El anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende:

- (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10;  
 y/o  
 (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 12.
- 5 12. El anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo se une específicamente a FZD5 y/o FZD8 humanos y comprende:
- 10 (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSSYYIT (SEQ ID NO: 77); una CDR2 de cadena pesada que comprende TISYSSSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 78); y una CDR3 de cadena pesada que comprende SIVFDY (SEQ ID NO: 79); y  
 (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDALGNRYVY (SEQ ID NO: 80); una CDR2 de cadena ligera que comprende SG (SEQ ID NO: 81); y una CDR3 de cadena ligera que comprende GSWDTRPYPKY (SEQ ID NO: 82).
- 15 13. El anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o según la reivindicación 12, en donde el anticuerpo se une específicamente a FZD8 y/o FZD5, y comprende:
- 20 (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 85; y/o  
 (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 86.
- 25 14. El anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 1 a 3, 12 o 13, en donde en un ensayo de unión competitiva, el anticuerpo compite por la unión específica a FZD8 y/o FZD5 humanos con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 85 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 86.
- 30 15. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el anticuerpo inhibe la unión de wnt a un receptor frizzled humano, y  
 (i) el anticuerpo comprende:  
 35 (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GFTFSHYTLS (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2); y una CDR3 de cadena pesada que comprende NFIKYVFAN (SEQ ID NO: 3);  
 y  
 (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de cadena ligera que comprende DKSNRPSG (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QSYANTSL (SEQ ID NO: 9), o  
 40 (ii) el anticuerpo está codificado por la secuencia de un plásmido depositado en la ATCC como número de registro PTA9541.
- 45 16. El anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 1 a 11 o la composición farmacéutica de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 10; y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 14.
- 50 17. Un anticuerpo monoclonal o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal.
- 55 18. Un anticuerpo monoclonal o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para su uso en un método de:  
 (i) inhibir el crecimiento tumoral en un individuo,  
 (ii) tratar el cáncer en un individuo,  
 (iii) tratar un trastorno en un individuo, en donde el trastorno se caracteriza por un mayor nivel de células madre y/o células progenitoras,  
 (iv) tratar una enfermedad en un individuo, en donde la enfermedad se asocia a la activación de la señalización Wnt  
 60 (v) inducir la diferenciación de células en un tumor de un individuo, o  
 (vi) reducir en un individuo la tumorigenidad de un tumor que comprende células madre cancerosas; comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o de la composición farmacéutica.
- 65 19. El anticuerpo monoclonal o la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para su uso en un método según la reivindicación 18, en donde el método comprende además administrar un segundo

agente terapéutico.

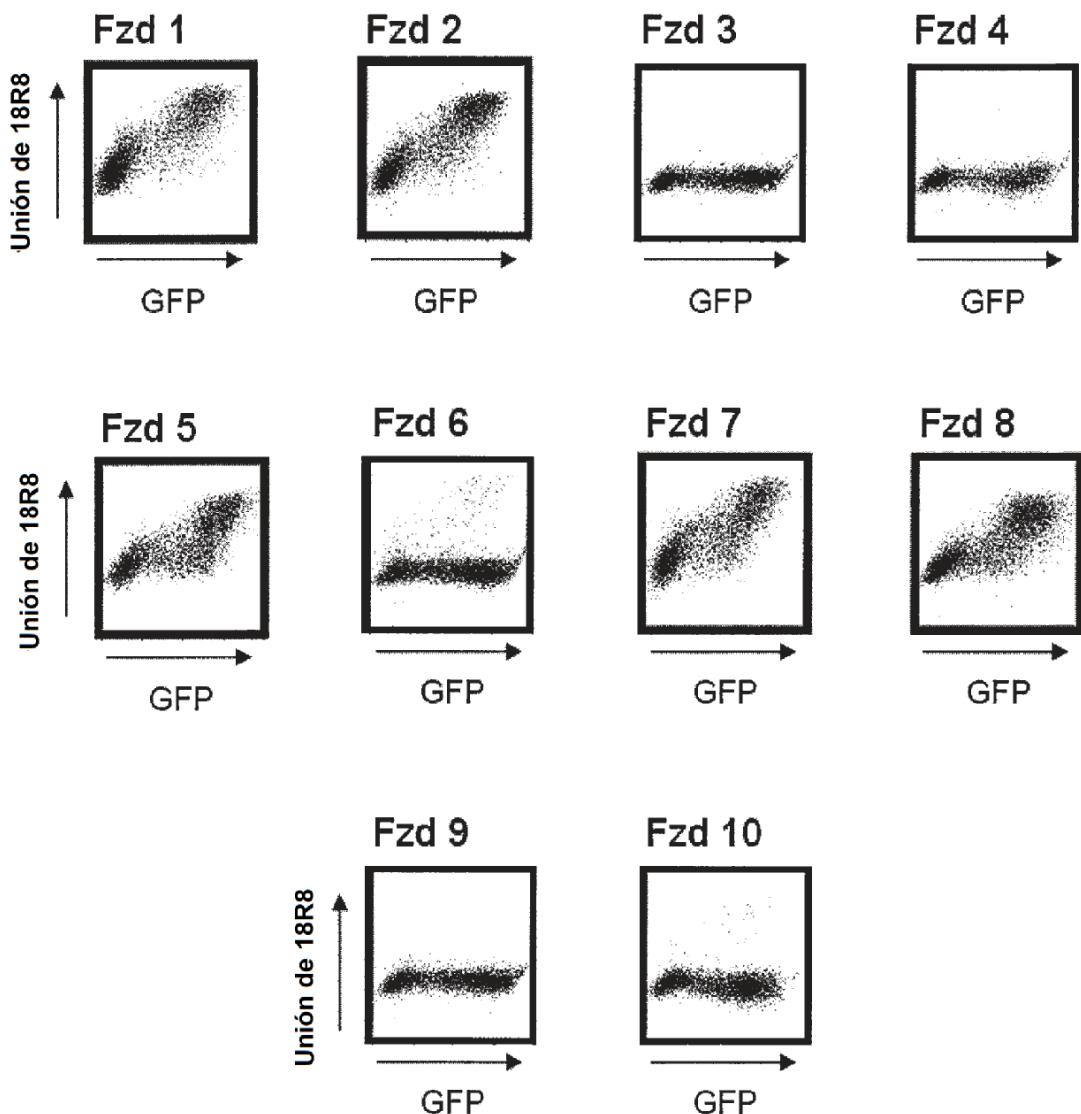
20. El anticuerpo monoclonal o la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para su uso en un método según la reivindicación 19, en donde el método comprende tratar el cáncer en un individuo y en

5 donde el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

21. El anticuerpo monoclonal o la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para su uso en un método según la reivindicación 20, en donde el método comprende tratar el cáncer de mama en un

10 individuo, administrándole paclitaxel y una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o de la composición

**FIGURA 1**



Transfección transitoria de FZD con vectores de expresión +GFP en células HEK293 con 18R8 10 ug/ml,

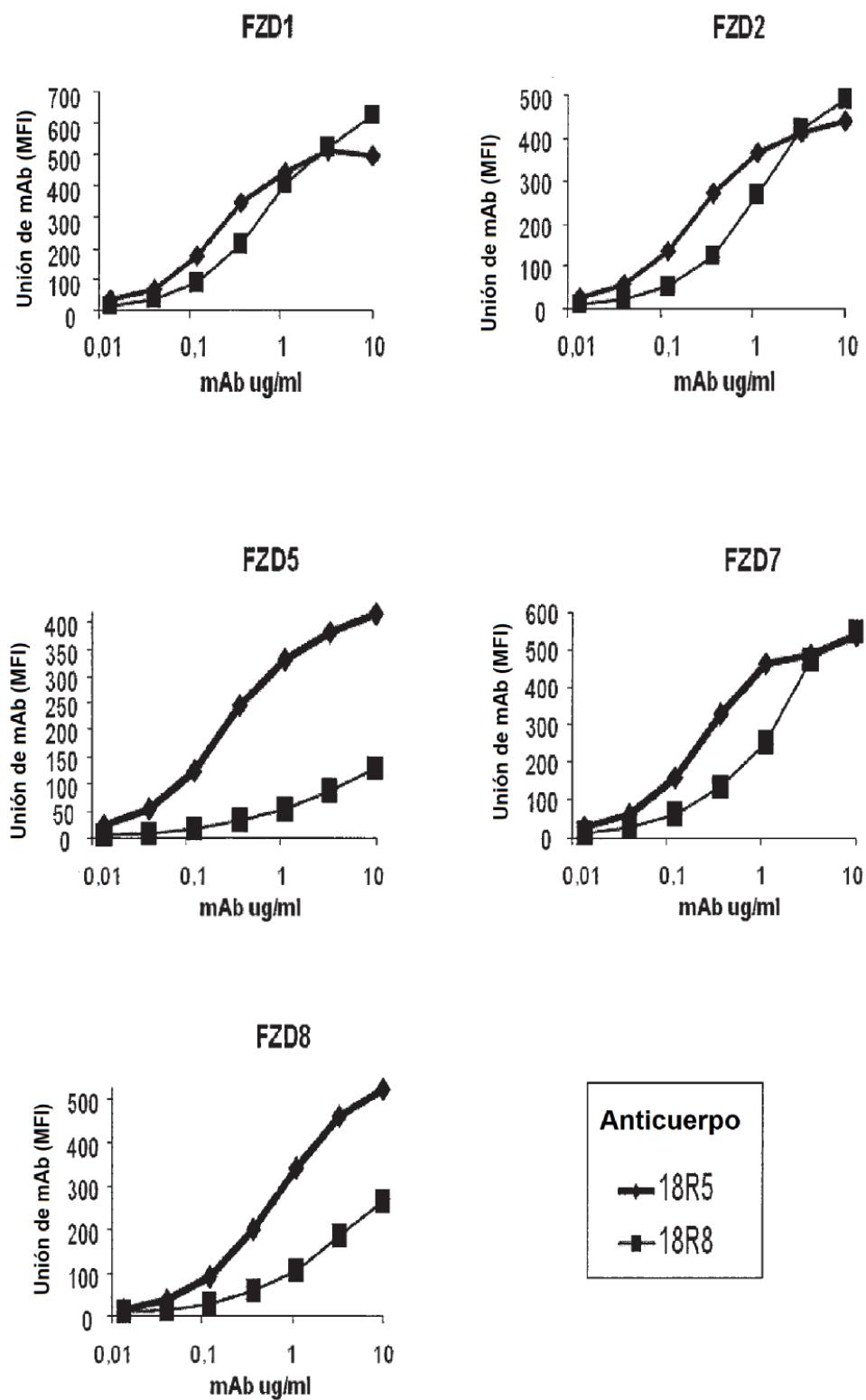
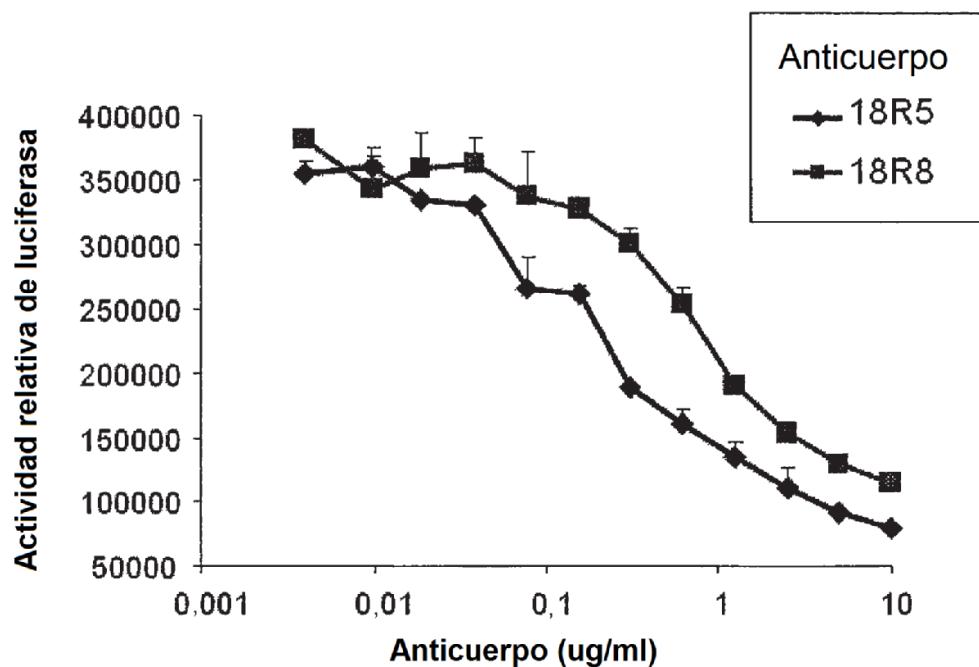
**FIGURA 2**

FIGURA 3



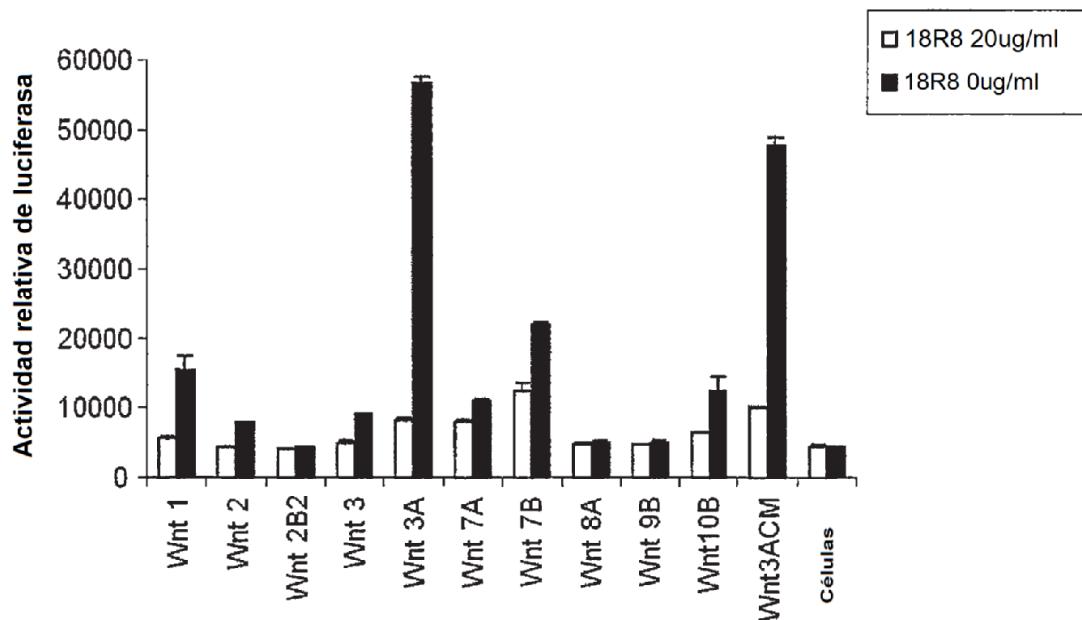
**FIGURA 4**

FIGURA 5

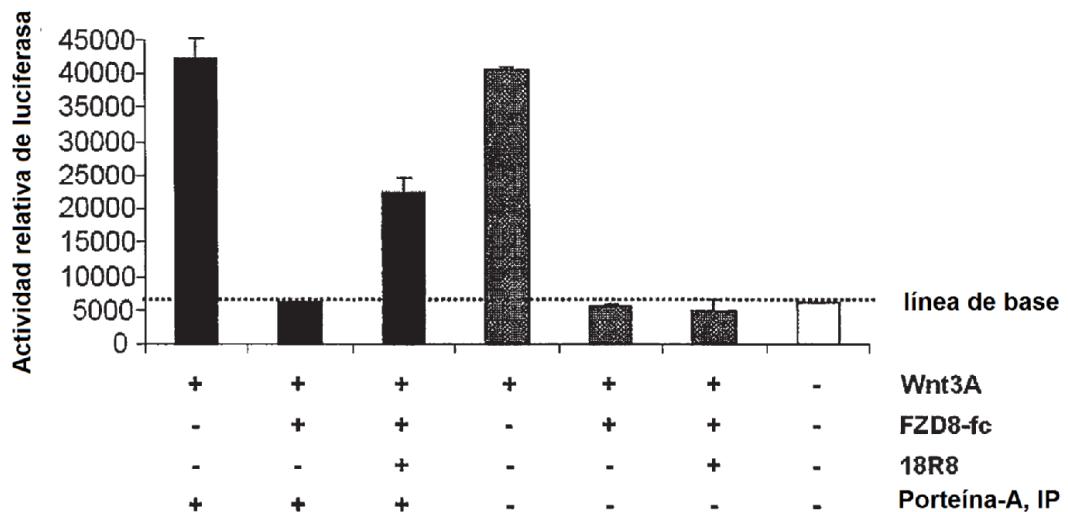


FIGURA 6

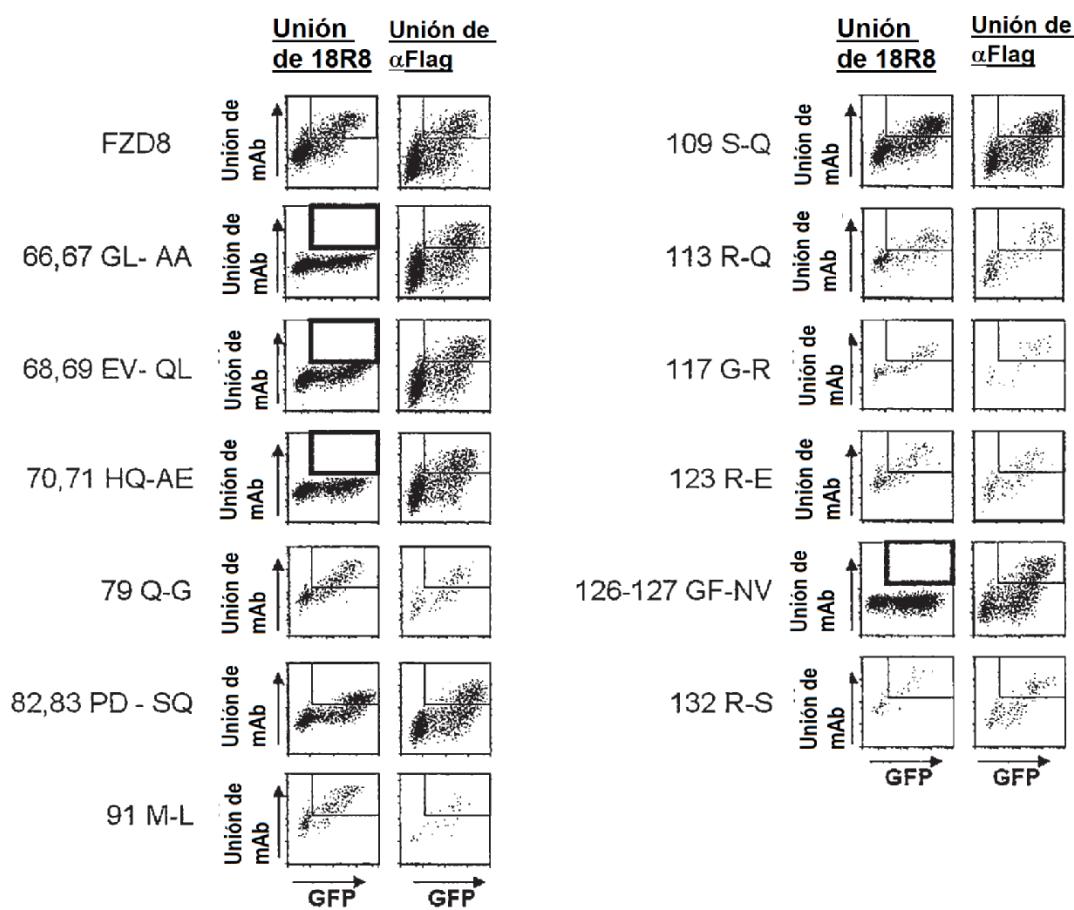
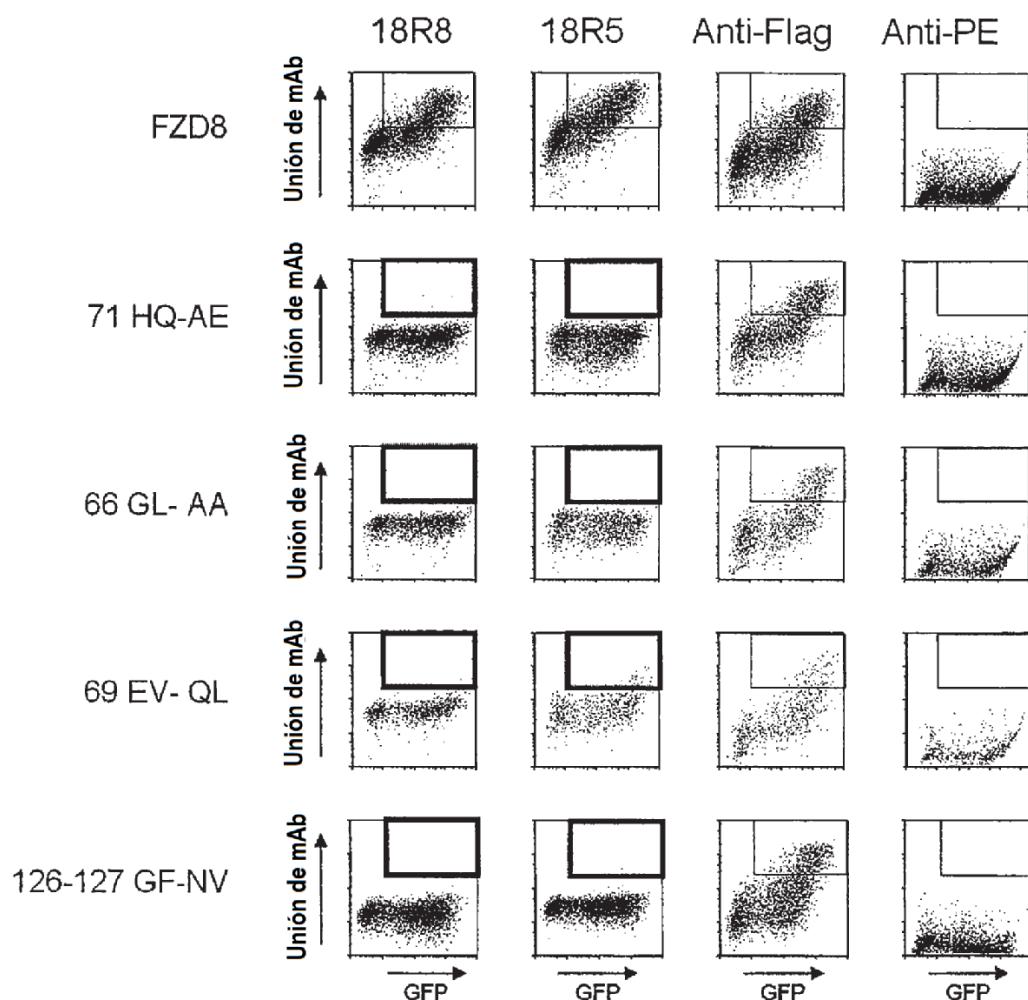


FIGURA 7



## FIGURA 8

Figura 9

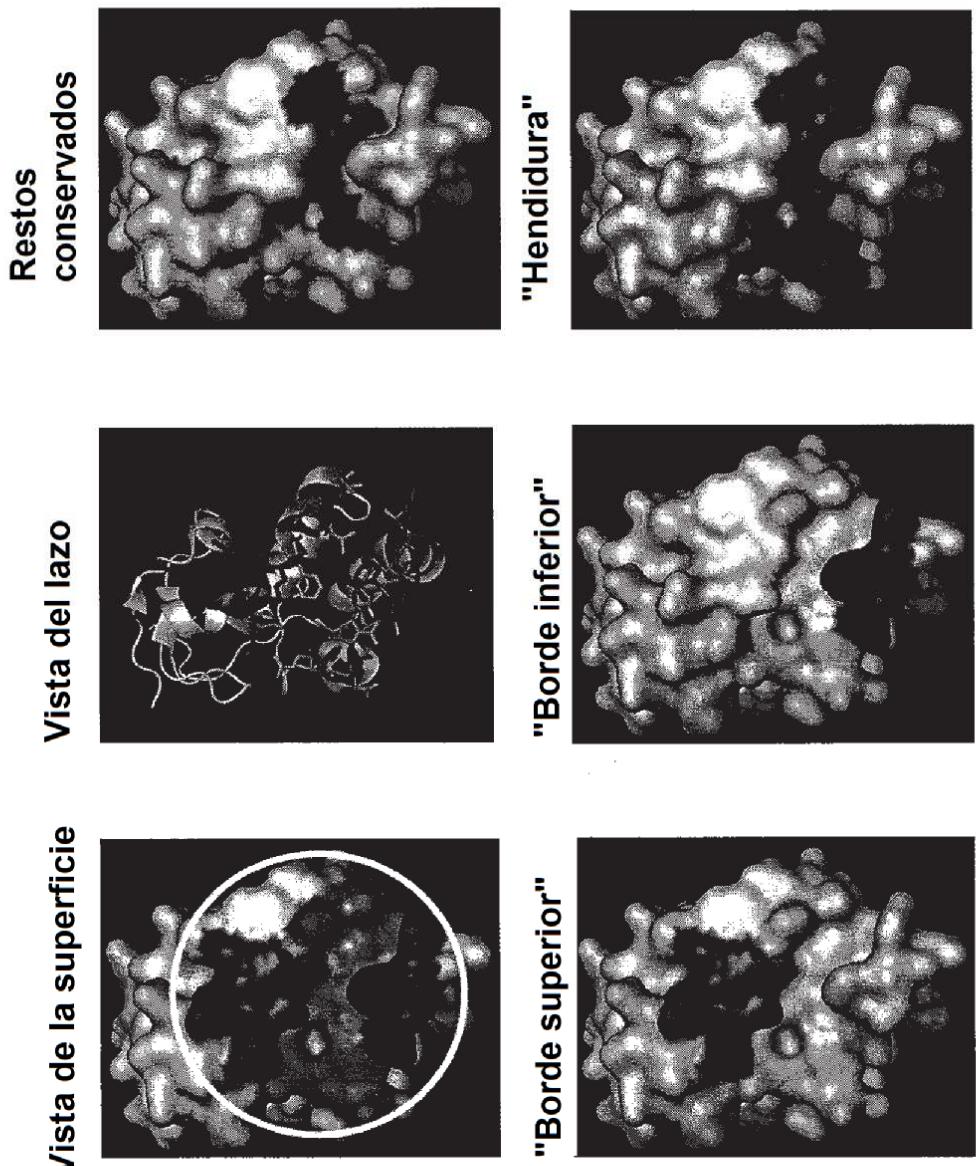


FIGURA 10

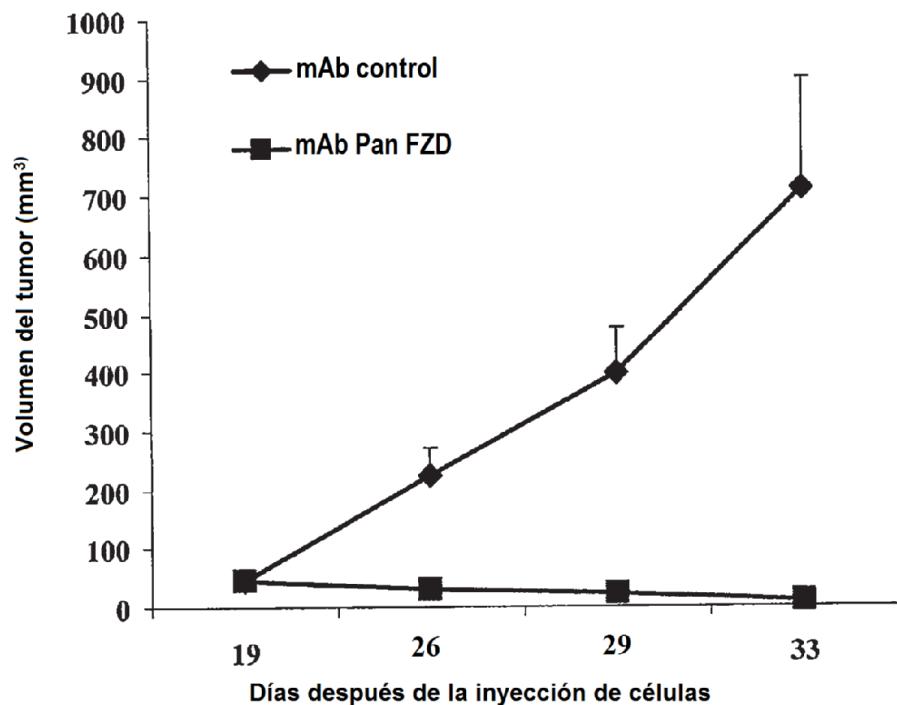


FIGURA 11

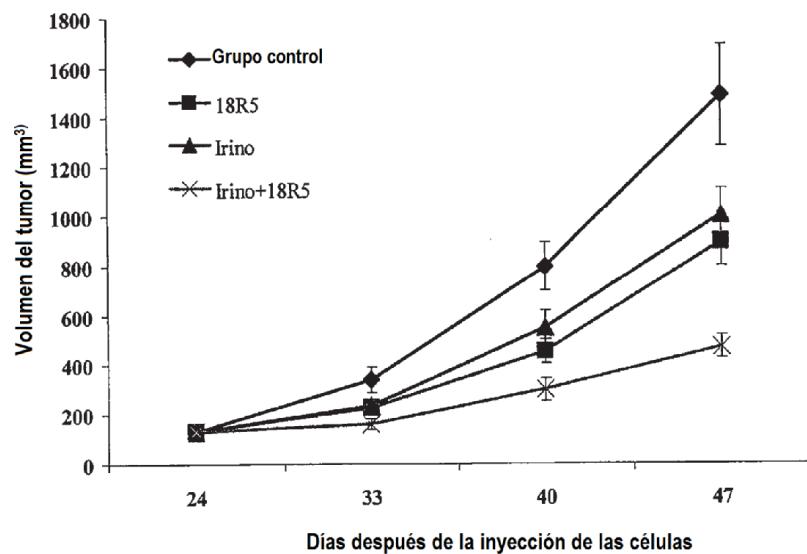
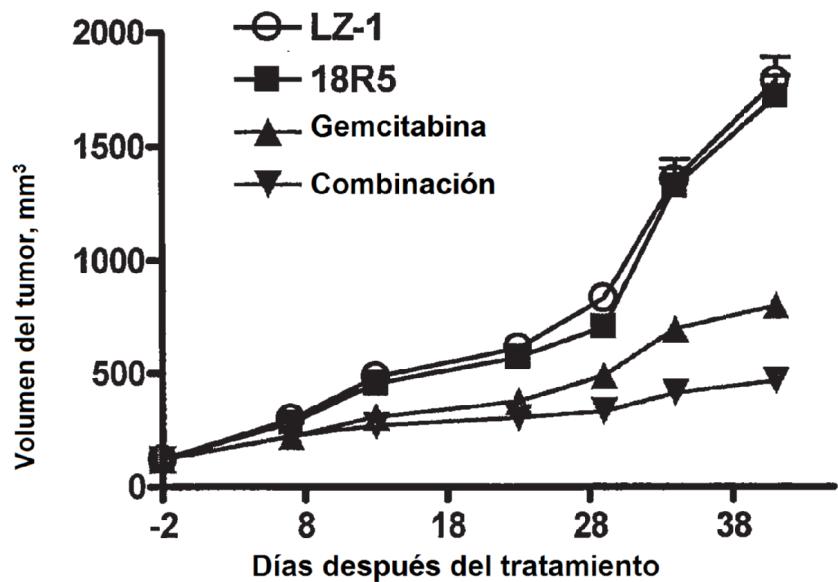


FIGURA 12



## FIGURA 13

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de 18R5/18R8 (SEQ ID NO: 10):  
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGKGLEWVSVISGDGSYTYYADSV  
 KGRFTI**SSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFI**KYVFANWGQGTLVTVSS

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (IgG2) de 18R5/18R8 de longitud completa (SEQ ID NO: 11, el subrayado indica VH):

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGKGL  
EWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTI**SSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFI**KYVFANWG  
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPVCPAPPVAGPSV  
FLFPPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS  
VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS**TKQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL**  
VKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEAL  
HNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) de 18R8 (SEQ ID NO: 12):  
DIELTQPPSVSVAPGQTARI**SCGD**KLGKKYASWYQQKPGQAPV**LVI**YEKDNRPSG**I**PERFSGS  
 NSGNTATLT**I**SGTQAE**E**ADYYCSSFAGNSLEVFGGGTKLTVLG

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (lambda) de 18R8 de longitud completa (SEQ ID NO: 13, el subrayado indica VL):

MAWALLLLTLLTQGTGSWADIELTQPPSVSVAPGQTARI**SCGD**KLGKKYASWYQQKPGQAPV**LVI**YEKDNRPSG**I**PERFSGS  
NSGNTATLT**I**SGTQAE**E**ADYYCSSFAGNSLEVFGGGTKLTVLG  
QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKY  
AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) de 18R5 (SEQ ID NO: 14):  
DIELTQPPSVSVAPGQTARI**SCGD**NIGSFYVHWYQQKPGQAPV**LVI**YDKNRPSG**I**PERFSGS  
 NSGNTATLT**I**SGTQAE**E**ADYYCQSYANTL**SLV**FGGGTKLTVLG

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (lambda) de 18R5 de longitud completa (SEQ ID NO: 15; el subrayado indica VL):

MAWALLLLTLLTQGTGSWADIELTQPPSVSVAPGQTARI**SCGD**NIGSFYVHWYQQKPGQAPV**LVI**YDKNRPSG**I**PERFSGS  
NSGNTATLT**I**SGTQAE**E**ADYYCQSYANTL**SLV**FGGGTKLTVLG  
QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKY  
AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

## FIGURA 14

Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada (VH) de 18R5/18R8 (SEQ ID NO: 17):

GAAGTGCAACTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGCACACTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGC  
 TCGCCTGCCTCCGGATTACCTTTCTCATTATACTCTGTCTGGGTGCGCCAAGCCCT  
 GGGAAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCTCTGGTGATGGTAGCTATAACCTATTATGCT  
 GATAGCGTGAAAGGCAGATTACCATTCAGTGAATAATTCCAAAACACCCCTGTATCTG  
 CAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAAGATAACAGCCGTGTATTATTGCGCTAGAAATTATT  
 AAGTATGTTTTGCTAATTGGGCAAGGCACCCCTGGTGACAGTTAGCTCA

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada (lgG2) de 18R5/18R8 de longitud completa (SEQ ID NO:

18; el subrayado indica la secuencia de nt que codifica VH):

ATGAAACACCTGTGGTTCTCCTCTGCTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCCTGTCCGAA  
GTGCAACTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGCACACTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGC  
TCGCCTGCCTCCGGATTACCTTTCTCATTATACTCTGTCTGGGTGCGCCAAGCCCT  
GGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCTCTGGTGATGGTAGCTATAACCTATTATGCT  
GATAGCGTGAAAGGCAGATTACCATTCAGTGAATAATTCCAAAACACCCCTGTATCTG  
CAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAAGATAACAGCCGTGTATTATTGCGCTAGAAATTATT  
AAGTATGTTTTGCTAATTGGGCAAGGCACCCCTGGTGACAGTTAGCTCAGCCAGCACA  
AAGGGCCCTAGCGTCTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCAGCAGACAGCC  
GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGGAACTCA  
GGCGCTCTGACCAGCGCGTGACACCTTCCCAGCTGTCCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC  
TCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGC  
AACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGT  
GTCGAGTGCCCACCGTGGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTCCTCTTCCC  
CCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGAACCCCTGAGGTCACTGCGTGGTGGTG  
GACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG  
CATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTCAACAGCACGTTCCGTGTTGTCAGC  
GTCCTCACCGTTGTGACCAGGACTGGCTGAACGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCC  
AACAAAGGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAAGGGCAGCCCCGA  
GAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCTGCCCTGCCATCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAAGGTCA  
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAAT  
GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCTTC  
TTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTCTCA  
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT  
CCGGTAAA

## FIGURA 15

Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera (VL) de 18R8 (SEQ ID NO: 19):

GATATCGAACTGACCCAGCCTCCTCAGTGAGCGTTGCACCAGGT~~CAGACCGCTAGAATCTCT~~  
TGTAGCGCGATAAAGCTGGTAAGAAGTATGCTTCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCAG  
GCTCCAGTTCTGGTGATTATGAGAAGGATAATAGACCCTCAGGCATCCCTGAACGCTTT  
AGCGGATCCAACAGCGGAAACACCGCTACCCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCTGAAGAC  
GAAGCCGATTATTATTGCTCTTGTGGTAATTCTCTGGAGGTTTGGCGGCGGC  
ACCAAGTTAACCGTCCTTGGT

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera (lambda) de 18R8 de longitud completa (SEQ ID NO: 20; el subrayado indica la secuencia de nt que codifica VL):

ATGGCCTGGGCTCTGCTCCTCACCCCTCACTCAGGGCACAGGATCCTGGGCTGAT  
ATCGAACTGACCCAGCCTCCTCAGTGAGCGTTGCACCAGGT~~CAGACCGCTAGAATCTCT~~  
TGTAGCGCGATAAAGCTGGTAAGAAGTATGCTTCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCAG  
GCTCCAGTTCTGGTGATTATGAGAAGGATAATAGACCCTCAGGCATCCCTGAACGCTTT  
AGCGGATCCAACAGCGGAAACACCGCTACCCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCTGAAGAC  
GAAGCCGATTATTATTGCTCTTGTGGTAATTCTCTGGAGGTTTGGCGGCGGC  
ACCAAGTTAACCGTCCTTGGT~~CAGCCAAAGGCTGCCCCAGCGTCACTCTGTTCCCTCCC~~  
TCCTCTGAGGAGCTGCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTCTCATAAGTGA~~CTTCTAC~~  
CCTGGAGCGTGACAGTGGCCTGGAAAGGAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCTGGAGTGGAG  
ACCACACACCCCTCCAAACAAAGCAACAAAGTACGCTGCCAGCAGTATCTGAGCCTG  
ACACCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACACATGAAGGGAGC  
ACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCA

Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera (VL) de 18R5 (SEQ ID NO: 21):

GATATCGAGCTGACTCAGCCTCCATCCGTGAGTGTGGCCCCCTGGT~~CAGACAGCACGCATCAGC~~  
TGCTCCGGGGACAATATCGGATCTTCTACGTGCACTGGTTATCAGCAGAA~~AGCCTGGTCAG~~  
GCTCCAGTTCTGTTATCTATGATAAAGAGTAATCGCCCCCTCTGGGATTCCAGAGCGCTTC  
AGCGGAAGCAACAGCGGAAACTGCAACTCTCACAATTCCGGTACTCAGGCTGAGGAC  
GAAGCCGACTATTACTGCCAAAGCTACGCAAACACCCTGTCCCTCGTCTCGGAGGCGGA  
ACCAAGTTAACCGTCCTTGGT

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera (lambda) de 18R5 de longitud completa (SEQ ID NO: 22; el subrayado indica la secuencia de nt que codifica VL):

ATGGCATGGGCACTGCTGCTCACTCTGCTGACACAAGGTACTGGCTCTGGGCCGAT  
ATCGAGCTGACTCAGCCTCCATCCGTGAGTGTGGCCCCCTGGT~~CAGACAGCACGCATCAGC~~  
TGCTCCGGGGACAATATCGGATCTTCTACGTGCACTGGTTATCAGCAGAA~~AGCCTGGTCAG~~  
GCTCCAGTTCTGTTATCTATGATAAAGAGTAATCGCCCCCTCTGGGATTCCAGAGCGCTTC  
AGCGGAAGCAACAGCGGAAACTGCAACTCTCACAATTCCGGTACTCAGGCTGAGGAC  
GAAGCCGACTATTACTGCCAAAGCTACGCAAACACCCTGTCCCTCGTCTCGGAGGCGGA  
ACCAAGTTAACCGTCCTTGGT~~CAGCCAAAGGCTGCCCCAGCGTCACTCTGTTCCCTCCC~~  
TCCTCTGAGGAGCTGCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTCTCATAAGTGA~~CTTCTAC~~  
CCTGGAGCGTGACAGTGGCCTGGAAAGGAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCTGGAGTGGAG  
ACCACACACCCCTCCAAACAAAGCAACAAAGTACGCTGCCAGCAGTATCTGAGCCTG  
ACACCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACACATGAAGGGAGC  
ACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCA

## FIGURA 16

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión Fc del DEC de Fzd7 (SEQ ID NO: 16)

MRDPGAAAPLSSLGLCALVLALLGALSAGAGAQPYHGEKGISVPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQ  
 TILPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAPVCTVLDQAIIPPCRSLCERAR  
 QGCEALMNKFGFQWPERLRCENFPVHGAGEICVGQNTSDGSGGGGGPTAYPTAPYLPDLPFTA  
 LPPGASDGRGRPAFPFSCPRQLKVPYLGYRFLGERDCGAPCEPGRANGLMYFKEEERRFARLG  
 RADKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
 QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL  
 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSPGK

Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión del DEC de Fzd7 (SEQ ID NO: 23):

ATGCGGGACCCCGGCGCGCCGCTCCGCTTCTGGCCCTCTGTGCCCTGGTGC  
 GCGCTGCTGGCGCACTGTCGCCGGCGCCGGCGCAGCCGTACCAACGGAGAGAACGGC  
 ATCTCCGTGCCGGACCACGGCTCTGCCAGCCATCTCCATCCGCTGTGCACGGACATC  
 GCCTACAACCAGACCATCCTGCCAACCTGCTGGGCCACACGAACCAAGAGGACGCC  
 CTCGAGGTGACCACTACCCGCTGGTGAAGGTGAGTGTCTCCGAACCTCGCTT  
 TTCTTATGCTCCATGTATGCGCCCGTGTGCACCGTGTGATCAGGCCATCCGCTGT  
 CGTTCTCTGTGCGAGCGCGCCGCCAGGGCTGCGAGGGCGCTATGAACAAGTCGGCTTC  
 CAGTGGCCAGAACACGTCGGACGGCTCGCGCTCGAGAACATTCCCGTGCACGGTGC  
 GTGGGCCAGAACACGTCGGACGGCTCCGGCTTCACCGCGCTGCCCGGGGCTCAGATGGC  
 ACCGCGCCCTACCTGCCGGACCTGCCCTTCACCGCGCTGCCCGGGGCTCAGATGGC  
 AGGGGGCGTCCGCCCTCCCTCTCATGCCCCCGTCAAGGTGCCCGTACCTG  
 GGCTACCGCTCCTGGGTGAGCGCATTGTGGCGCCCGTGCACGGCGCTGCAAC  
 GGCCTGATGACTTAAGGAGGAGAGGGCGCTCGCCCTCGGGCGCCGACAAA  
 ACTCACACATGCCACCGTGCCACCTGAACCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTC  
 TTCCCCCCTAAACCAAGGACACCCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTCAACATGCGT  
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT  
 GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT  
 GTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGCAAGGAGTACAAGTGAAG  
 GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAG  
 CCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCCTGCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAG  
 GTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAG  
 AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC  
 TCCTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTC  
 TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACACAGAACGCTCTCC  
 CTGTCTCCGGTAAA

**FIGURA 17**

Secuencia de aminoácidos de longitud completa de FZD1 humano (SEQ ID NO: 26; el subrayado indica el DEC):

MAEEEAPKKSRAAGGGASWELCAGALSARLAEEGSGDAGGRRRPPVDPRLARQLLLLLW  
LLEAPLLLGVRAQAAGQGPQGPQGPQQPPPPQQQQSGQQYNGERGISVVDHGYCQPI  
IPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSAELKFFLCSMYAPVCTVL  
EQALPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPDTLKCEKFPVHGAGELCVGQNTSDKGPTP  
SLLPEFWTSNPQHGGGHRRGGFPGGAGASERGKFCPRALKVPSYLNHFLGEKDCGAPC  
EPTKVYGLMYFGPEELRFSRTWIGIWSVLCCASTLFTVLTYLVDMRRFSYPERPIIFLSG  
CYTAVAVAYIAGFLLEDRLVVNCNDKFAEDGARTVAQGKKEGCTILFMMFLYFFSMASSI  
WVILSLTWFLAAGMKWGHEAIEANSQYFHLLAAWAVPAIKTITILALGQVDGDVLSGVCFVG  
LNNVDALRGFVLAPLFVYLFIGTSFLLAGFVSLFRIRTIMKHDGTKEKLMVRIGVF  
SVLYTVPATIVIACYFYEQAFRDQWERSWVAQSCSKSYAI PCPHLQAGGGAPPHPMPSPDF  
TVFMIKYLMTLIVGITSGFWIWSGKTLNSWRKFYTRLTNSKQGETTV

Secuencia de aminoácidos del dominio Fri de FZD1 humano (SEQ ID NO: 28; aminoácidos 87-237 de la SEQ ID NO: 26):

QQPPPPPQQQQSGQQYNGERGISVVDHGYCQPI IPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDA  
GLEVHQFYPLVKVQCSAELKFFLCSMYAPVCTVLEQALPPCRSLCERARQGCEALMNKFG  
FQWPDTLKCEKFPVHGAGELCVGQNTSDKGT

**FIGURA 18**

Secuencia de aminoácidos de longitud completa de FZD2 (SEQ ID NO: 30; el subrayado indica el DEC):

MRPRPSALPRLLLP~~LLL~~PAAGPAQFHGEKG~~I~~SPDHGFCQPI IPLCTDIAYNQTIMPNL  
LGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAPVCTVLEQAI PPCRSICERARQG  
CEALMNKFGFQWPRLCEHFPRHGAEQICVGQNHSEDGAPALLTAPPGLQPGAGGTP  
GGPGGGGAPPRYATLEHPFHCPRVLKVPSYKFLGERDCAAPCEPARPDGSMFFSQEE  
TRFARLWILTWSVLCCASTFFTVTITLVDMQRFRYPERPIIFLSGCYTMSVAYIAGFVL  
QERVVCNERFSEDGYRTVVQGTKKEGCTILFMMFLYFFSMASSIWWVILSLTWFLAAGMKW  
GHEAIEANSQYFHLLAAWAVPAVKTITILAMGQ1DG~~LL~~SGVCFVGLNSLDPLRGFVLAPL  
FVYLFIGTSFLLAGFVSLFRIRTIMKHDGTKEKLMVRIGVFSVLYTVPATIVIACY  
FYEQAFR~~E~~HWERSWVSQHCKSLAI PCPAHYTPRMSPDFTVYMIKYLMTLIVGITSGFWI  
SGKTLHSWRK~~FY~~TRLTNSR~~H~~GETTV

Secuencia de aminoácidos del dominio Fri de FZD2 humano (SEQ ID NO: 32; aminoácidos 24-159 de la SEQ ID NO: 30):

QFHGEKG~~I~~SPDHGFCQPI IPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQ  
CSPELRFFLCSMYAPVCTVLEQAI PPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPRLCEHFPR  
HGAEQICVGQNHSEDG

## FIGURA 19

Secuencia de ADN de longitud completa de FZD1 humano (SEQ ID NO: 29):

ATGGCTGAGGAGGAGGCGCCTAAGAAGTCCGGGCCGGCGAGCTGGAA  
 CTTTGTGCCGGGGCGCTCTGGCCCGGCTGGCGAGGAGGGCAGCGGGACGCCGGTGGC  
 CGCCGCCGCCAGTTGACCCCCGGCGATTGGCGCGCCAGCTGCTGCTGCTGCTTGG  
 CTGCTGGAGGCTCCGCTGCTGGCTGGGGTCCGGGCCAGGGCGGGCCAGGGCCAGGC  
 CAGGGGCCGGCCGGCAGCAACGCCGCGCCCTCAGCAGCAACAGAGCGGGCAG  
 CAGTACAACGGCAGCGGGCATCTCCGCCCCGACCAACGGCTATTGCCAGCCATCTCC  
 ATCCCGCTGTGCACGGACATCGCGTACAACCAGACCATCATGCCAACCTGCTGGCCAC  
 ACGAACCAAGGAGGACGCCGGCTGGAGGTGACCCAGTTCTACCCCTCTAGTGAAGTGCAG  
 TGTTCCGCTGAGCTCAAGTTCTCCTGTGCTCCATGTACCGCCCGTGTGCACCGTGCTA  
 GAGCAGGGCTGCCGCCCTGCCGCTCCCTGTGCGAGCCGCGCCAGGGCTGCCAGGGC  
 CTCATGAACAAGTTGGCTTCCAGTGGCCAGACACGCTCAAGTGTGAGAAGTCCGGTG  
 CACGGCGCCGGCAGCTGTGCGTGGGCCAGAACACGTCGACAAGGGCACCCGACGCC  
 TCGCTGCTCCAGAGTTCTGGACCAACCTCAGCACGGCGGGAGGGCACCGTGGC  
 GGCTTCCCGGGGCGCCGGCGTCGGAGCGAGGCAAGTTCTCTGCCCGCGCCCTC  
 AAGGTGCCCTCCTACCTCAACTACCAACTTCTGGGGAGAAGGACTGCCGACCTTG  
 GAGCCGACCAAGGTGTATGGGCTCATGTACTTGGGCCGAGGAGCTGCCCTCTCGCG  
 ACCTGGATTGGCATTGGTCAGTGTGCTGCCCTCACGCTCTCACGGTGTACCG  
 TACCTGGTGGACATGCCGCTTCAGCTACCCGGAGCGGCCATCATCTCTGTCCGGC  
 TGTTACACGGCGTGGCGTGGCCTACATGCCGCTTCTCTGGAAAGACCGAGTGGTG  
 TGTAAATGACAAGTTGCCGAGGACGGGACCGCACTGTGGCGAGGGCACCAAGAAGGAG  
 GGCTGCACCATCCTCTCATGATGCTACTTCTCAGCATGGCAGCTCCATCTGGTGG  
 GTGATCCTGCGTCACCTGGTCTGGCGTGGCATGAAGTGGGCCACGAGGCCATC  
 GAAGCCAACCTCACAGTATTTCACCTGGCCCTGGCTGTGCGCCGGCATCAAGACCATC  
 ACCATCCTGGCGCTGGCCAGGTGGACGGCAGTGTGCTGAGCGAGTGTGCTTGTGG  
 CTTAACAACTGGACCGCGCTCGTGGCTTCGTGCTGGCGCCCTCTCGTGTACCTGTT  
 ATCGGCACGTCTTCTGCTGGCCGGCTTGTGTCGCTCTCCGACCGCACCATCATG  
 AAGCACGATGGCACCAAGACCGAGAAGCTGGAGAAGCTCATGGTGCCTGGCGTCTTC  
 AGCGTGTGACACTGTGCCAGCCACCATCGTCATGCCGCTGCTACTTCTACGAGCAGGCC  
 TTCCGGGACCAGTGGGAACGCAGCTGGTGGGCCAGAGCTGCAAGAGCTACGCTATCCCC  
 TGCCCTCACCTCCAGGCAGGCGGAGGCAGCCCGCCGACCCGCCATGAGCCGGACTTC  
 ACGGTCTTCATGATTAAGTACCTTATGACGCTGATCGTGGGCATCACGTGGCTCTGG  
 ATCTGGTCCGGCAAGACCCCTCAACTCTGGAGGAAGTTCTACACGAGGCTACCAACAGC  
 AAACAAGGGAGACTACAGTCTGA

## FIGURA 20

Secuencia de ADN de longitud completa de FZD2 humano (SEQ ID NO: 33):

ATGCGGCCCCCGAGCGCCCTGCCCGCCTGCTGCTGCGCTGCTGCTGCCCGCC  
 GGGCGGCCAGTCCACGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGACCACGGCTTGCCAG  
 CCCATCTCCATCCCGCTGTGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATATGCCAACCTT  
 CTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCAGGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTG  
 AAGGTGCAGTGCTCGCCGAACCTGCGCTTCTTCCTGTGCTCCATGTACGCACCCGTGTGC  
 ACCGTGCTGGAACAGGCCATCCCGCGCTCATCTGTGAGCGCGCGCCAGGGC  
 TCGAAGCCCTCATGAACAAGTCGGTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGCGAGCAC  
 TTCCCGGCCACGGCGCCAGCAGATCTCGCTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCT  
 CCCGCGCTACTCACCACCGCGCCGCCGGACTGCAGCCGGTGCCGGGGCACCCCG  
 GGTGGCCCGGGCGGCCGGCGCTCCCCCGCGCTACGCCACGCTGGAGCACCCCTCCAC  
 TGCCCGCGCGTCCCTCAAGGTGCCATCCTATCTCAGCTACAAGTTCTGGCGAGCGTGAT  
 TGTGCTGCGCCCTGCAACCTGCGCGCCGATGGTCCATGTTCTTCACAGGAGGAG  
 ACGCGTTTCGCGCGCCTCTGGATCCTCACCTGGTCGGTGTGCTGCGCTTCACCTTC  
 TTCACTGTCACCACGTACTGGTAGACATGCGCTTCCGCTACCCAGAGCGCCCTATC  
 ATTTTCTGTCGGCTGCTACACCATGGTGTGGCTACATCGGGGCTTCGTGCTC  
 CAGGAGCGCGTGGTGTGCAACGAGCGCTCTCCGAGGACGGTTACCGCACGGTGGTGCAG  
 GGCACCAAGAAGGAGGGCTGCACCATCCTCTCATGATGCTCTACTTCTTCAGCATGGCC  
 AGCTCCATCTGGGGTCATCCTGTCGCTCACCTGGTCCCTGGCAGCCGGCATGAAGTGG  
 GGCCACGAGGCCATCGAGGCCACTCTCAGTACTTCCACCTGGCGCTGGCGCTGCC  
 GCCGTCAAGACCATCACCATCCTGGCATGGCCAGATCGACGGCGACCTGCTGAGCGGC  
 GTGTGCTTCGTAGGCCTCAACAGCCTGGACCCGCTGCGGGCTTCGTGCTAGCGCCGCTC  
 TTGGTGTACCTGTTCATGGCACGTCCTCCTGGCGCTTCGTGCTGCGCTTC  
 ATCCGCACCATCATGAAGCACGACGGCACCAAGACCGAAAAGCTGGAGCGGCTATGGT  
 CGCATCGCGCTTCTCCGTGCTACACAGTGGCGCACCACATGTCATCGCTGCTAC  
 TTCTACGAGCAGGCCTTCCGCGAGCACTGGGAGCGCTGTTGAGGCCAGCACTGCAAG  
 AGCCTGGCCATCCCGTGGCCGGCGACTACACGCCGCGATGTCGCCCACCTACGGTC  
 TACATGATCAAATACCTCATGACGCTCATCGTGGGCATCACGTCGGGCTTCTGGATCTGG  
 TCGGGCAAGACGCTGCACTCGTGGAGGAAGTTCTACACTCGCCTACCAACAGCCGACAC  
 GGTGAGACCACCGTGTGA

**FIGURA 21**

Secuencia de aminoácidos de longitud completa de FZD3 humano (SEQ ID NO: 34):

MAMTWIVFSLWPLTVFMGHIGGHSLFSCEPITLRCMCQDLPYNTTFMPNLLNHYDQQTAAL  
AMEPFHPMVNLDCSRDFRPFLCALYAPICMEYGRVTLPCRRLCQRAYSECSKLMEMFGVP  
WPEDMECSRFPDCDEPYPRLVLDLNLAGEPTEGAPVAVQRDYGFWCPRRELKIDPDLGYSFL  
HVRDCSPPCPNMYFRREELSFARYFIGLISIICLSATLFTFLTFLIDVTRFRYPERPIIF  
YAVCYMMVSLIFFIGFILLEDRVACNASIPAQYKASTVTQGSHNKACTMLFMILYFFTMA  
SVWWVILITITWFLAAVPKGSEAIKKALLFHASAWGIPGTLTIILLAMNKIEGDNISGV  
CFVGLYDVLDALRYFVLAPLCLYVVGVSSLLAGIISLNVRVIEIPLEKENQDKLVKFMIR  
IGVFSILYLVPLLVVICFYEQAYRGIWETTWIQCERCREYHIPCPCYQVTQMSRPDLILF  
LMKYLMALIVGIPSVFWVGSKKTCFEWASFFHGRRKKEIVNESRQVLQEPDFAQSLLRDP  
NTPIIRKSRTSTQGTSTHASSTQOLAMVDDQRSKAGSIHSKVSSYH GSLHRSRDGRYTPC  
SYRGMEERLPHGSMSRLTDHSRHSSSHRLNEQSRHSSIRDLNNPMTITHGTSMNRVIE  
EDGTS

Secuencia de aminoácidos del domino Fri de FZD3 humano (SEQ ID NO: 36; aminoácidos 18-143 de la SEQ ID NO: 34):

GHIGGHSLFSCEPITLRCMCQDLPYNTTFMPNLLNHYDQQTAALAMEPFHPMVNLDCSRDF  
RPFLCALYAPICMEYGRVTLPCRRLCQRAYSECSKLMEMFGVPWPEDMECSRFPDCDEPY  
PRLVDL

**FIGURA 22**

Secuencia de aminoácidos de longitud completa de FZD4 humano (SEQ ID NO: 38):

MLAMAWRGAGPSVPGAPGGVGGLSLGLLLQLLQLLGPARFGDEEERRCDPIRISM  
CQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDALQLTTFTPLI  
QYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINIPIGPC  
GGMCLSVKRRCEPVLKEFGFAWPESLNCSKFP  
PQNDHNCMEPGPGDEEVPLPHKTPIQP  
GEECHSVGTNSDQYIWVKRSLN  
CVLKGYDAGLYSRSAKEFTDIWMAVWASLCF  
ISTAFTVLTFLIDSSRFSYPERPIIFLSMCYNIYSIAYIVRLTVGRERI  
SCDFEEAAEPVLIQEGLKNTGCAIIFLLMYFFGMASSIWWVIL  
LTWTFLAAGLKGHEAIEMHSSYFHIAAWAIPAV  
KTIVILIMRLVDADEL  
TGLCYVGNQNLDALTGFVVA  
PLFTYLVIGTLFIAAGLVALFKIR  
SNLQKDGT  
KTDKLERLMVKIGVFSVLYTVPATC  
VIACFYEI  
SNWALFRYSADDNSMAVE  
MLKIFMSLLVGITSGMWIWSAKTLHTWQKCSNRLVNSGKV  
KREKRGNGWVKPGKGSETVV

Secuencia de aminoácidos del dominio Fri de FZD4 humano (SEQ ID NO: 40; aminoácidos 40-170 of SEQ ID NO: 38):

FGDEEERRCDPIRISM  
CQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDALQLTTFTPLI  
QYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINIPIGPC  
GGMCLSVKRRCEPVLKEFGFAWPESLNCSKFP  
PQNDHNCMEPGPGDEEV

## FIGURA 23

Secuencia de ADN de longitud completa de FZD3 humano (SEQ ID NO 37):

ATGGCTATGACTGGATTGTCTCTCTTGGCCCTGACTGTGTTCATGGGCATATA  
 GGTGGGCACAGTTGTTCTGTGAACCTATTACCTTGAGGATGTGCCAAGATTGCCT  
 TATAATACTACCTCATGCCTAATCTCTGAATCATTATGACCAACAGACAGCAGCTTG  
 GCAATGGAGCCATTCCACCCATGGTGAATCTGGATTGTTCTCGGGATTCGGCCTTT  
 CTTTGTGCACTCTACGCTCTATTGTATGGAATATGGACGTGTCACACTCCCTGTCGT  
 AGGCTGTGTCAGCGGGCTTACAGTGAGTGTGTCAGCTATGGAGATGTTGGTGTCCCT  
 TGGCCTGAAGATATGAAATGCACTGGAGTAGGTTCCAGATTGTGATGAGCCATATCCTGACTT  
 GTGGATCTGAATTAGCTGGAGAACCAACTGAAGGAGCCCCAGTGGCAGTGCAGAGAGAC  
 TATGGTTTTGGTGTCCCCGAGAGTTAAAAATTGATCCTGATCTGGTTATTCTTTCTG  
 CATGTGCGTGATTGTTCACCTCCTGTCAAATATGTAATTCAAGAGAAGAACTGTCA  
 TTTGCTCGCTATTCATAGGATTGATTCAATCATTGCCCTCGGCCACATTGTTACT  
 TTTTTAACCTTTTGATTGATGTCACAAGATTCCGTATCCTGAAAGGCCTATTATATT  
 TATGCAGTCTGCTACATGATGGTATCCTTAATTTCCTCATTGGATTGGCTTGAAGAT  
 CGAGTAGCCTGCAATGCATCCATCCCTGACAATATAAGGCTTCCACAGTGACACAAGGA  
 TCTCATAATAAAGCCTGACCATGCTTTATGATACTCTATTTCCTACTATGGCTGGC  
 AGTGTATGGGGTAATTCTACCATCACATGGTTTAGCAGCTGTGCCAAAGTGGGGT  
 AGTGAAGCTATTGAGAAGAACGATTGCTGTTCACGCCAGTGCATGGGCATCCCCGA  
 ACTCTAACCATCATCTTTAGCGATGAATAAAATTGAAGGTGACAATTAGTGGCGTG  
 TGTTTGTGGCCTCTACGATGTTGATGCATTGAGATATTGTTCTGCTCCCCCTGCTG  
 CTGTATGTGGTAGTTGGGTTCTCTCTTAGCTGGCATTATATCCCTAAACAGAGTT  
 CGAATTGAGATTCCATTAGAAAAGGAGAACAGATAAAATTAGTGAAGTTATGATCCG  
 ATCGGTGTTTCAGCATTCTTATCTGTAACACTCTGGTTGTAATTGGATGCTACTTT  
 TATGAGCAAGCTTACCGGGCATCTGGAAACAACGTTGAGATACAAGAACGCTGCAGAGAA  
 TATCACATTCCATGTCCATATCAGGTTACTCAAATGAGTCGTCCAGACTTGATTCTCTT  
 CTGATGAAATAACCTGATGGCTCTCATAGTGGCATTCCTCTGTATTGGTTGGAAGC  
 AAAAGACATGCTTGAATGGCCAGTTTTCATGGTGTAGGAAAAAGAGATAGTG  
 AATGAGAGCCGACAGGTACTCCAGGAACCTGATTTGCTCAGTCTCTGAGGGATCCA  
 AATACTCTTATCATAAGAAAGTCAGGGAAACTTCAACTCAAGGAACATCCACCCATGCT  
 TCTTCACACTCAGCTGGCTATGGGATGATCAAAGAAGCAAAAGCAGGAAGCAGTCCACAGC  
 AAAGTGAGCAGCTACCACGGCAGCCTCCACAGATCACGTGATGGCAGGTACACGCCCTGC  
 AGTTACAGAGGAATGGAGGGAGAGACTACCTCATGGCAGCATGTCACGACTAACAGATCAC  
 TCCAGGCATAGTAGTTCTCATCGGCTCAATGAAACAGTCACGACATAGCAGCATCAGAGAT  
 CTCAGTAATAATCCCATGACTCATATCACACATGGCACCAGCATGAATCGGGTTATTGAA  
 GAAGATGGAACCAGTGCTTAA

## FIGURA 24

Secuencia de ADN de longitud completa de FZD4 humano (SEQ ID NO: 41):

ATGCTGGCCATGGCCTGGCGGGCGCAGGGCGAGCGTCCCGGGCGCCGGGGCGTC  
 GGTCTCAGTCTGGGTTGCTCTGCAGTTGCTGCTGCTCCTGGGCGCGCGGGCTTC  
 GGGGACGAGGAAGAGCGCGCTGCGACCCATCCGATCTCCATGTGCCAGAACCTCGGC  
 TACAACGTGACCAAGATGCCAACCTGGTGGCACGAGCTGCAGACGGACGCCAGCTG  
 CAGCTGACAACCTTCACACCGCTCATCCAGTACGGCTGCTCCAGCCAGCTGCAGTTCTTC  
 CTTTGTCTGTTATGTGCCAATGTGCACAGAGAACATCAACATCCCCATTGGCCATGC  
 GGCAGCATGTGCTTTCACTCAAGAGACGCTGTGAACCGCTCTGAAGGAATTGGATT  
 GCCTGGCCAGAGAGTCTGAACTGCAGCAAATTCCCACACAGAACGACCACACCACATG  
 TGCATGGAAGGGCCAGGTGATGAAAGAGGTGCCCTAACCTCACAAAACCCCCATCCAGCT  
 GGGGAAGAGTGTCACTCTGGAAACCAATTCTGATCAGTACATCTGGGTGAAAAGGAGC  
 CTGAACGTGTGCTCAAGTGTGGCTATGATGCTGGCTTACAGCCGCTCAGCCAAGGAG  
 TTCACTGATATCTGGATGGCTGTGGCAGCCTGTGTTCATCTCCACTGCCTTCACA  
 GTACTGACCTTCCTGATCGATTCTCTAGGTTTCTACCTGAGCGCCCCATCATATT  
 CTCAGTATGTGCTATAATATTATAGCATTGCTTATATTGTGAGGCTGACTGTAGGCCGG  
 GAAAGGATATCCTGTGATTTGAAGAGGCAGCAGAACCTGTTCTACCAAGAAGGACTT  
 AAGAACACAGGATGTGCAATAATTCTGCTGATGTAATTGGAAATGCCAGCTCC  
 ATTTGGTGGTTATTCTGACACTCACTGGTTTGGCAGCAGGACTCAAATGGGTCT  
 GAAGCCATTGAAATGCACAGCTCTTATTCACATTGCGCCGGCATCCCCCAGTG  
 AAAACCATTGTCATCTGATTATGAGACTGGTGGATGCAGATGAACTGACTGGCTTG  
 TATGGTGGAAACCAAAATCTGATGCCCTCACGGGTTCTGGCTGGCTCCCTCTTACT  
 TATTGGTCATTGAAACTTGTCTTGCTGAGGTTGGTGGCCTTGTCAAAATTGCG  
 TCAAATCTCAAAAGGATGGACAAAGACAGACAAAGTTAGAAAGACTGATGGTCAAGATT  
 GGGGTGTTCTCAGTACTGTACACAGTCCCTGCAACGTGTGATTGCCGTTATT  
 GAAATCTCCAACGGGACTTTTGGTATTCTGAGATGATTCCAACATGGCTGTTGAA  
 ATGTTGAAAATTGTTATGTCTTGTGGGGCATCACTTCAGGCATGTGGATTGGTCT  
 GCCAAAACCTTCACACGTGGCAGAAGTGTCCAACAGATTGGTAATTCTGGAAAGGTA  
 AAGAGAGAGAAGAGAGGAAATGGTGGGTGAAGCCTGGAAAAGGCAGTGAGACTGTGGTA  
 TAA

## FIGURA 25

Secuencia de aminoácidos de longitud completa de FZD5 humano (SEQ ID NO: 42; el subrayado indica el DEC):

MARPDPSAPPSLLLLAQLVGRAAAASKAPVCQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQ  
DEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLRFFLCSMYTPICLPDYHKPLPPCRSVCERAKAGCSPLM  
RQYGFAWPERMSCDRLPVLGRDAEVLCMDYNRSEATTAPPRPFPPAKPTLPGPPGAPASGG  
ECPAGGPFVCKCREPFVPILKESHPLYNKVRTGQVPNCAVPCYQPSFSADERTFATFWIG  
LWSVLCCFISTSTTVATFLIDMERFRYPERPIIFLSACYLCVSLGFLVRLVVGHASVACSR  
EHNHIHYETTPALCTIVFLLVYFFGMASSIWWVILSLTWFLAAGMKGNEAIAGYAQYF  
HLAAWLIPSVKSITALALSSVDGPVAGICYVGNQNLNSLRGFVLGPLVLYLLVGTFLL  
AGFVSLFRIRSVIKQGGTKDKLEKLMIRIGIFTLLYTVPASIVVACYLYEQHYRESWEA  
ALTCACPGHDTGQPRAKPEYWVMLKYFMCLVVGITSGVWIWSGKTVEWRRFTSRCCCR  
PRRGHKSGGAMAAGDYPEASAALTGRTGPPGPAATYHKQVSLSHV

Secuencia de aminoácidos del dominio Fri de FZD5 humano (SEQ ID NO: 44; aminoácidos 27-157 de la SEQ ID NO: 42):

ASKAPVCQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLRFFL  
CSMYTPICLPDYHKPLPPCRSVCERAKAGCSPLMRQYGFAWPERMSCDRLPVLGRDAEVL  
CMDYNRSEATT

## FIGURA 26

Secuencia de aminoácidos de longitud completa de FZD6 humano (SEQ ID NO: 46; el subrayado indica el DEC):

MEMFTLLTCIFLPLLRGHSLFTCEPITVPRCMKMAYNMTFFPNLMGHYDQSIAAVEMEH  
FLPLANLECSPPNIETFLCAFVPTCIEQIHVVPPCRKLCEKVYSDCKKLIDTFGIRWPEE  
LECDRLQYCDETVPVTFDPHTEFLGPQKKTEQVQRDIGFWCPRHLKTSGQGYKFLGIDQ  
CAPPCPNMYFKSDELEFAKSFIGTVSIFCLCATLFFLTFLIDVRRFRYPERPIIYSVC  
YSIVSLMYFIGFLLGSTACNKADEKLELGDTTVVLSQNKACTVLFMLLYFFTMAGTVWW  
VILTITWFLAAGRKWSCEAIEQKAVWFHAVAWGPGFLTVMLLAMNKVEGDNISGVCFVG  
LYDLDASRYFVLLPLCLCVFGLSLLAGIISLHVRQVIQHDGRNQEKLKKFMIRIGV  
SGLYLVPLVTLLGCYVYEQVRNRITWEITWSDHCRQYHIPCPYQAKAKARPELALFMIKY  
LMTLIIVGISAVFWVGSKKTCTEWAGFFKRNRKRDPISESRRVLQESCEFFLKHNSKVKH  
KKHYKPSHKLKVISKSMGTSTGATHGTSAUITSHDLGQETLTEIQTSPETSMREV  
KADGASTPRLREQDCGEPASPAASISRLSGEQVDGKQAGSVSEARSEGRISPKSDITD  
TGLAQSNNLQVPSSEPSSLKGSTSLLVHPVSGVRKEQGGGGCHSDT

Secuencia de aminoácidos del dominio Fri de FZD6 humano (SEQ ID NO: 48; aminoácidos 19-146 de la SEQ ID NO: 46):

HSLFTCEPITVPRCMKMAYNMTFFPNLMGHYDQSIAAVEMEHFLPLANLECSPPNIETFL  
KAFVPTCIEQIHVVPPCRKLCEKVYSDCKKLIDTFGIRWPEELECDRLQYCDETVPTFD  
PHTEFLG

## FIGURA 27

Secuencia de ADN de longitud completa de FZD5 humano (SEQ ID NO: 45):

ATGGCTCGGCCTGACCCATCCCGCGCCCTCGCTGTTGCTGCTGCTCCCTGGCGCAGCTG  
 GTGGGCCGGCGGCCGCGTCCAAGGCCCCGGTGTGCCAGGAAATCACGGTGCCCATG  
 TGCCGCGGCATCGGCTACAACCTGACGCACATGCCAACAGTTCAACCACGACACGCAG  
 GACCGAGGCGGGCCTGGAGGTGCACCAGTTCTGGCCGCTGGTGGAGATCCAATGCTCGCCG  
 GACCTGCGCTTCTCCTATGCTCTATGTACACGCCATCTGCTGCCGACTACCACAAG  
 CCGCTGCCGCCCTGCCGCTCGGTGTGCGAGCGGCCAAGGCCGCTGCTGCCGCTGATG  
 CGCAGTACGGCTCGCCCTGGCCCGAGCGCATGAGCTGCGACCGCCTCCGGTGTGGC  
 CGCGACGCCGAGGTCTCTGCATGGATTACAACCCAGCGAGGCCACACGGGCCCGCC  
 AGGCCCTTCCCAGCCAAGCCCACCCCTCAGGCCAGGGGCCAGGGCGCCGCTCGGGGG  
 GAATGCCCGCTGGGGGCCGTCGTGCAAGTGTGCGAGGCCCTCGTGCCATTCTG  
 AAGGAGTCACACCCGCTCTACAACAAGGTGCGGACGGGCCAGGTGCCAACTGCGCGGTA  
 CCCTGCTACCAGCCGTCCTCAGTGCAGGCCACGTTGCCACCTCTGGATAGGC  
 CTGTGGTCGGTGTGCTTCATCTCCACGTCCACCACAGTGGCCACCTTCTCATCGAC  
 ATGGAACGCTTCCGCTATCCTGAGGCCCATCATCTTCCCTGTCAGCTGCTACCTGTG  
 GTGTCGCTGGCTTCCGGTCTGGCTGGCCATGCCAGCGTGGCCTGCGCAGCCGC  
 GAGCACAACCACATCCACTACGAGACCACGGGCCCTGCACTGTGCAACCACGCTTCC  
 CTGGTCTACTTCTCGCATGGCAGCTCATCTGGTGGTCATCTGTCGCTCACCTGG  
 TTCCCTGGCCGCCGGCATGAAGTGGGCCAACGAGGCCATCGCGGCTACGCGCAGTACTTC  
 CACCTGGCTGCGTGGCTCATCCCCAGCGTCAAGTCCATCACGGCACTGGCGTGAGCTCC  
 GTGGACGGGACCCAGTGGCGCATCTGCTACGTGGCAACCAGAACCTGAACCTCGCTG  
 CGCGGCTTCGTGCTGGCTCTCCGCATCCGCAGCGTCAAGCAGGGCGGCCAACAGC  
 GACAAGCTGGAGAAGCTCATGATCCGCATCGGCATCTCACGCTGCTACACGGTCCCC  
 GCCAGCATTGGTGGTGGCCTGCTACCTGTACGAGCAGCACTACCGCGAGAGCTGGAGGCG  
 GCGCTCACCTGCGCTGCCGGCCACGACACCGGCCAGCCCGCGCCAAGGCCAGTAC  
 TGGGTGCTCATGCTCAAGTACTCATGTGCTGGTGGTGGCATCACTGCGCTGCTGCG  
 ATCTGGTCGGCAAGACGGTGGAGTCGTGGCGGGTTTCAACCAGCCGCTGCTGCG  
 CGCGCGCCAGGACCGGGCCATGGCGCAGGGACTACCCGAGGCGAGC  
 GCCGCGCTCACAGGAGGACCGGGCCCGGGCCCCGCCACCTACCACAAAGCAGGTG  
 TCCCTGTCGACGTGTAG

## FIGURA 28

Secuencia de ADN de longitud completa de FZD6 humano (SEQ ID NO: 49):

ATGGAAATGTTACATTTGTTGACGTGTATTTCTACCCCTCTAAGAGGGCACAGT  
 CTCTTCACCTGTGAACCAATTACTGTTCCCAGATGTATGAAAATGGCCTACAACATGACG  
 TTTTCCCTAATCTGATGGTCATTATGACCAGAGTATTGCCGCGTGGAAATGGAGCAT  
 TTTCTTCTCTCGAAATCTGAAATGTCACCAAACATTGAAACTTCCCTCTGCAAAGCA  
 TTTGTACCAACCTGCATAGAACAAATTCATGTGGTCCACCTGTCTAAACTTGTGAG  
 AAAGTATATTCTGATTGCAAAAAATTAAATTGACACTTTGGATCCGATGGCCTGAGGAG  
 CTTGAATGTGACAGATTACAATACTGTGATGAGACTGTTCTGTAACTTTGATCCACAC  
 ACAGAATTCTGGTCCTCAGAAGAAAACAGAACAAAGTCAAAGAGACATTGGATTTGG  
 TGTCCAAGGCATCTTAAGACTCTGGGGACAAGGATATAAGTTCTGGGAATTGACCAG  
 TGTGCGCCTCCATGCCAACATGTATTAAAAGTGTGAGCTAGAGTTGCAAAAGT  
 TTTATTGGAACAGTTCAATATTGTCTTGCAACTCTGTTCACATTCTTACTTT  
 TTAATTGATGTTAGAAGATTCAAGATACCCAGAGAGACCAATTATATTACTCTGCTGT  
 TACAGCATTGTATCTCTTATGTAATTGATTGCTAGGCGATAGCACAGCCTGC  
 AATAAGGCAGATGAGAACAGCTAGAACATTGGTACACTGTTGCTTAGGCTCTAAAATAAG  
 GCTTGCACCGTTTGTTCATGCTTTGTATTTCACAATGGCTGGCACTGTGTGG  
 GTGATTCTTACCAATTACTTGGTTCTTAGCTGCAGGAAGAAAATGGAGTTGTGAAGCCATC  
 GAGCAAAAGCAGTGTGGTTCATGCTGTCATGGGAACACCAGGTTCTGACTGTT  
 ATGCTTCTTGCTATGAACAAAGTTGAAGGAGACAACATTAGTGGAGTTGCTTGTGG  
 CTTTATGACTGGATGCTCTCGCTACTTGTACTCTGCCACTGTGCTTTGTGTGTT  
 GTTGGGCTCTCTCTTTAGCTGGCATTATTCCTAAATCATGTTGACAAGTCATA  
 CAACATGATGGCCGGAACCAAGAAAAACTAAAGAAATTATGATTGAAATTGGAGTCTTC  
 AGCGGCTTGTATCTGTGCCATTAGTGCACACTCTCGGATGTTACGTCTATGAGCAAGTG  
 AACAGGATTACCTGGGAGATAACTTGGGTCTGTGATCATTGTCGTCACTACCATATCCA  
 TGTCTTATCAGGCAAAAGCAGGAAAGCTGACCAGAATTGGCTTATTATGATAAAATAC  
 CTGATGACATTAATTGTTGGCATCTCTGCTGTCTCTGGTTGGAAGCAAAAGACATGC  
 ACAGAATGGGCTGGTTTTAAACGAAATCGCAAGAGAGATCCAATCAGTGAAGTCGA  
 AGAGTACTACAGGAATCATGTGAGTTTCTTAAAGCACAATTCTAAAGTTAACACAAA  
 AAGAAGCACTATAACCAAGTTCACACAAGCTGAAGGTATTCCAAATCCATGGGAACC  
 AGCACAGGAGCTACGCAAATCATGGCACTCTGCACTAGCAATTACTAGCCATGATTAC  
 CTAGGACAAGAAACTTGCACAGAAATCCAAACCTCACAGAAACATCAATGAGAGAGGTG  
 AAAGCGGACGGAGCTAGCACCCCCCAGGTTAACAGAGAACAGGACTGTGGTGAACCTGCCTCG  
 CCAGCAGCATCCATCTCAGACTCTCTGGGAACAGGTCGACGGGAAGGGCCAGGCAGGC  
 AGTGTATCTGAAAGTGGCGGGAGTGAAGGAAGGATTAGTCCTAAAGAGTGTATATTACTGAC  
 ACTGGCCTGGCACAGAGCAACAATTGCAAGGTCCCCAGTTCTCAGAACCAAGCAGCCTC  
 AAAGGTTCCACATCTGCTGTTCACCCGGTTCAAGGAGTGAGAAAAGAGCAGGGAGGT  
 GGTGTCATTCAAGATACTTGA

## FIGURA 29

Secuencia de aminoácidos de longitud completa de FZD7 humano (SEQ ID NO: 50; el DEC está subrayado):

MRD PGAAAPLSS LGL CALV I ALL GALS A GAGA QPY HGE KG I SVP DHG F C QP I S I PL CTD I  
AYN QT I LPN LL GHTN QEDAG LEV H QF YPL V KV QCS PEL RFF L CSM YAP VCT VLD QAI PPC  
RSL CERAR QG CEA LMN KFG FQW PERL R CEN F PVH GAGE I CVG QNT SDG SGG PGG PTA YP  
TAP YLP DLP FTA L PPG A SDG RGR PAF P FSC P RQL K VPP YLG YRFL ERDC G A P C E P GRAN  
GLMY FKE EERR FARL WVG VWS VLCC A STL FTV LTV L DMRR FSY PERPI I FLS GCY FMVA  
VAHVAGFLLEDRAVCVERFSDDGYRTVAQGT KEGCT I L FMV LY FFGMASSIWWVILS LT  
WF LAAGMKGHEAI EANSQYFHLAAWAVPAVKTITI L AMQV DGL LSG VCYV GLSS VDA  
LRGF VLA PLF VYLF I GTS FLL A G FVSL FRI RTI MKHD GTK TEK L KMVR I GVF SVLY TV  
PATI VL A CYF YEQ A F R E H W E R T W L L Q T C K S Y A V P C P G H F P P M S P D F T V F M I K Y L M T M I V  
GITT GFWI WSG KTL Q SWR R F YH R L S H S S K G E T A V

Secuencia de aminoácidos del dominio Fri de FZD7 humano (SEQ ID NO: 52; aminoácidos 32-170 de la SEQ ID NO: 50):

AQPY HGE KG I SVP DHG F C QP I S I PL CTD I A YN QT I LPN LL GHTN QEDAG LEV H QF YPL V K  
VQCS PEL RFF L CSM YAP VCT VLD QAI PPC RSL CERAR QG CEA LMN KFG FQW PERL R CEN F  
PVH GAGE I CVG QNT SDG S G

## FIGURA 30

Secuencia de aminoácidos de longitud completa de FZD8 humano (SEQ ID NO: 54; el DEC está subrayado):

MEW GYL LEV T SLL A AL ALL QRS S GAA A A SAK E LAC Q E I TVPL CKG I G YN Y T Y MPN QF NHD  
TQ D EAG LEV H QF WPL V E I Q C S PDL K FFL CSM YTP I CLED YK KPL P P C R S V C E R A K A G C A P  
LMR QY GFA W PDR M R C DRL P E QGN P DTL C M D YN R T D L T A A P S P P R R L P P P P G E Q P P S G S  
GH G R P P G A R P P H R G G R G G G D A A P P A R G G G G G K A R P P G G A A P C E P G C Q C R A P M V S  
VS S E R H P L Y N R V K T G Q I A N C A L P C H N P F F S Q D E R A F T V F W I G L W S V L C F V S T F A T V S T F L  
ID M E R F K Y P E R P I I F L S A C Y L F V S V G Y L V R L V A G H E K V A C S G G A P G A G G A G G A A A G A  
GA A G A G A G G P G G R G E Y E E L G A V E Q H V R Y E T T G P A L C T V V F L L V Y F F G M A S S I W W V I L S L T  
WF LAAGMKGHEAI A G Y S Q Y F H L A A W L V P S V K S I A V L A L S S V D G D P V A G I C Y V G N Q S L D N  
LRGF VLA PLV I Y L F I G T M F L L A G F V S L F R I R S V I K Q Q D G P T K T H K L M I R L G L F T V L Y  
TV P A A V V V A C L F Y E Q H N R P R W E A T H N C P C L R D L Q P D Q A R R P D Y A V F M L K Y F M C L V V G I T S  
GV W V W S G K T L E S W R S L C T R C C W A S K G A A V G G G A G A T A A G G G G P G G G G G P G G G G P G G  
GGG S L Y S D V S T G L T W R S G T A S S V S Y P K Q M P L S Q V

Secuencia de aminoácidos del dominio Fri de FZD8 humano (SEQ ID NO: 56; aminoácidos 28-158 de la SEQ ID NO: 54):

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

## FIGURA 31

Secuencia de ADN de longitud completa de FZD7 humano (SEQ ID NO: 53):

ATGCGGGACCCGGCGGGCGCTCGCTTCGTCCTGGCCTCTGTGCCCTGGTGC  
 GCGCTGCTGGCGCACTGTCCGGGGCGCCGGGGCGCAGCCGTACACGGAGAGAAGGGC  
 ATCTCCGTGCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCGCTGTGCACGGACATC  
 GCCTACAACCAGACCATCCTGCCAACCTGCTGGGCCACACGAACCAAGAGGAGCGGGC  
 CTCGAGGTGCACCAAGTTCTACCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGTCTCCGAACCTCGCTT  
 TTCTTATGCTCCATGTATGCGCCCGTGTGCACCGTGCATCAGGCCATCCGCCGTGT  
 CGTTCTGTGCGAGCGGCCGCCAGGGCTGCGAGGCGCTCATGAACAAGTTGGCTTC  
 CAGTGGCCCAGCGGCTGCGTGCAGAAACTTCCCGTGCACGGTGCAGGGCAGATCTGC  
 GTGGGCCAGAACACGTGGACGGCTCCGGGGCCAGGGCGGGCCACTGCCTACCC  
 ACCGGCCCTACCTGCCGGACCTGCCCTTCACCGCCTGCCCGGCTCACATGGC  
 AGGGGGCGTCCCGCCTCCCTCTCATGCCCGCTCAGCTCAAGGTGCCCGTACCTG  
 GGCTACCGCTCCTGGGTGAGCGCGATTGTGGCGCCCGTGCAGAACCGGGCGTGC  
 GGCCTGATGTACTTTAAGGAGGAGGAGAGGGCGCTCGCCCGCCTCTGGGTGGCGTGT  
 TCCGTGCTGTGCGCCTCGACGCTCTTACCGTTCTCACCTACCTGGTGGACATGCG  
 CGCTTCAGCTACCCAGAGCGGCCATCATCTCCTGCGGCTGCTACTCATGGTGGCC  
 GTGGCGCACGTGGCGGCTTCCTCTAGAGGACCGCGCGTGTGCCTGGAGCGCTTC  
 GACGATGGCTACCGCACGGTGGCGCAGGGCACCAAGAACAGGAGGGCTGCACC  
 ATCTCTTC  
 ATGGTGCTCTACTTCTCGGCATGGCCAGCTCCATCTGGTGGGTCAATTCTGTCT  
 TGGTTCTGGCGCCGGCATGAAGTGGGGCACGAGGCCATCGAGGCCACTCGCAGTAC  
 TTCCACCTGGCCCGTGGCCGTGCCCCCGTCAAGACCATCACTATCCTGGCC  
 ATGGGT  
 CAGGTAGACGGGGACCTGCTGAGCGGGGTGTGCTACGTTGGCCTCTCAGTGT  
 GGACGCG  
 CTGCGGGGCTTCGTGCTGGCGCTCTGTTCTACCTCTCATAGGCACGT  
 CTGGCCGGCTTCGTGTCCTCTTCCGTATCCGCACCATCATG  
 AAAACACGACGGCACCAAG  
 ACCGAGAAGCTGGAGAAGCTATGGTGCATCGCGTCTTCAGCGTGC  
 TACACAGTG  
 CCCGCCACCATCGTCTGGCCTGCTACTTCTACGAGCAGGCC  
 TCCCGCGAGC  
 CGCACCTGGCTCTGCAAGACGTGCAAGAGCTATGCCGT  
 GCGGCTCTGCCGCCGGCCACTTC  
 CCGCCC  
 ATGAGCCCCGACTTCACCGTCTTCATGATCAAGTACCTGAT  
 GACCATGATCGTC  
 GGCATCACC  
 ACTGGCTCTGGATCTGGTGGCAAGACCC  
 TGCAGTC  
 GTGGCGCCGCTTC  
 TACACAGACTTAGCCACAGCAGCAAGGGGGAGACTGCGGTATGA

## FIGURA 32

Secuencia de ADN de longitud completa de FZD8 humano (SEQ ID NO: 57):

ATGGAGTGGGGTTACCTGTTGAAAGTGACCTCGCTGGCCGCTGGCGCTGCTGCAG  
 CGCTCTAGCGGCGCTGCGGCCGCTGGCCAAGGAGCTGGCATGCCAAGAGATCACCGTG  
 CCGCTGTGTAAGGGCATCGGCTACAACATCACCTACATGCCAATCAGTTCAACCACGAC  
 ACGCAAGACCGAGGCGGGCCTGGAGGTGCACCAGTCTGGCCGCTGGTGGAGATCCAGTGC  
 TCGCCCGATCTCAAGTTCTCCTGTGCAGCATGTACACGCCATCTGCCTAGAGGACTAC  
 AAGAAGCCGCTGCCGCCCTGCCGCTCGGTGTGCAGCGGCCAAGGCCGCTGCGCGCCG  
 CTCATGCGCCAGTACGGCTCGCCTGGCCCACCGCATGCGCTGCGACCGCTGCCGAG  
 CAAGGCAACCCCTGACACGCTGTGCATGGACTACAACCGCACCGACCTAACCAACGCCGCG  
 CCCAGCCCGCCGCGCCGCTGCCGCGCCGCCGGCGAGCAGCCGCTTCGGGCAGC  
 GGCCACGGCCGCCGCCGCCAGGCCACCGCGAGGCCAGGGCCAGGGCCGGTGGC  
 GGCGGGGACCGCGGCCGCCCCCAGCTCGCGGCCGGCGGTGGCGGGAAAGGCCGCGCC  
 CCTGGCGGCCGGCGCGCTCCCTGCAGGCCGGGTGCCAGTGCCGCGCCTATGGTGAGC  
 GTGTCCAGCGAGCGCCACCCGCTCTACAACCGCGTCAAGACAGGCCAGATCGCTAATG  
 GCGCTGCCCTGCCACAACCCCTTTTCAGCCAGGACGAGCGCCTCACCGTCTTCTGG  
 ATCGGCCTGTGGTCGGTGCCTGCTTCGTGTCCACCTCGCCACCGTCTCCACCTCCTT  
 ATCGACATGGAGCGCTCAAGTACCCGGAGCGGCCATTATCTCCTCTCGGCTGCTAC  
 CTCTCGTGTGGTGGCTACCTAGTGCCTGGTGGCGGGCACGAGAAAGGTGGCGTGC  
 AGCGGTGGCGCCGGCGCGGGGGCGCTGGGGCGGGCGCGGGCGGGCGCG  
 GGCGCGGCCGGCGCGGGCGCGGGCGGGCGCGAGTACGAGGAGCTGGC  
 GCGGTGGAGCAGCACGTGCGTACGAGAACCGGCCCGCGCTGTGCACCGTGGTCTTC  
 TTGCTGGTCTACTTCTCGGCATGGCAGCTCCATCTGGTGGTGATCTTGTGCTCACA  
 TGGTCCCTGGCGGCCGGTATGAAGTGGGCAACGAAGCCATCGCCGGCTACTCGCAGTAC  
 TTCCACCTGGCCGCGTGGCTTGTGCCCAGCGTCAAGTCATCGCGGTGCTGGCGCTCAGC  
 TCGGTGGACGGCGACCCGGTGGCGGGCATCTGCTACGTGGCAACCAGACCTGGACAAC  
 CTGCGCGCTTGTGCTGGCGCCGCTGGCATCTACCTCTCATCGGACCATGTTCTG  
 CTGGCCGGCTTGTGTCCTGTCCGCATCCGCTCGGTATCAAGCAACAGGACGGCCCC  
 ACCAAGACGACAAGCTGGAGAAGCTGATGATCCGCTGGCCTGTTCACCGTGTCTAC  
 ACCGTGCCCGCCGCGGTGGTCGCTGCCTTCTACGAGCAGCACACCGGCCGCG  
 TGGGAGGCCACGCACAACCTGCCGTGCCTGCGGGACCTGCAGCCGACCGCACGCAGG  
 CCCACTACGCCGTCTCATGCTCAAGTACTCATGTGCCTAGTGGTGGGCATCACCTCG  
 GGCGTGTGGTCTGGTCCGGCAAGACGCTGGAGTCTGGCGCTCCCTGTGCACCCGCTGC  
 TGCTGGGCCAGCAAGGGCGCCGGTGGCGGGGGCGGGCGCCACGGCCGGGGGG  
 GGCGGCCGGGCCGGGGCGGGCGGGGGACCCGGCGGCCGGGGGGGGGGGGGGGG  
 GGCGGGGGCTCCCTACAGCGACGTAGCACTGGCCTGACGTGGCGGTGGGCACGGCG  
 AGCTCCGTGTCTTATCAAAGCAGATGCCATTGTCCCAGGTCTGA

## FIGURA 33

Secuencia de aminoácidos de longitud completa de FZD9 humano (SEQ ID NO: 58):

MAVAPLRGALLWQLLAAGGAALEIGRFDPERGRGAAPCQAVEI PMCRGIGYNLTRMPNL  
LGHTSQGEAAAELAEFAPLVQYGCHSHLRF~~FLCSLY~~APMCTDQVSTPI PACRMCEQARL  
RCAPIMEQFNFGWPDSLDCARL~~PTRND~~PHALCMEAPENATAGPAEPHKGLGMLPVAPRPA  
RPPGDLGPGAGGSGTCENPEKFQYVEKSRSCAPRCGPGEVFW~~SRRDKDF~~ALVWMAWSA  
LCFSTAFTVLTFLLEPHRFQYPERPI IFLSMCYNVYSLAFLIRAVAGAQSVACDQEAGA  
LYVIQEGLENTGCTLVFLLLYYFGMASSLWWVVLTLTWFLAAGKKWGHEAIEAHGSYFHM  
AAWGLPALKTIVILTLRKVAGDELTGLCYVASTDAAALTGFVLVPLSGYLVLGSSFLLTG  
FVALFHIRKIMKTGGTNTEKLEKLMVKIGVFSILYTVPATCVIVCYVYERLNMDFWRLRA  
TEQPCAAAAGPGGRRDCSLPGGSVPTAVFMLKIFMSL~~LVV~~GITSGVWVWSSKTFQTWQSL  
CYRKIAAGRARAKACRAPGSYGRGTHCHYKAPTVLHMTKTDPSLENPTHL

Secuencia de aminoácidos del dominio Fri de FZD9 humano (SEQ ID NO: 60; aminoácidos 23-159 de la SEQ ID NO: 58):

LEIGRFDPERGRGAAPCQAVEI PMCRGIGYNLTRMPNLLGHTSQGEAAAELAEFAPLVQY  
GCHSHLRF~~FLCSLY~~APMCTDQVSTPI PACRMCEQARLRCAPIMEQFNFGWPDSLDCARL  
PTRNDPHALCMEAPENA

## FIGURA 34

Secuencia de aminoácidos de longitud completa de FZD10 humano (SEQ ID NO: 62; el DEC está subrayado):

MQRPGPRLWLVQVMGSCAAISMDMERPGDGKCQPIEIPMCKD~~I~~GYNMTRMPNLMGHEN  
QREAAIQLHEFAPLVEYGCHGHLRF~~FLCSLY~~APMCTEQVSTPI PACRMCEQARLKCSPI  
MEQFNFKWPDSLDCRKLPNKN~~D~~PN~~Y~~LCMEAPNNGSDE~~P~~TRGSGLF~~P~~FRPQRPHSAQEH  
PLKDGGPGRGGCDNPGKFHHVEKSASCAPLCTPGVDVYWSREDKRAVVWLAIWAVLCFF  
SSAFTVLTFLIDPARFRYPERPI IFLSMCYCYVSVGYLIRLFAGAESIACDRDSGQLYVI  
QEGLESTGCTLVFLVLYYFGMASSLWWVVLTLTWFLAAGKKWGHEAIEANSSYFH~~L~~AWA  
~~I~~PAVKTILILVMRRVAGDELTGV~~CYVG~~MDVNALTGFVL~~I~~PLACYL~~V~~IGTSFILSGFVAL  
FHIRRVMKTGGENTDKLEKLMVRIGLF~~S~~VLYTVPATCVIAC~~Y~~FYERLNMDYWKILAAQHK  
CKMNNQT~~K~~LDCLMAAS~~I~~PAVEIFMV~~K~~IFM~~L~~LLVVGITSGMW~~I~~WT~~S~~KT~~L~~QSWQQVCSRRLK  
KKSRRKPASVITSGGIYKKAQHPQKTHGKYE~~I~~PAQSPTCV

Secuencia de aminoácidos del dominio Fri de FZD10 humano (SEQ ID NO: 64; aminoácidos 21-154 de la SEQ ID NO: 62):

ISSMDMERPGDGKCQPIEIPMCKD~~I~~GYNMTRMPNLMGHENQREAAIQLHEFAPLVEYGCH  
GHLRF~~FLCSLY~~APMCTEQVSTPI PACRMCEQARLKCSPIMEQFNFKWPDSLDCRKLPN~~K~~  
ND~~PN~~YLCMEAPNNG

## FIGURA 35

Secuencia de ADN de longitud completa de FZD9 humano (SEQ ID NO: 61):

ATGGCCGTGGCGCCTCTGCGGGGGCGCTGCTGCTGTGGCAGCTGCTGGCGGGCGGC  
 GCGGCACTGGAGATCGGCCGCTTCGACCCGGAGCGCGGGCGCGGGCTGCGCCGTGCCAG  
 GCGGTGGAGATCCCCATGTGCCCGGGCATCGCTACAAACCTGACCCGATGCCAACCTG  
 CTGGGCCACACGTCGCAAGGGCGAGGGCGCTGCCAGCTAGCGGAGTTCGCGCCGCTGGT  
 CAGTACGGCTGCCACAGCCACCTGCGCTTCTTCTGTGCTCGCTCTACCGCCCATGTGC  
 ACCGACCAGGTCTGACGCCATTCCCGCTGCCGCCATGTGCGAGCAGGCCGCGCTG  
 CGCTGCCGCGCCATCATGGAGCAGTTCAACTTCGGCTGGCCGGACTCGCTCGACTGCGCC  
 CGGCTGCCACGCCAACGACCCGACGCCGCTGTGCATGGAGGCCGAGAACGCCACG  
 GCCGGCCCCGCCGGAGCCCCACAAGGGCTGGGCATGCTGCCGTGGCGCCGCCGGCG  
 CGCCCTCCCGAGACCTGGGCCCCGGCGGGCGAGCTGGCACCTGCGAGAACCCCCGAG  
 AAGTTCCAGTACGTGGAGAAGAGCGCTCGCGCACCGCGCTGCCGGCCGGCTCGAG  
 GTGTTCTGGTCCCAGCGACAAGGACTTCGCGCTGGTCTGGATGGCGTGTGGTCGGCG  
 CTGTGCTTCTCTCCACCGCCTTCACTGTGCTCACCTTCTTGTGGAGCCCCACCGCTTC  
 CAGTACCCCGAGGCCCATCATCTTCTCTCCATGTGCTACAACGCTACTCGCTGGCC  
 TTCCCTGATCCGTGCCGGTGGCCGGAGCGCAGAGCGTGGCTGTGACCAGGAGGCCGGCG  
 CTCTACGTGATCCAGGAGGGCCTGGAGAACACGGGCTGCACGCTGGTCTTCTACTGCTC  
 TACTACTCGGCATGCCAGCTCGCTCTGGTGGTCTGACGCTCACCTGGTCTCTG  
 GCTGCCGGAAAGAAATGGGCCACGAGGCCATCGAGGCCACGGCAGCTATTCCACATG  
 GCTGCCCTGGGCCCTGCCCGCCTCAAGACCATCGTCACTCTGACCCCTGCGCAAGGTGGCG  
 GGTGATGAGCTGACTGGCTTGCTACGTGGCCAGCACGGATGCAGCAGCGCTCACGGGC  
 TTCGTGCTGGTGGCCCTCTCTGGCTACCTGGTGTGGCAGTAGTTCTCTGACCGGGC  
 TTCGTGGCCCTCTCCACATCCGCAAGATCATGAAGACGGGCCACCAACACAGAGAAG  
 CTGGAGAACGCTCATGGTCAAGATCGGGCTTCTCCATCCTCTACACGGTGCCGCCACC  
 TCGCTCATCGTTGCTATGTCTACGAACGCCCTAACATGGACTCTGGCGCCTCGGGCC  
 ACAGAGCAGCCATCGCAGCGGCCGCCGGAGGCCGAGGGACTGCTCGCTGCCA  
 GGGGGCTCGGTGCCACCGTGGCGGTCTCATGCTAAAATTTCATGTCAGTCACTGGTGGTG  
 GGGATCACCAGCGCGCTGGGTGTGGAGCTCCAAGACTTTCCAGACCTGGCAGAGCCTG  
 TGCTACCGCAAGATAGCAGCTGCCGGGCCAGGCCCTGCCGCCGCCGGAGC  
 TACGGACGTGGCACGCAGCTGCCACTATAAGGCTCCACCGTGGTCTGCACATGACTAAG  
 ACGGACCCCTTTGGAGAACCCCCACACACACCTCTAG

## FIGURA 36

Secuencia de ADN de longitud completa de FZD10 (SEQ ID NO: 65):

ATGCAGCGCCGGGCCCCGCCTGGCTGGCTCTGCAGGTGATGGGCTCGTGCGCCGCC  
 ATCAGCTCATGGACATGGAGGCCGGGCGACGGCAAATGCCAGCCATCGAGATCCCG  
 ATGTGCAAGGACATCGGCTACAACATGACTCGTATGCCAACCTGATGGGCCACGAGAAC  
 CAGCCGAGGCAGCCATCCAGTTGCACGAGTTCGCGCCGCTGGTGGAGTACGGCTGCCAC  
 GGCCACCTCCGTTCTCCTGTGCTCGCTGTACCGCCGATGTGCACCGAGCAGGTCTCT  
 ACCCCCACATCCCCGCTGCCGGTCATGTGCGAGCAGGCCGCTCAAGTGCCTCCGATT  
 ATGGAGCAGTTCAACTCAAGTGGCCGACTCCCTGGACTGCCGAAACTCCCCAACAAAG  
 AACGACCCCAACTACCTGTGATGGAGGCCAACAAACGGCTCGGACGAGCCCACCCGG  
 GGCTCGGGCCTGTTCCCGCCGCTGTTCCGGCCGACGGGCCCCACAGCGCGCAGGAGCAC  
 CCGCTGAAGGACGGGGGGCCCGGGCGCGGGCTGCGACAACCCGGCAAGTCCACAC  
 GTGGAGAAGAGCGCGTGTGCGAGTGGCTGGCTGGCCATCTGGCGGTGCTGTGCTTCTTC  
 CGCGAGGACAAGCGCTCGCAGTGGCTGGCTGGCCATCTGGCGGTGCTGTGCTTCTTC  
 TCCAGCGCCTCACCGTGCTCACCTTCCTCATCGACCCGGCCGCTTCGCTACCCCGAG  
 CGCCCCATCATCTCCCTCCATGTGCTACTGCGTCTACTCCGTGGCTACCTCATCCGC  
 CTCTCGCCGGCGCCGAGAGCATCGCTGCGACCGGGCACAGCGGCCAGCTATGTCATC  
 CAGGAGGGACTGGAGAGCACCGGCTGCGACGCTGGCTTCCTGGCCTCTACTACTCGGC  
 ATGGCCAGCTCGCTGGTGGTGGCTCACGCTCACCTGGTTCTGGCCGGCAAG  
 AAGTGGGGCACGAGGCCATCGAAGCCAACAGCAGCTACTTCCACCTGGCAGCCTGGCC  
 ATCCCGGCGGTGAAGACCATCCTGATCCTGGTATGCGCAGGGTGGGGGGACGAGCTC  
 ACCGGGGCTGCTACGTGGCAGCATGGACGTCAACGCGCTCACCGGCTTCGTGCTCATT  
 CCCCTGGCTGCTACCTGGTATCGGCACGTCTTCATCCTCTCGGGCTTCGTGGCCCTG  
 TTCCACATCCGGAGGGTGATGAAGACGGGGCGAGAACACGGACAAGCTGGAGAACGCTC  
 ATGGTGCATCGGGCTTCTCTGTGCTGTACACCGTGCCTGGCACCTGTGTGATGCC  
 TGCTACTTTACGAACGCTCAACATGGATTACTGGAAGATCCTGGCGCGACACAAG  
 TGCAAAATGAACAACCAGACTAAAACGCTGGACTGCCATGGCCCTCCATCCCCGCC  
 GTGGAGATCTCATGGTGAAGATCTTATGCTGCTGGTGGTGGGATCACCAGCGGGATG  
 TGGATTGGACCTCCAAGACTCTGCAGTCCGGCAGCAGGTGTGCAGCCGTAGGTTAAAG  
 AAGAAGAGCGGGAGAAAACGGCCAGCGTGTACCCAGCGGTGGGATTACAAAAAGCC  
 CAGCATCCCCAGAAAACCTACCCAGGGAAATATGAGATCCCTGCCAGTCGCCACCTGC  
 GTGTGA

FIGURA 37

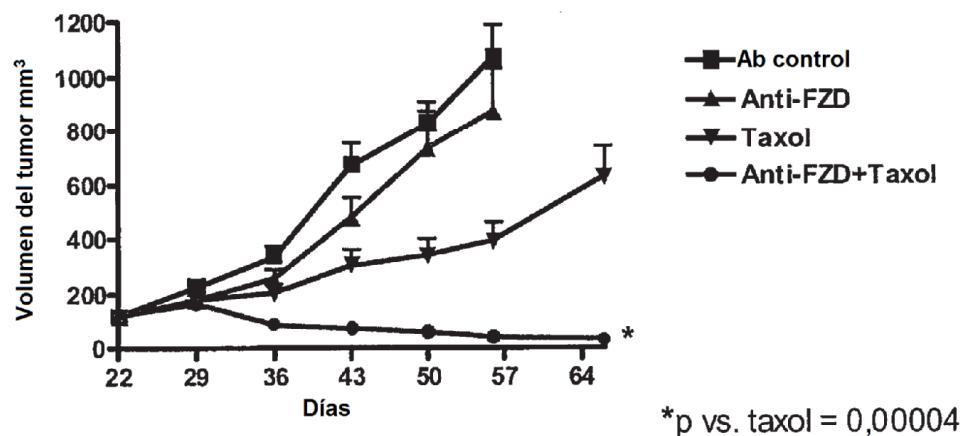


FIGURA 38

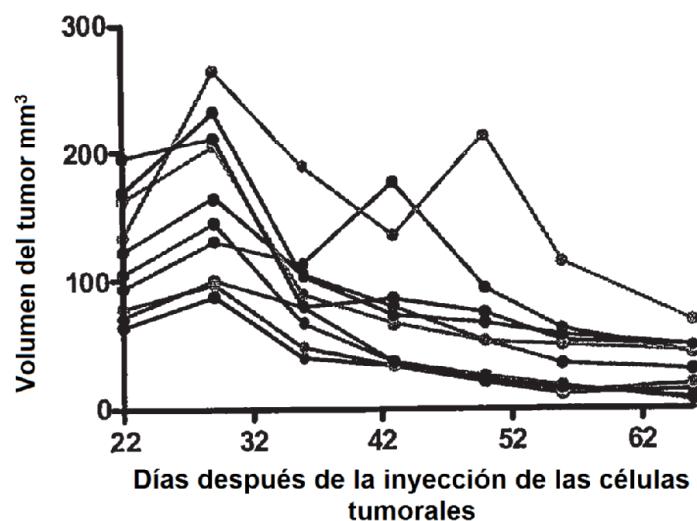
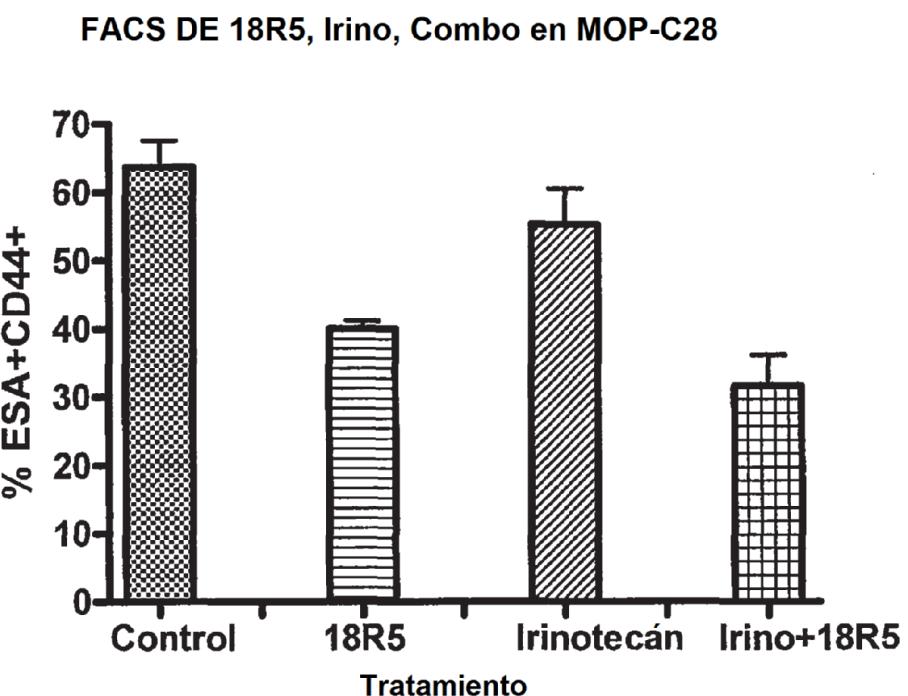


FIGURA 39



**FIGURA 40**

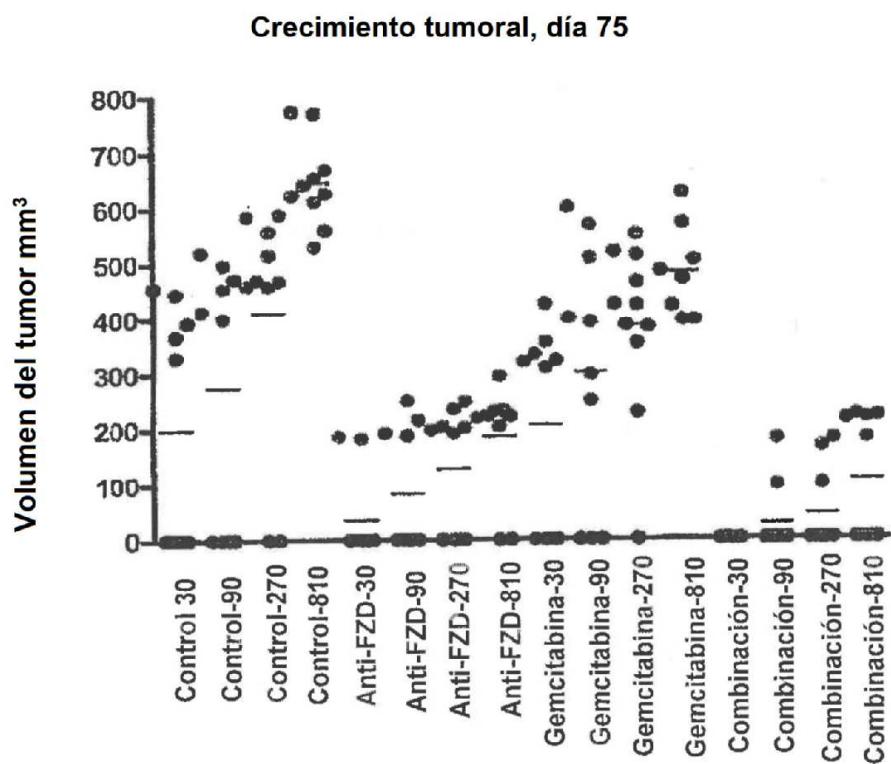


FIGURA 41

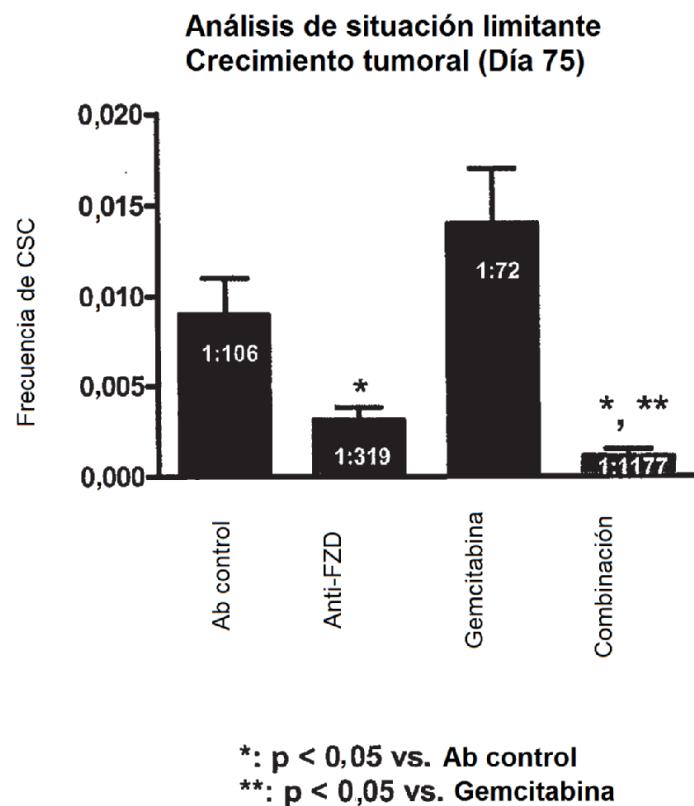


FIGURA 42

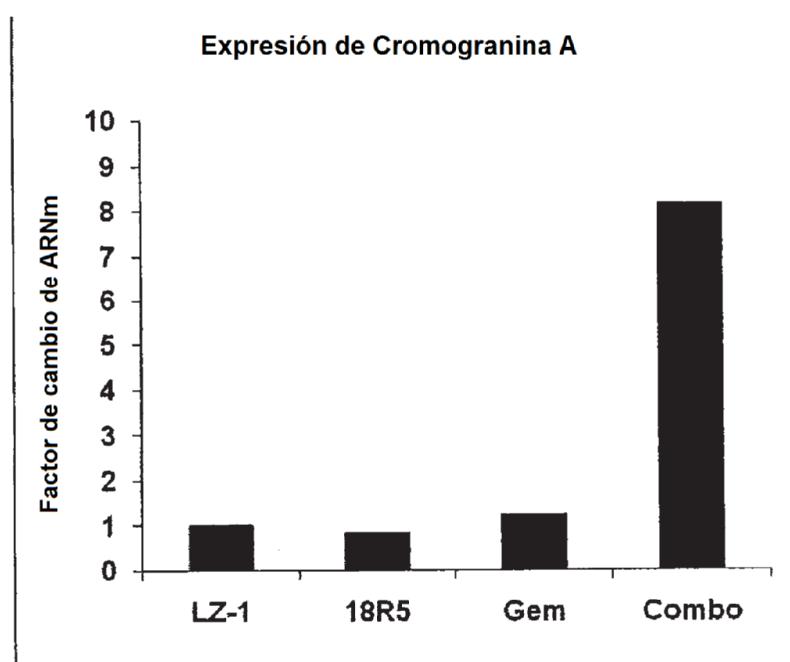


FIGURA 43

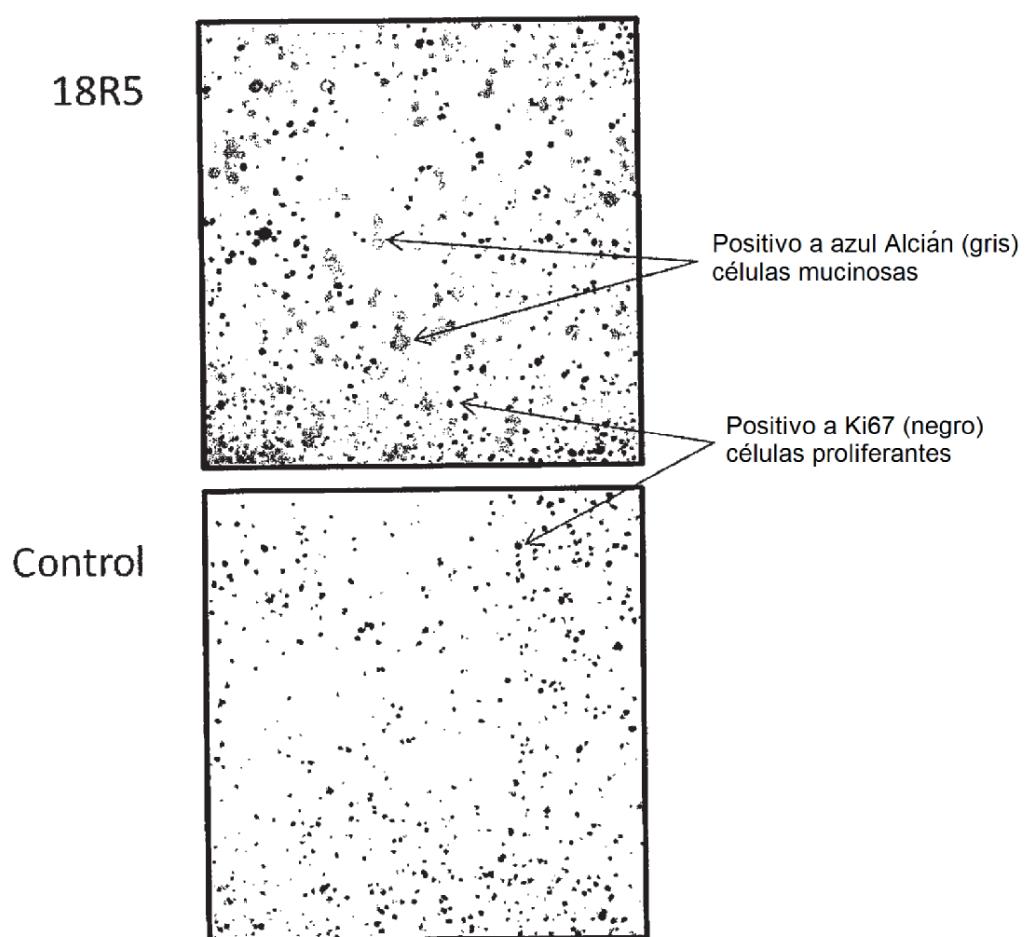


FIGURA 44

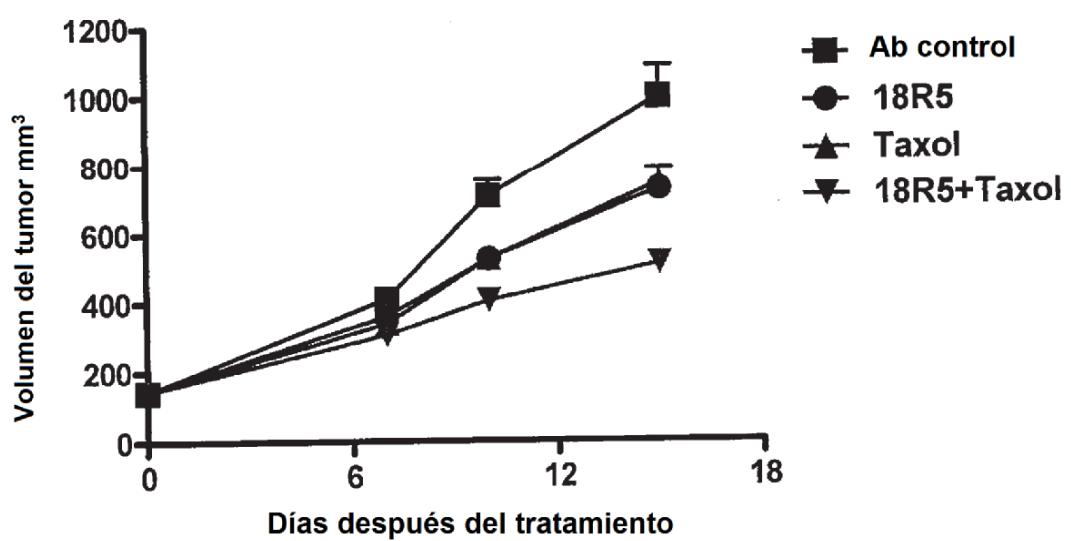


FIGURA 45

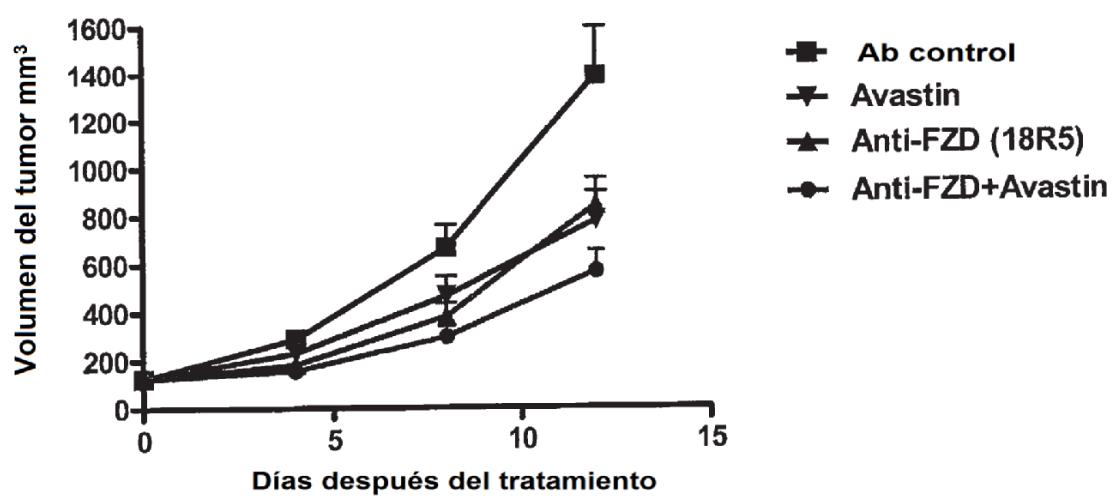
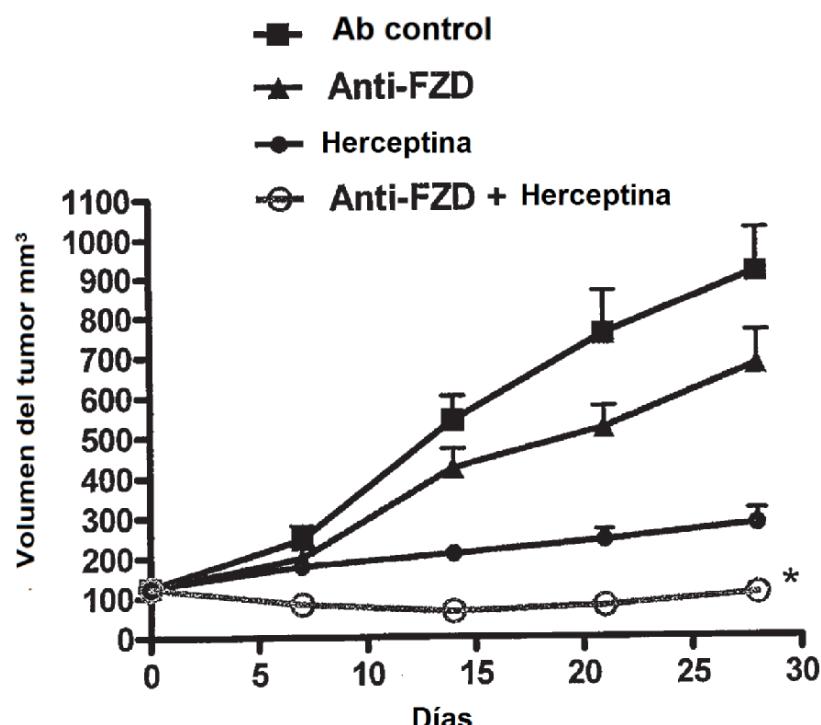


FIGURA 46



\*p = 0,0005 vs. herceptina

Figura 47

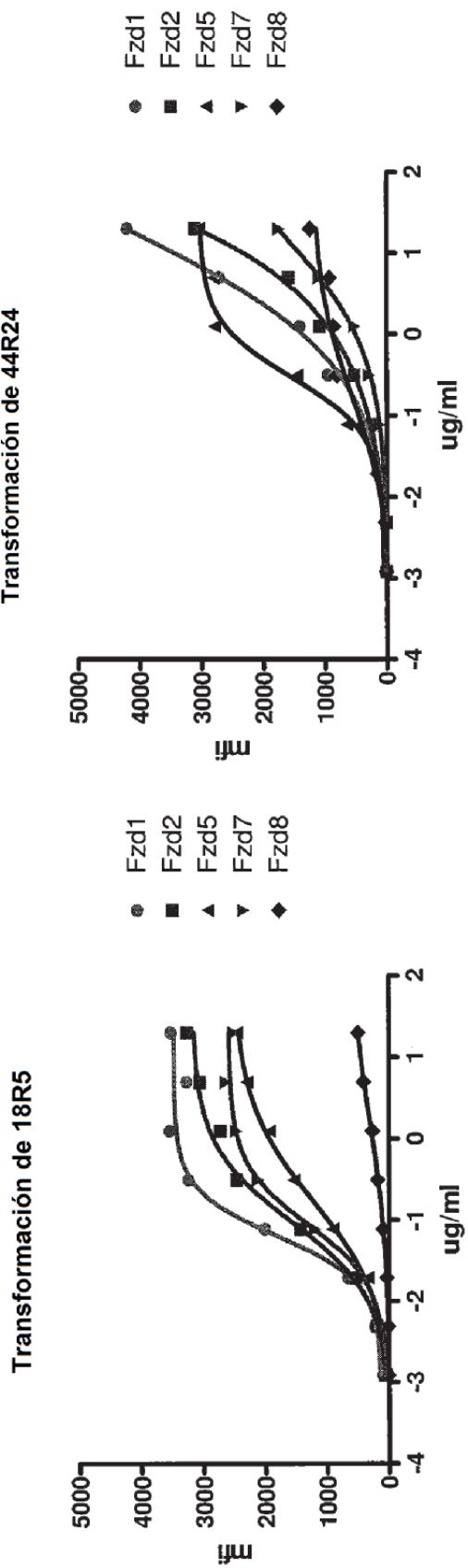


Figura 48

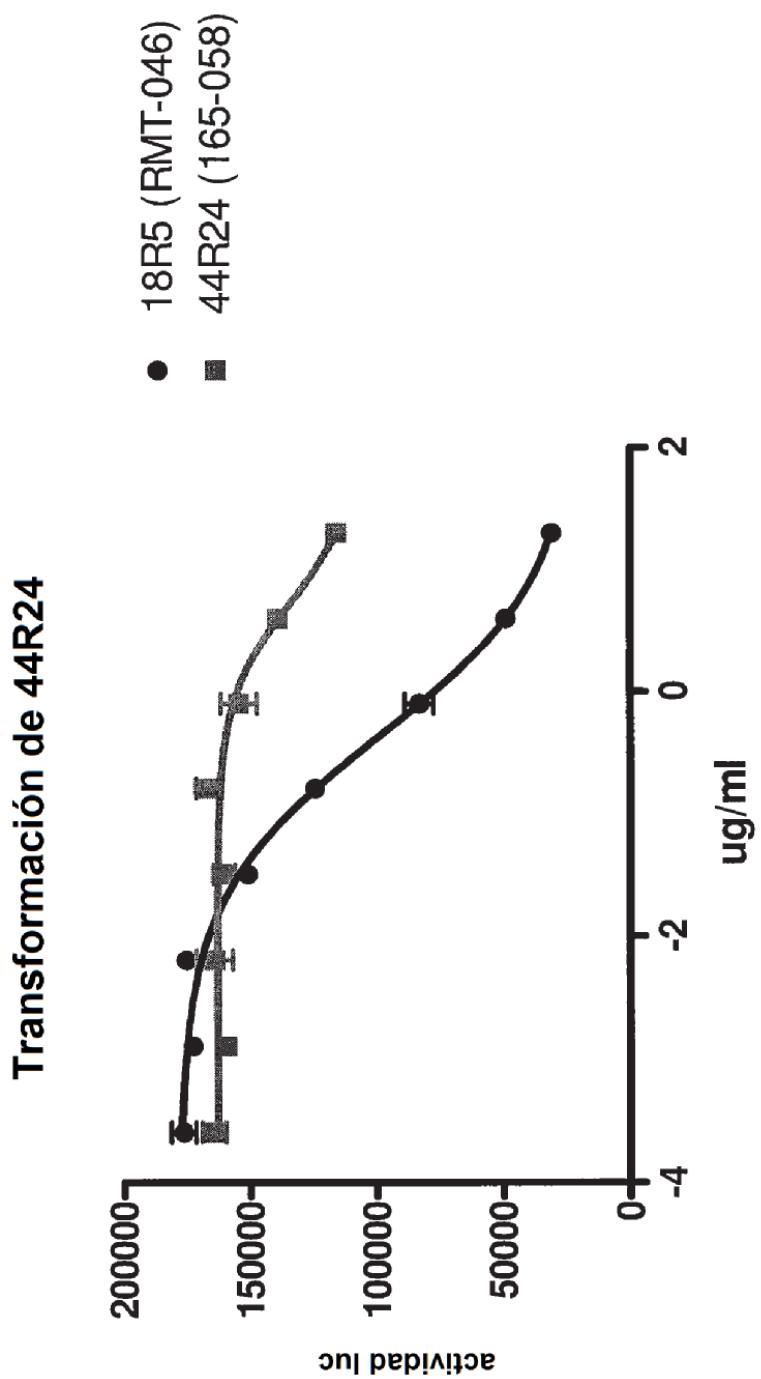


Figura 49

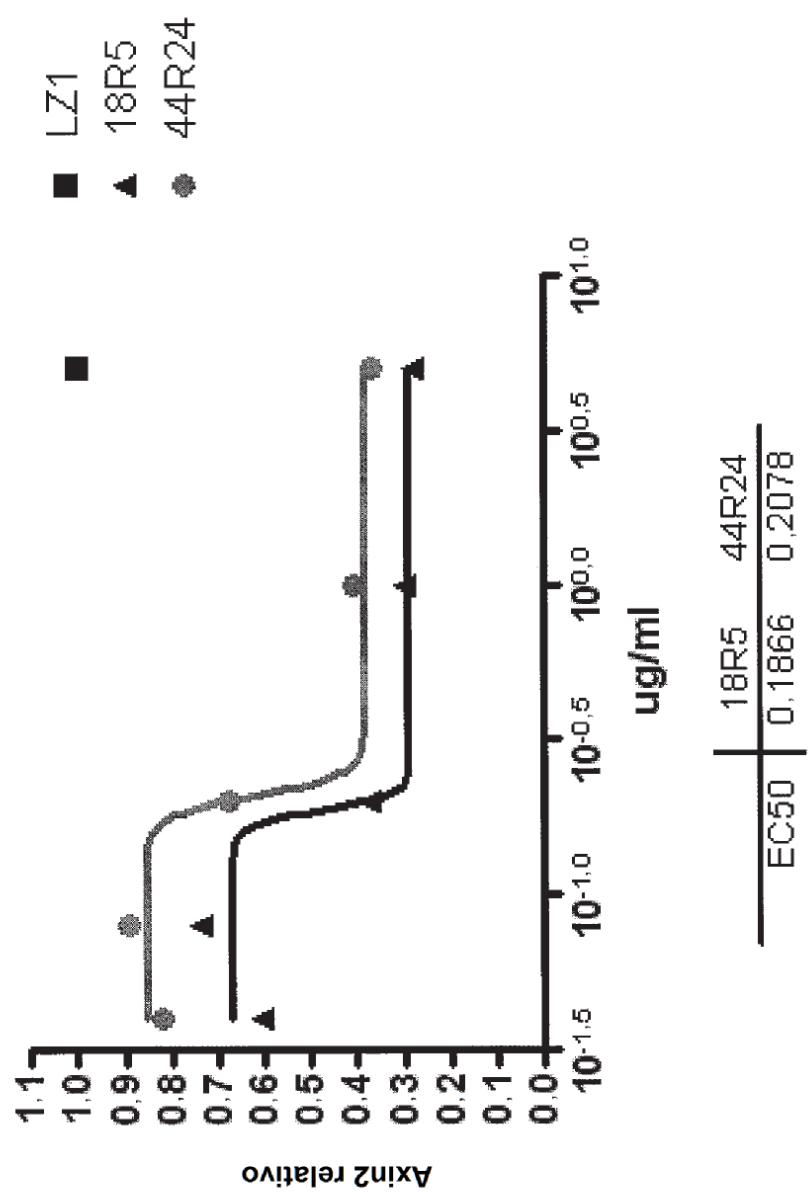
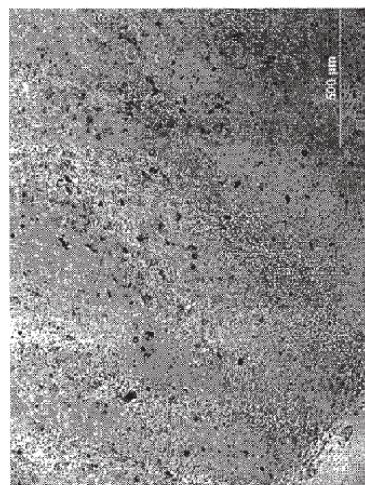
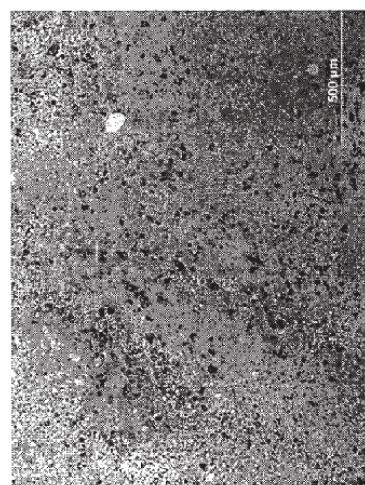


Figura 50



44R24



18R5



LZ1

Figura 51

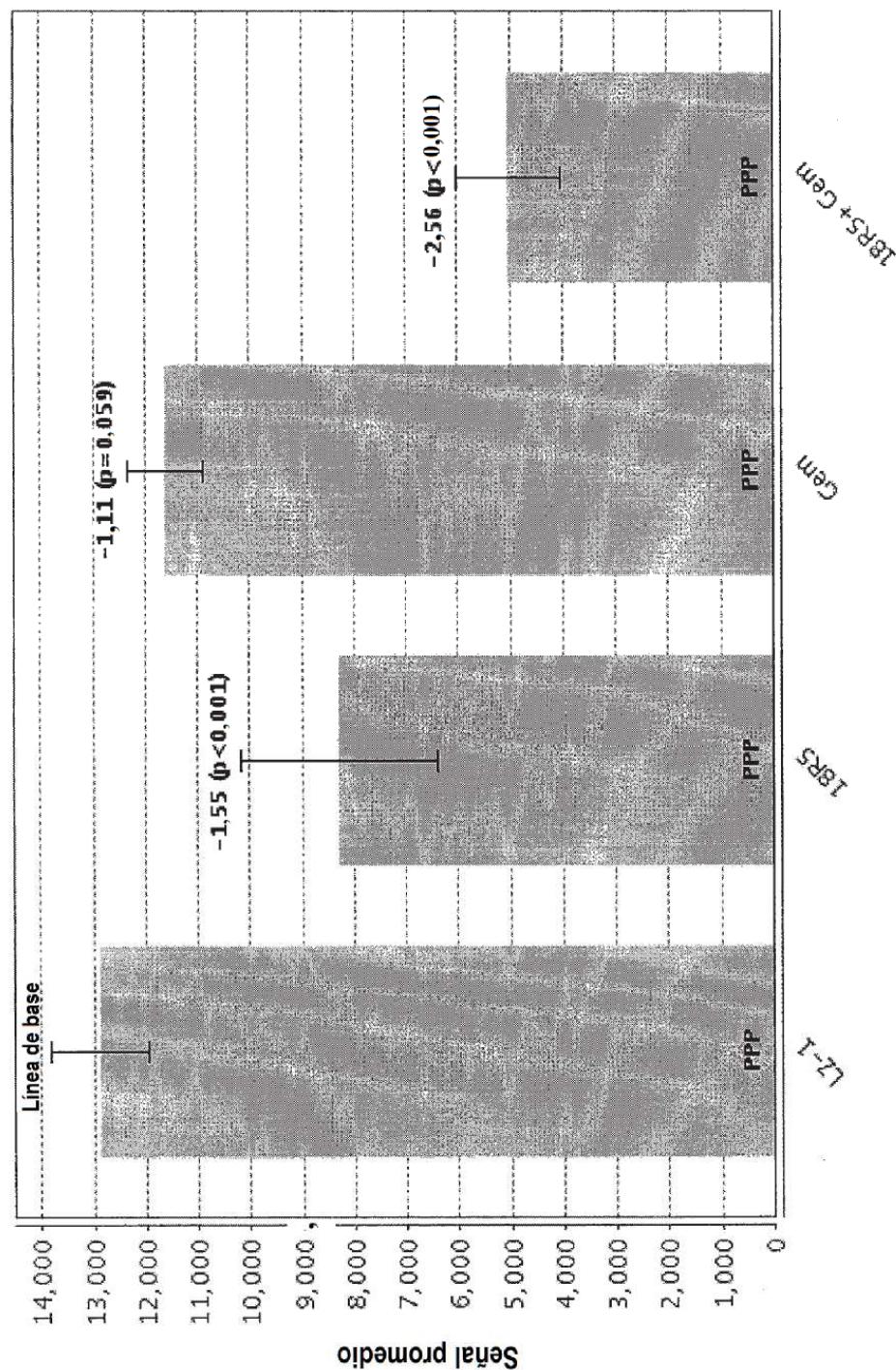
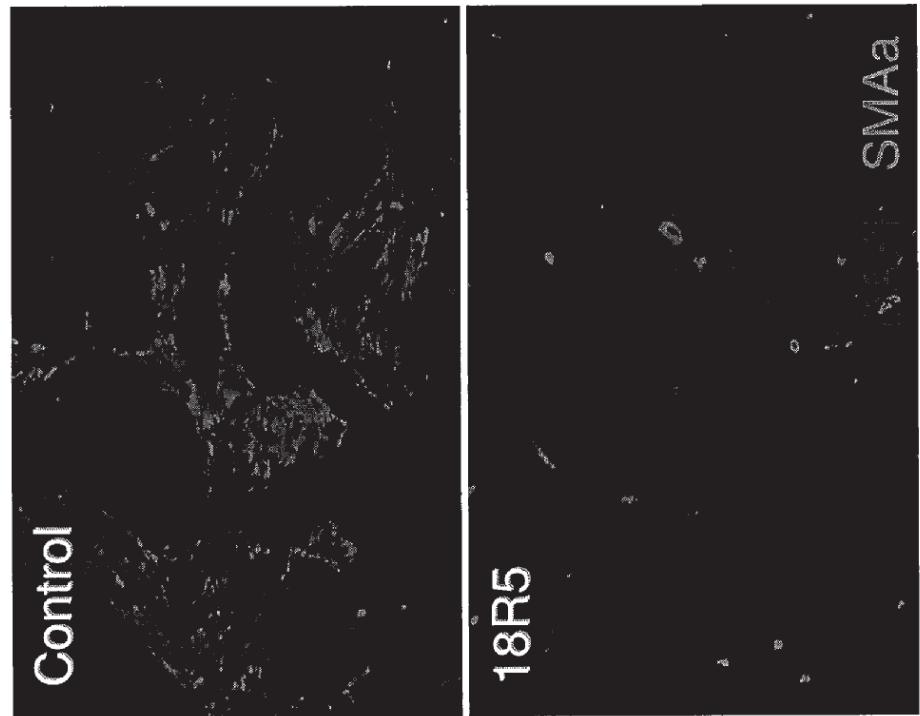


Figura 51



B.

Figura 52

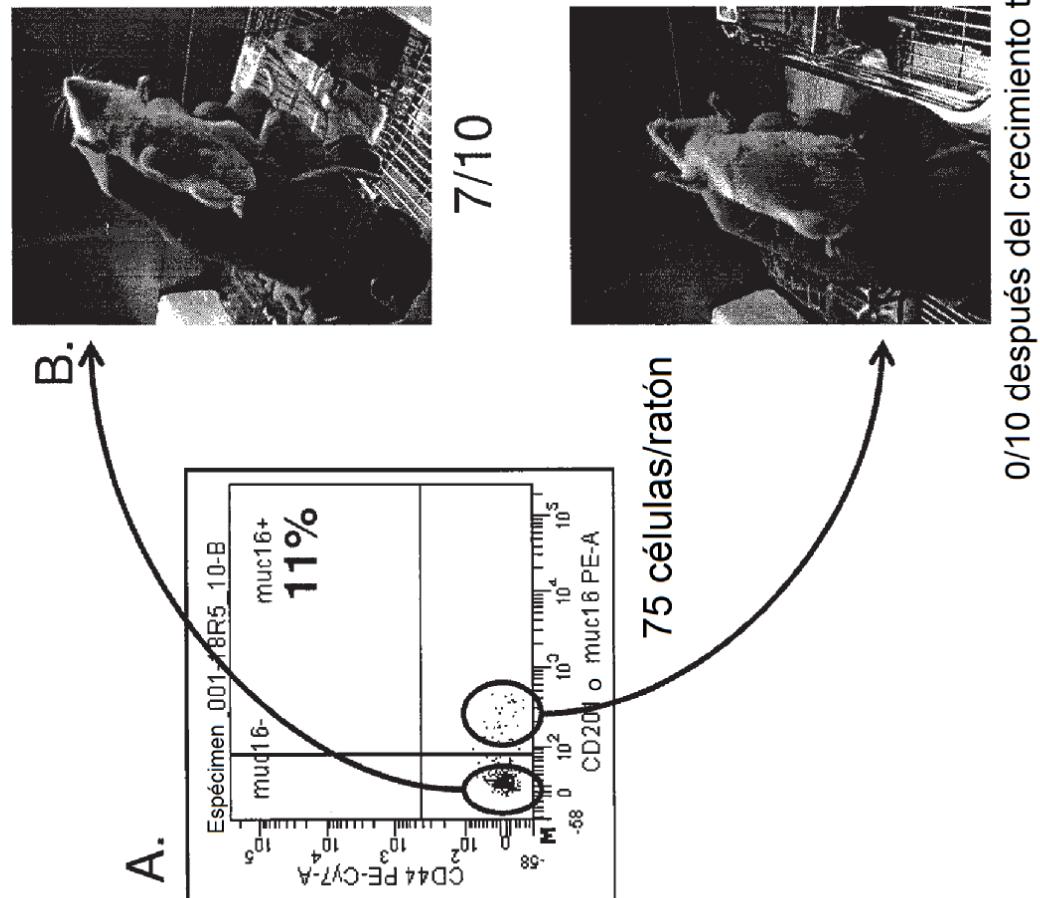


Figura 52

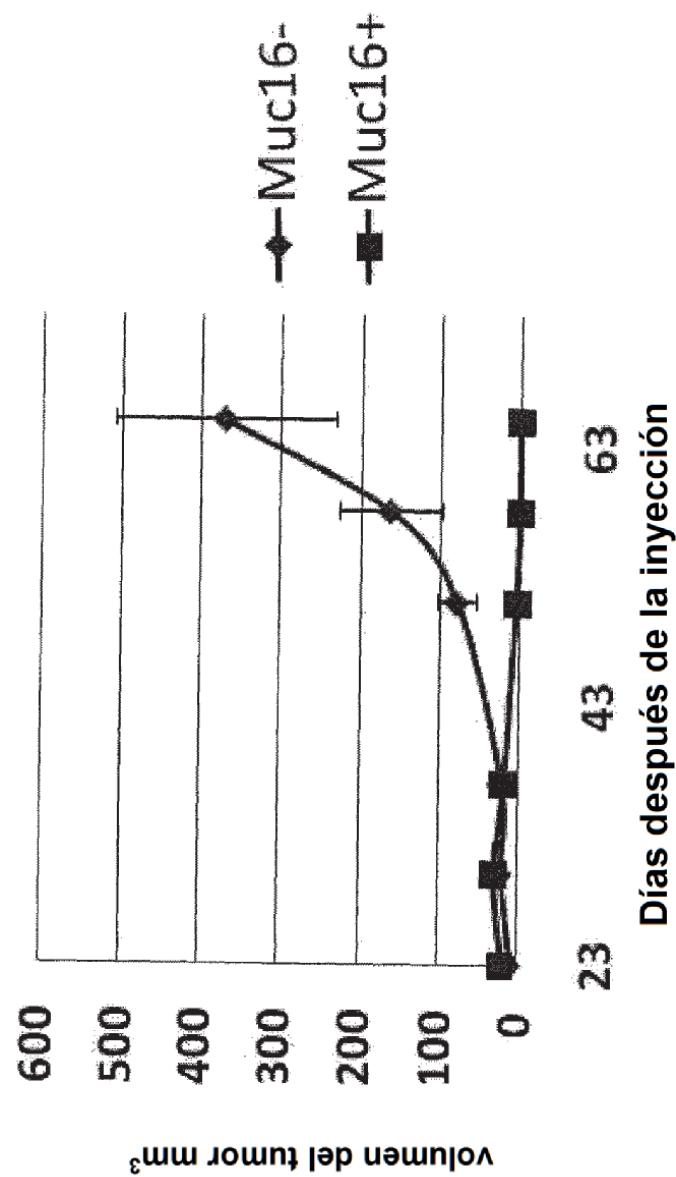


Figura 53

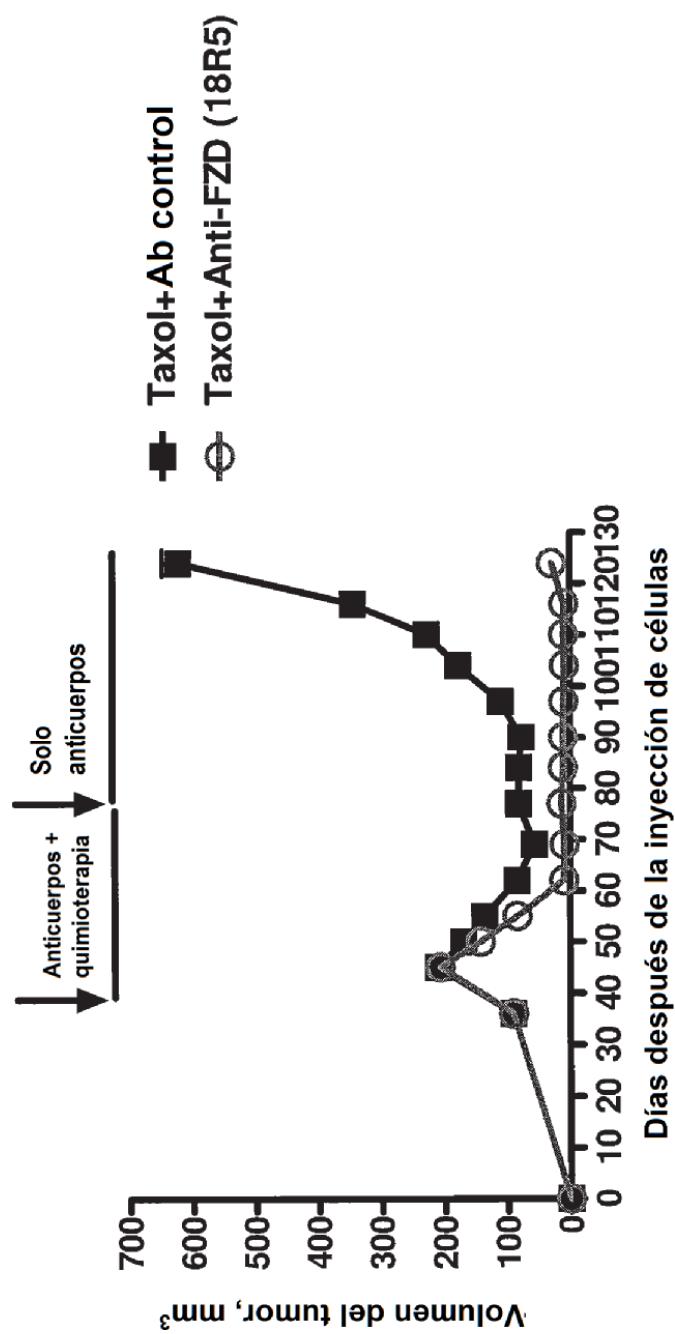


Figura 54

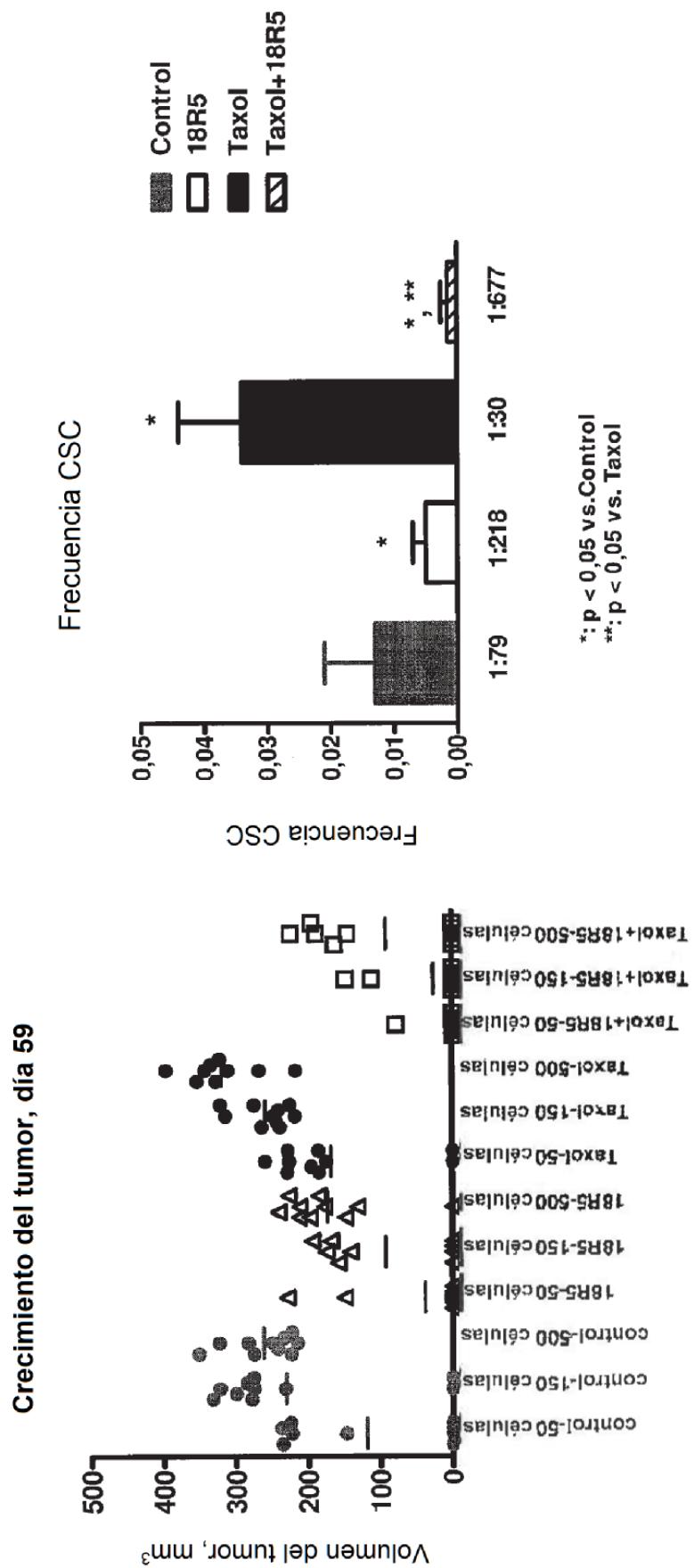


Figura 55

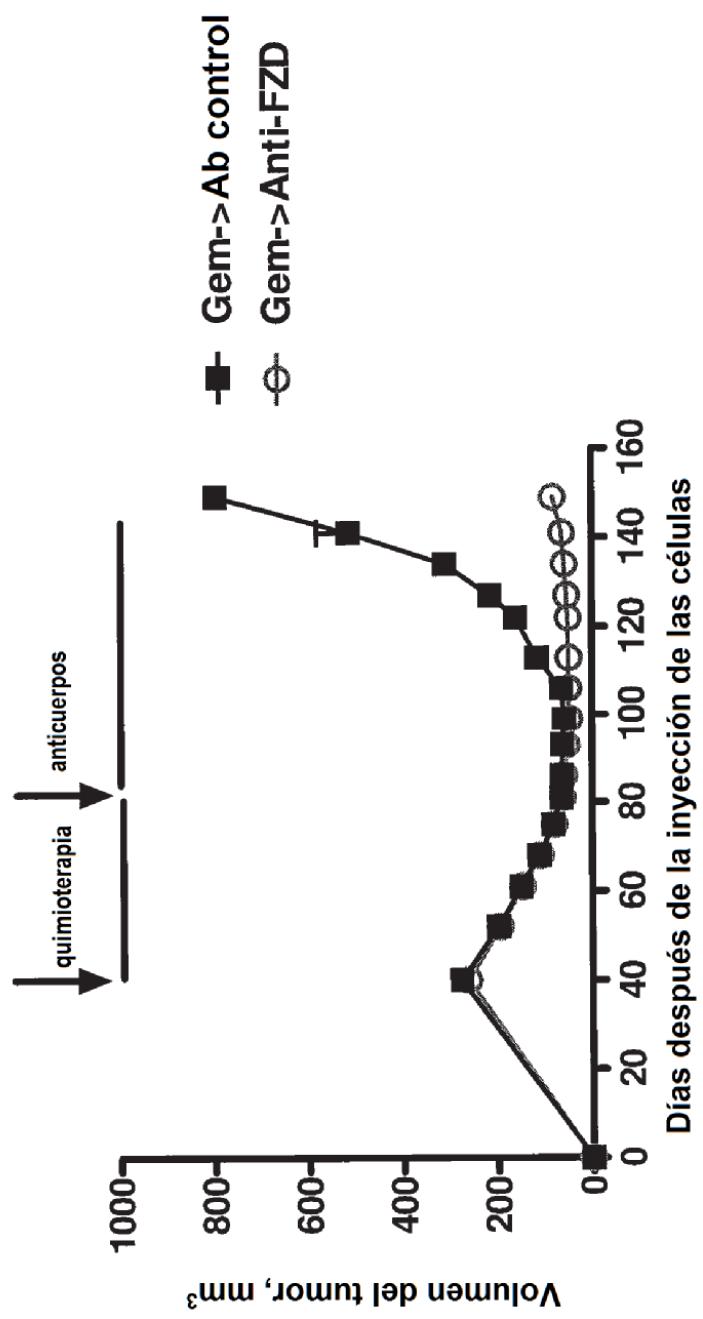


Figura 56

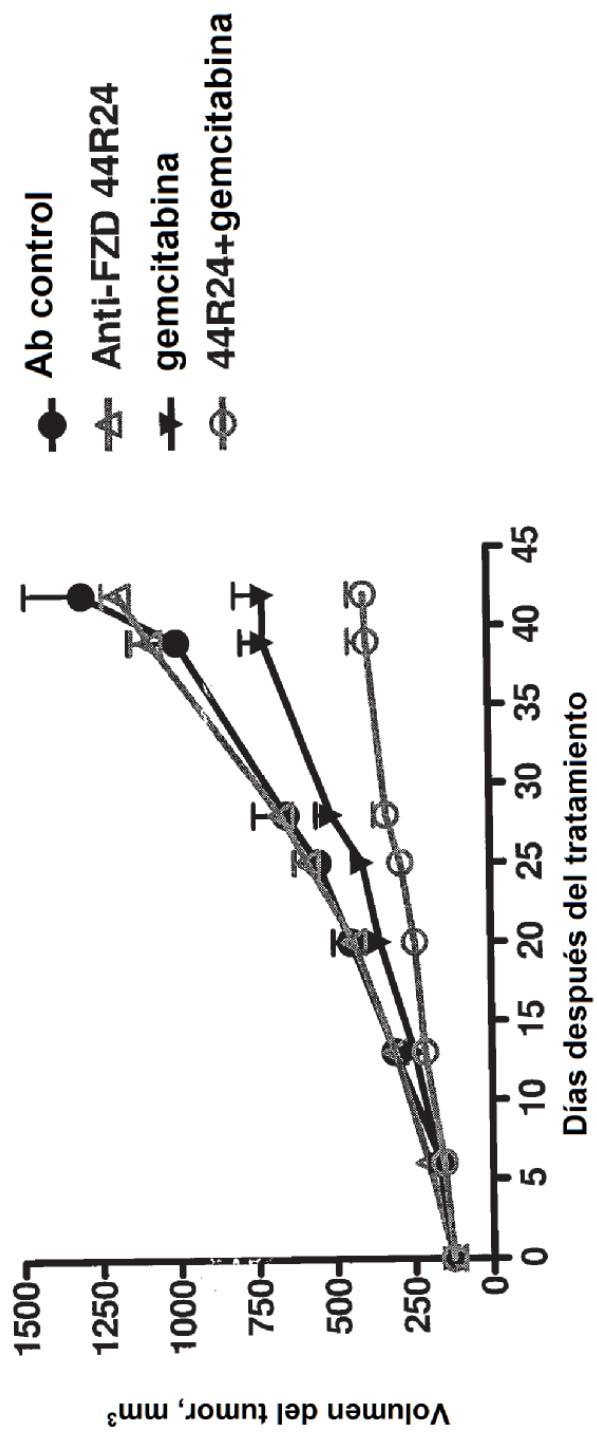


Figura 57

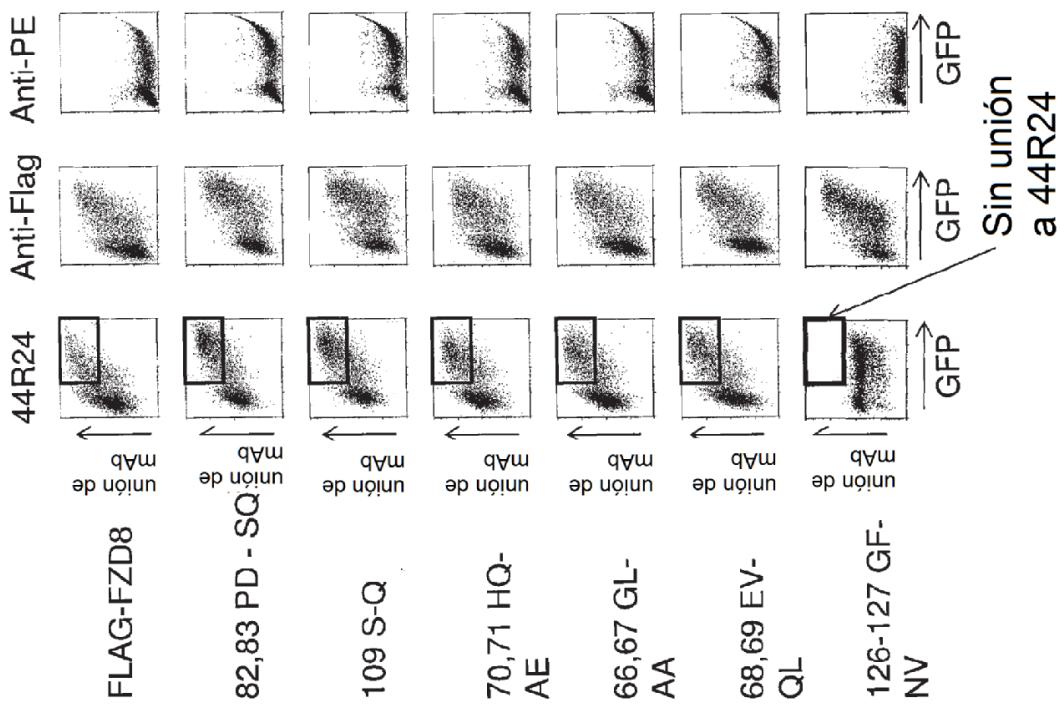


Figura 58

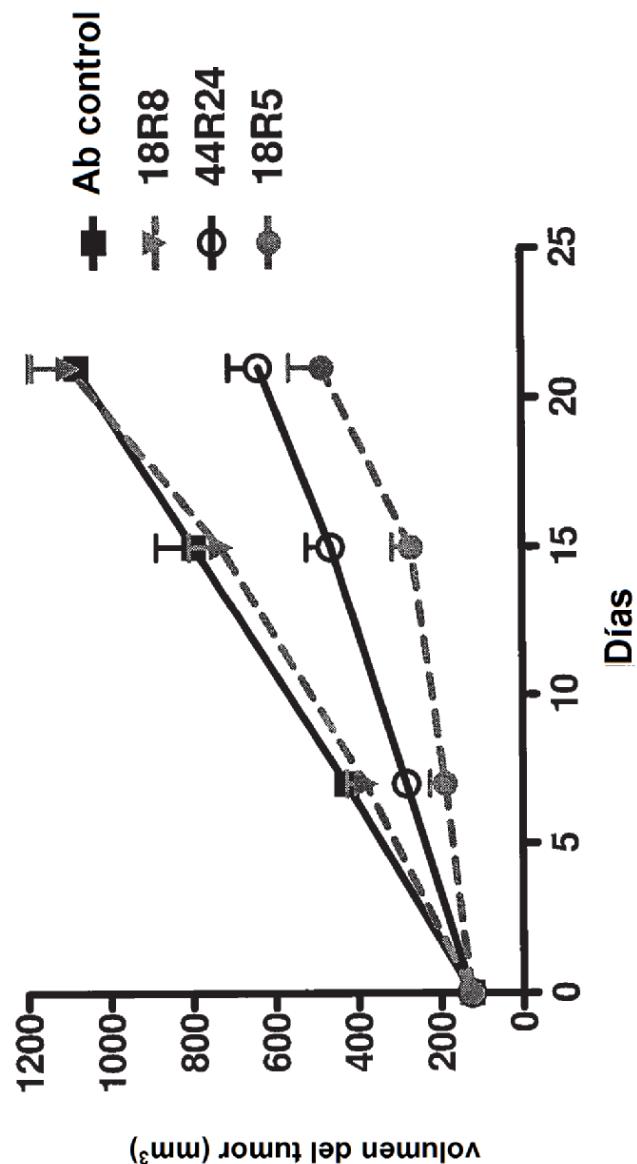


Figura 59

