

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 786**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2012 PCT/IB2012/055560**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13054307**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2012 E 12794776 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 2766033**

54 Título: **Anticuerpos y métodos para enfermedades relacionadas con la vía Wnt**

30 Prioridad:

**14.10.2011 US 201161547209 P**

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

**29.06.2020**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)**

**Lichtstrasse 35**

**4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CONG, FENG;**

**HAO, HUAIXIANG;**

**KLICKSTEIN, LLOYD B.;**

**KWONG, ROU-FUN;**

**TAYLOR, ANN y**

**XIE, YANG**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 769 786 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

Anticuerpos y métodos para enfermedades relacionadas con la vía Wnt

5 Campo de la invención

La invención se refiere por lo general a anticuerpos monoclonales que se unen a receptores y específicamente a anticuerpos que se unen a la proteína ZNRF3 o a la proteína RNF43.

10 Antecedentes de la invención

Las vías de señalización Wnt son una red de proteínas en las células eucariotas que son importantes para regular el crecimiento y la diferenciación de las células. Logan CY y Nusse R, "The Wnt signaling pathway in development and disease". *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20:781-810 (2004); Nusse R., "Wnt signaling in disease and in development". *Cell Res.* 15(1):28-32 (enero de 2005); Clevers H, "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease". *Cell* 127(3):469-80 (3 de noviembre de 2006). La señalización de Wnt es esencial para regular el crecimiento y la diferenciación de las células durante el desarrollo embrionario. En adultos, la señalización de Wnt fomenta la homeostasis tisular.

La desregulación de la señalización de Wnt se ha implicado en muchas enfermedades humanas. La sobreactivación anómala de la vía Wnt puede estar implicada en la provocación de tumorigénesis de carcinomas colorrectales. Por el contrario, unos niveles patológicamente bajos de la señalización de Wnt se han asociado con osteoporosis, osteoartritis, enfermedad renal poliquística y enfermedades neurodegenerativas. Se ha demostrado que una activación controlada de la vía Wnt fomenta procesos regenerativos tales como la reparación de tejidos y la curación de heridas. Zhao J, Kim KA y Abo A, "Tipping the balance: modulating the Wnt pathway for tissue repair". *Trends Biotechnol.* 27(3):131-6 (marzo de 2009).

Las proteínas Wnt son ligandos proteicos que se unen a receptores de la superficie celular (el «complejo de receptores de Wnt») para activar las vías Wnt en una célula. Se han identificado varios tipos de vías Wnt, tanto canónicas como no canónicas.

La señalización de Wnt mediante una vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina regula la renovación celular de la proteína  $\beta$ -catenina, la cual es un cofactor de inscripción. MacDonald BT, Tamai K y He X, "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases". *Dev. Cell* 17(1):9-26 (julio de 2009) y Solicitud de Patente de EE. UU. 2009/0220488, titulada «Evaluación y tratamiento de escleroderma». En ausencia de ligandos de Wnt, la  $\beta$ -catenina permanece fosforilada por acción de un «complejo de destrucción» multiproteico, el cual desencadena la poliubiquitinación de la  $\beta$ -catenina y la degradación de la  $\beta$ -catenina en los proteosomas de la célula. Cuando Wnt se une al complejo de receptores de Wnt, la  $\beta$ -catenina se estabiliza mediante la inhibición del «complejo de destrucción». A continuación, la  $\beta$ -catenina se traslada hacia el núcleo. En el núcleo, la  $\beta$ -catenina activa la transcripción de genes diana Wnt y de este modo activa los programas de expresión génica para el crecimiento y la diferenciación de las células.

En la vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina, las proteínas Frizzled (FZD) y la proteína relacionada con el receptor lipoproteico de baja densidad 5/6 (LRP5/6) forman el complejo de receptores. Tanto las proteínas Frizzled como LRP5/6 son importantes para la vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina.

En una vía no canónica independiente de  $\beta$ -catenina, la señalización de Wnt regula la señalización de la polaridad tisular o polaridad celular planar (PCP), que gobierna los movimientos de las células y los tejidos. Zallen JA, "Planar polarity and tissue morphogenesis". *Cell* 129(6):1051-63 (15 de junio de 2007); Simons M y Mlodzik M, "Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease". *Annu. Rev. Genet.* 42:517-40 (2008); Solicitud de Patente de EE. UU. 2009/0220488. Las proteínas Frizzled son receptores en la señalización no canónica de Wnt, pero LRP5/6 no es esencial.

A pesar de la gran cantidad de proteínas que están implicadas en las vías de señalización Wnt, se han identificado pocas dianas en la vía susceptibles de ser moduladas por fármacos, especialmente dianas previas a la vía de la  $\beta$ -catenina en la vía Wnt. Se necesitan agentes que potencien la señalización de Wnt, con el fin de desarrollar terapias para trastornos relacionados con la señalización de Wnt.

55 Compendio de la invención

La invención procede de la identificación por parte de los inventores de dos ubiquitina ligasas E3 de transmembrana homólogas como reguladores negativos activos de la cantidad de complejo de receptores de Wnt sobre la superficie de las células. Las ligasas son una proteína de dedos de zinc/RING 3 (ZNRF3) y una proteína de dedos de Ring 43 (RNF43). Los inventores también demuestran que ZNRF3 y RNF43 son dianas moleculares de las proteínas R-espondinas (RSPO), un grupo de proteínas secretadas que sensibilizan en gran medida a las células frente a la señalización de Wnt. Los inventores demuestran además que la R-espondina induce la interacción entre ZNRF3 y el receptor acoplado a proteína

G que contiene una repetición rica en leucina 4 (LGR4), lo cual conduce a la inhibición de ZNRF3 y la activación de la señalización de Wnt.

La invención proporciona la modulación de la actividad de ZNRF3 o RNF43 mediante la unión de un anticuerpo al dominio extracelular de las proteínas ZNRF3 o RNF43 sobre la superficie de una célula eucariota para incrementar la señalización de Wnt en la célula eucariota. En una primera realización, la invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente al dominio extracelular de una ubiquitina ligasa E3 de membrana, donde:

(a) la ubiquitina ligasa E3 de membrana se selecciona del grupo constituido por ZNRF3 y RNF43; y

(b) la unión del anticuerpo al dominio extracelular de la ubiquitina ligasa E3 de membrana, donde la ubiquitina ligasa E3 de membrana se encuentra sobre la superficie de una célula eucariota, incrementa la señalización canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina en la célula eucariota, para su uso como medicamento, donde el incremento de la señalización canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina se detecta en un ensayo *in vitro*.

En una segunda realización de la invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la primera realización se utiliza como medicamento para tratar una enfermedad seleccionada del grupo constituido por osteoporosis, fractura ósea, diabetes, enfermedad neurodegenerativa y afecciones que requieren regeneración tisular, reparación tisular o curación de heridas.

En una realización, la invención consiste en un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente al dominio extracelular de una ubiquitina ligasa E3 de membrana, donde:

la ubiquitina ligasa E3 de membrana se selecciona del grupo constituido por ZNRF3 y RNF43; y la unión del anticuerpo al dominio extracelular de la ubiquitina ligasa E3 de membrana, donde la ubiquitina ligasa E3 de membrana se encuentra sobre la superficie de una célula eucariota, incrementa la señalización de Wnt en la célula eucariota; y donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo constituido por

(a) uno o más polipéptidos que tienen seis regiones, que comprenden:

(i) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 31; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 32 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 33; y

(ii) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 34; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 35 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 36; y

(b) uno o más polipéptidos que tienen seis regiones, que comprenden:

(i) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 37; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 38 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 39; y

(ii) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 40; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 41 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 42; y

(c) uno o más polipéptidos que tienen seis regiones, que comprenden:

(i) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 43; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 44 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 45; y

(ii) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 46; una segunda región que tiene una secuencia

peptídica de SEQ ID NO: 47 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 48; y

(d) uno o más polipéptidos que tienen seis regiones, que comprenden:

(i) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 49; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 50 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 51; y

(ii) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 52; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 53 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 54; y

(e) uno o más polipéptidos que tienen seis regiones, que comprenden:

(i) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 55; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 56 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 57; y

(ii) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 58; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 59 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 60; y

(f) uno o más polipéptidos que tienen seis regiones, que comprenden:

(i) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 61; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 62 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 63; y

(ii) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 64; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 65 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 66.

La divulgación también se refiere al uso médico de anticuerpos que antagonizan ZNRF3 o RNF43 de la invención para tratar enfermedades y afecciones con una señalización baja de Wnt. Algunas de las enfermedades y afecciones asociadas con una señalización baja de Wnt incluyen osteoporosis, fractura ósea, diabetes, enfermedad neurodegenerativa y afecciones que requieren regeneración tisular, reparación tisular y curación de heridas.

En un aspecto, la divulgación se refiere además a un anticuerpo con múltiples especificidades de unión tal como un anticuerpo biespecífico. Una parte del anticuerpo se une al dominio extracelular de ZNRF3 o RNF43 y la otra parte del anticuerpo se une al dominio extracelular de LGR4, LGR5 (que también se conoce como GPR49) o LGR6. Por ejemplo, la divulgación se refiere:

(i) a anticuerpos donde una parte del anticuerpo se une al dominio extracelular de ZNRF3 y la otra parte del anticuerpo se une al dominio extracelular de un correceptor de R-espondina o

(ii) a anticuerpos donde una parte del anticuerpo se une al dominio extracelular de RNF43 y la otra parte del anticuerpo se une al dominio extracelular de un correceptor de R-espondina.

En un aspecto, la divulgación proporciona el uso del anticuerpo de la invención en una terapia combinada con un inhibidor de DPP-4 para tratar diabetes mellitus de tipo II. En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo de la invención se administra para incrementar los niveles de hormonas de tipo incretina. Debido a que los inhibidores de DPP-4 requieren la producción endógena de incretinas para ser eficaces, la divulgación se refiere a un anticuerpo de la invención que se puede administrar como terapia combinada con un inhibidor de DPP-4, tal como vildagliptina (Galvus®) u otro inhibidor de DPP-4. En un aspecto de la divulgación, la terapia combinada puede consistir en la administración del anticuerpo de la invención antes de la administración de un inhibidor de DPP-4 o con la administración de un inhibidor de DPP-4.

La invención proporciona el uso de anticuerpos anti-ZNRF3 o anti-RNF43 que se unen a las regiones externas de ZNRF3 o RNF43 para incrementar la señalización de Wnt. En un aspecto de la divulgación, los anticuerpos para las regiones externas de ZNRF3 o RNF43 se pueden utilizar para diagnosticar enfermedades en las que ZNRF3 o RNF43 se expresan con niveles muy elevados como resultado de una hiperactivación de la vía Wnt tales como ciertos tipos de tumores, por ejemplo, el adenocarcinoma de colon. En otro aspecto de la divulgación, los anticuerpos para las regiones externas de ZNRF3 o RNF43 también se pueden utilizar en un conjugado farmacológico del anticuerpo (ADC), la citotoxicidad mediada por las células y dependiente del anticuerpo (ADCC) u otros métodos similares para el suministro específico en las células cancerosas y su destrucción.

La divulgación también se refiere a un dominio extracelular soluble de una ubiquitina ligasa E3 de transmembrana (ZNRF3 o RNF43) en un portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de una enfermedad u otra afección que se beneficiaría de una reducción en la señalización de Wnt. El dominio extracelular soluble de una ZNRF3 o RNF43 se une específicamente a la R-espondina para bloquear la señalización de Wnt estimulada por la R-espondina.

15 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un conjunto de diagramas de barras que muestran que ZNRF3 y RNF43 son genes diana de Wnt. Se trataron células L de ratón con o sin medio acondicionado (CM) de Wnt3A durante 24 h. Se extrajo el ARN total para realizar la transcripción inversa y el análisis de qPCR con sondas Taqman® de ZNRF3, RNF43 y GUSB. Se utilizó el método de  $\Delta\Delta C_t$  para obtener los niveles de ARNm, estando normalizados los niveles que se muestran en los diagramas de barras respecto a los niveles de ARNm para GUSB (el gen humano para la  $\beta$ -glucuronidasa) y respecto a la ausencia de medio acondicionado de Wnt3A.

La FIG. 2 es un conjunto de diagramas de barras que muestran que ZNRF3 y RNF43 presentan un aumento de su expresión en el cáncer de colon. Los niveles de ARNm de ZNRF3 (FIG. 2A) y los niveles de ARNm de RNF43 (FIG. 2B) correspondieron a un adenocarcinoma de colon y al tejido normal circundante de cuatro pacientes. Los niveles de ARNm se midieron y analizaron como se describe en la FIG. 1.

La FIG. 3 es un conjunto de diagramas de barras que muestran la supresión mediada por ARNip del gen de la  $\beta$ -catenina (CTNNB1) en células de cáncer de colon SW480 y el efecto sobre los niveles relativos de ARNm de ZNRF3 y RNF43 en la línea celular. Todos los niveles de ARNm se midieron utilizando el método de  $\Delta\Delta C_t$  mediante RT-PCR cuantitativa basada en una sonda TaqMan® con GUSB (el gen humano para la  $\beta$ -glucuronidasa) como control interno. Las barras de error denotan la desviación estándar (n=4).

La FIG. 4 es un conjunto de diagramas de barras que muestran que ZNRF3 regula de forma negativa la señalización de Wnt. Células HEK293 con un marcador SuperTopFlash (STF) clonado que expresaban de forma estable ZNRF3 de origen natural (WT) marcado con hemaglutinina (HA) C-terminal y resistente a ARNip (siR) o proteína fluorescente verde (GFP) o ZNRF3 que carecía del dominio RING ( $\Delta$ RING) se transfectaron con ARNip de control (PGL2) o ARNip de ZNRF3. Dos días después de la transfección, se añadió medio acondicionado (CM) de Wnt3A al 30% en los casos indicados. Tres días después de la transfección, se evaluó la actividad de luciferasa utilizando el reactivo BrightGlo® de Promega.

La FIG. 5 es un conjunto de diagramas de barras que muestran que RNF43 es un homólogo funcional de ZNRF3. Los diagramas de barras representan los resultados de células HEK293 con un marcador SuperTopFlash (STF) clonado (es decir, células 293-STF) que expresan de forma estable RNF43 de origen natural (WT) o GFP o RNF43 que carecía del dominio RING ( $\Delta$ RING) que se transfectaron con ARNip de control (PGL2) o ARNip de ZNRF3. Tres días después de la transfección, se evaluó la actividad de luciferasa utilizando el reactivo BrightGlo® de Promega y se normalizó respecto al grupo de GFP + pGL2si.

La FIG. 6 es un conjunto de portaobjetos de gel de poliacrilamida que muestran inmunotransferencias de las proteínas indicadas para las siguientes líneas celulares y tratamiento: ensayo marcador de Wnt para células HEK293-STF que expresan de forma estable el vector vacío (EV), ZNRF3 resistente a ARNip o ZNRF3 que carece del dominio RING ( $\Delta$ RING), tras la transfección de ARNip de pGL2 de control o ARNip de ZNRF3. Las barras de error denotan la desviación estándar (n=4). Las proteínas indicadas están fosforiladas Dvl2 (banda superior); pLRP6, LRP6 fosforilada. Las bandas inferiores en la inmunotransferencia de LRP6 corresponden a la forma ER de la proteína, que no se ve afectada por ZNRF3. Dvl2 se define como el *segment polarity protein Dishevelled homolog*.

La FIG. 7 es un conjunto de portaobjetos de gel de poliacrilamida que muestran inmunotransferencias de Myc-FZD8 (Frizzled 8) de superficie celular y totales que se han destruido por acción de microesferas de neutravidina tras la biotilación de células HEK293 que expresan Myc-FZD8 de forma estable. Las células se transfectaron con ARNip de pGL2 de control o ARNip de ZNRF3. TCL, lisado celular total.

La FIG. 8 es un conjunto de diagramas de barras que identifican dos hFab de ZNRF3 que modulan la señalización de Wnt. En particular, los diagramas de barras muestran que los anticuerpos para ZNRF3 incrementan la actividad de STF.

Se trataron células HEK293-STF con 50 µg/ml de anticuerpo para ZNRF3 o anticuerpo de control en ausencia y presencia de medio acondicionado de Wnt3a al 5% durante toda la noche y se sometieron a un ensayo con marcador de luciferasa STF.

5 La FIG. 9 es un conjunto de portaobjetos de gel de poliacrilamida que muestran la coimmunoprecipitación de R-espondina (RSPO), LGR4 y ZNRF3. Se trataron células HEK293 que coexpresaban LGR4-HA y Myc-ZNRF3 ΔRING con medio acondicionado (CM) de RSPO1-GFP durante 1 hora y los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-Myc, y los inmunoprecipitados se resolvieron y sometieron a inmunotransferencia con los anticuerpos anti-HA, anti-Myc y anti-GFP. Esta figura muestra que RSPO1 incrementa la interacción entre ZNRF3 y LGR4.

10 La FIG. 10 es un conjunto de diagramas de barras que muestran que la sobreexpresión de ZNRF3 ECD-TM (un mutante de ZNRF3 con la mayoría del dominio intracelular truncado) inhibe específicamente RSPO1 pero no la actividad de STF inducida por Wnt3a. Células HEK293-STF que expresaban de forma estable el vector vacío (EV) o ZNRF3 ECD-TM se trataron con Wnt3a o RSPO1 ΔC durante toda la noche y se sometieron a un ensayo marcador de luciferasa STF.

15 La FIG. 11 es un diagrama de barras que muestra el efecto estimulador de IgG-Ab1 y IgG-Ab2 en un ensayo marcador de SuperTopFlash (STF).

20 Descripción detallada de la invención

Se describe lo siguiente: En primer lugar, ZNRF3 y RNF43 son proteínas de superficie celular y, por lo tanto, son susceptibles de ser moduladas por fármacos tras la unión de un anticuerpo a ZNRF3 o RNF43. En segundo lugar, ZNRF3 y RNF43 son reguladores negativos de la β-catenina y la vía de señalización Wnt. La inhibición de ZNRF3 mediante el uso de ARNip o mediante la expresión de una proteína ZNRF3 mutada negativa dominante provoca un incremento en la señalización de Wnt. En tercer lugar, RNF43 es un homólogo funcional de ZNRF3. En cuarto lugar, los anticuerpos para ZNRF3 que se unen al dominio extracelular de la proteína imitan el efecto de la inhibición de ZNRF3 mediante el uso de ARNip o mediante la expresión de una proteína ZNRF3 mutada negativa dominante, con lo que se provoca de este modo un incremento en la señalización de Wnt. En quinto lugar, se pueden producir varios tipos de anticuerpos para ZNRF3 o RNF43 que se unen al dominio extracelular de las proteínas utilizando métodos conocidos para la producción de anticuerpos que tienen una unión especificada. En sexto lugar, la inhibición de ZNRF3 fomenta la señalización de Wnt/β-catenina y altera la señalización de Wnt/PCP *in vivo*. En séptimo lugar, el uso de anticuerpos para ZNRF3 y RNF43 que se unen a los dominios extracelulares de las proteínas para incrementar la señalización de Wnt y para tratar de este modo deficiencias de la señalización de Wnt se puede conseguir utilizando métodos conocidos de administración de anticuerpos terapéuticos. En octavo lugar, debido a que los inventores han demostrado que la R-espondina inhibe ZNRF3 mediante el incremento de la asociación entre ZNRF3 y LGR4, se pueden utilizar anticuerpos biespecíficos que se unen a o bien ZNRF3 o RNF43, por un lado, y LGR4, LGR5 o LGR6, por el otro, para imitar a la R-espondina e incrementar la señalización de Wnt en células eucariotas. En noveno lugar, debido a que los inventores han demostrado ahora que la ubiquitina ligasa E3 de membrana ZNRF3 es la diana molecular de la R-espondina, los anticuerpos que se unen a ZNRF3 se pueden utilizar para inhibir la actividad de la R-espondina para células eucariotas.

40 ZNRF3 y RNF43 son proteínas de superficie celular. La proteína de dedos de zinc/RING 3 (ZNRF3, Swiss-Prot Q9ULT6, SEQ ID NO: 1) y la proteína de dedos de Ring 43 (RNF43, Swiss-Prot Q68DV7, SEQ ID NO: 2) son proteínas de dedos de RING estructuralmente relacionadas. Cada una de las proteínas contiene un único péptido, un dominio extracelular, un dominio de transmembrana y un dominio RING intracelular (un dominio de dedos de zinc atípico).

45

<u>TABLA 1</u>	
<u>Secuencias de aminoácidos para la proteína ZNRF3 humana y la proteína RNF43 humana</u>	
Proteína de dedos de zinc/RING 3 (ZNRF3, Swiss-Prot Q9ULT6, SEQ ID NO: 1)	
El dominio extracelular corresponde a los aminoácidos 56-219.	

ES 2 769 786 T3

	MRPRSGGRPG	ATGRRRRRLR	RRPRGLRCSR
	LPPPPPLPLL	LGLLLAAAGP	GAARAKETAF
	VEVVLFEESP	SGDYTTYTTG	LTGRFSRAGA
	TLSAEGEIVQ	MHPLGLCNNN	DEEDLYEYGW
	VGVVKLEQPE	LDPKPCLTVL	GKAKRAVQRG
	ATAVIFDVSE	NPEAIDQLNQ	GSEDPLKRPV
	VYVKGADAIK	LMNIVNKQKV	ARARIQHRPP
	RQPTEYFDMG	IFLAFFVVVS	LVCLILLVKI
	KLKQRRSQNS	MNRLAVQALE	KMETRKFNSK
	SKGRREGSCG	ALDTLSSSST	SDCAICLEKY
	IDGEELRVIP	CTHRFHRKCV	DPWLLQHHTC
	PHCRHNIIEQ	KGNPSAVCVE	TSNLSRGRQQ
	RVTLPVHYPG	RVHRTNAIPA	YPTRTSMDSH
	GNPVTLTMD	RHGEQSLYSP	QTPAYIRSYP
	PLHLDHSLAA	HRCGLEHRAY	SPAHPFRRPK
	LSGRSFSKAA	CFSQYETMYQ	HYYFQGLSYP
	EQEGQSPPSL	APRGPARAFP	PSGSGSLLFP
	TVVHVAPPSH	LESGTSSSFS	CYHGHRVCS
	GYLADCPGSD	SSSSSSSGQC	HCSSSDSVVD
	CTEVSNQGVY	GSCSTFRSSL	SSDYDPFIYR
	SRSPCRASEA	GGSGSSGRGP	ALCFEGSPPP
	EELPAVSHHG	AGRGEPPWGP	ASPSGDQVST
	CSLEMNYSSN	SSLEHRGPNS	STSEVGLEAS
	PGAAPDLRRT	WKGHELPSC	ACCCEPQPSP
	AGPSAGAAGS	STLFLGPHLY	EGSGPAGGEP
	QSGSSQGLYG	LHPDHLPRTD	GVKYEGLPCC
	FYEEKQVARG	GGGGSGCYTE	DYSVSVQYTL
	TEEPPPGCYP	GARDLSQRIP	IIPEDVDCDL
	GLPSDCQGTH	SLGSWGGTRG	PDTPRPHRGL
	GATREEERAL	CCQARALLRP	GCPPEEAGAV
	RANFPSALQD	TQESSTTATE	AAGPRSHSAD SSSPGA

<p>Proteína de dedos de Ring 43 (RNF43, Swiss-Prot Q68DV7, SEQ ID NO: 2)</p> <p>El dominio extracelular corresponde a los aminoácidos 24-197.</p>	<pre> MSGGHQLQLA  ALWPWLLMAT  LQAGFGRTGL VLAAAVESER  SAEQKAIIRV  IPLKMDPTGK LNLTLLEGVFA  GVAEITPAEG  KLMQSHPLYL CNASDDDDNLE  PGFISIVKLE  SPRRAPRPCL SLASKARMAG  ERGASAVLFD  ITEDRAAAEQ LQQPLGLTWP  VVLIWGNDAE  KLMEFVYKNQ KAHVRIELKE  PPAWPDYDVW  ILMTVVGTIF VIILASVLRI  RCRPRHSRPD  PLQORTAWAI SQLATRRYQA  SCRQARGERP  DSGSSCSSAP VCAICLEEFs  EGQELRVISC  LHEFHRNCVD PWLHQHRTCP  LCMFNITEGD  SFSQSLGPSR SYQEPGRRLH  LIRQHPGHAH  YHLPAAAYLLG PSRSAVARPP  RPGPFLPSQE  PGMGPRHHRF PRAAHPRAPG  EQQRLAGAQH  PYAQGWGLSH LQSTSQHAAA  CPVPLRRARP  PDSSSGSGESY CTERSGYLAD  GPASDSSSGP  CHGSSSDSVV NCTDISLQGV  HGSSSTFCSS  LSSDFDPLVY CSPKGDQPQV  DMQPSVTSRP  RSLDSVVPTG ETQVSSHVHY  HRHRHHHYKK  RFQWHGRKPG PETGVPQSRP  PIPRTQPQPE  PPSPDQQVTR SNSAAPSGRL  SNPQCPRALP  EPAPGPVDAS SICPSTSSLF  NLQKSSLSAR  HPQRKRRGGP SEPTPGSRPQ  DATVHPACQI  FPHYTPSVAY PWSPEAHPLI  CGPPGLDKRL  LPETPGPCYS NSQPVWLCLT  PRQPLEPHPP  GEGPSEWSSD TAEGRPCYPY  HCQVLSAQPG  SEEELEELCE  QAV </pre>
---	---

5 Se puede adquirir un anticuerpo anti-ZNRF3 del proveedor comercial Santa Cruz Biotechnology. ZNRF3 (P-15) (producto sc-86958) es un anticuerpo policlonal de cabra purificado por afinidad originado contra un péptido mapeado dentro de una región interna (en lugar de la región extracelular) de ZNRF3 de origen humano.

10 ZNRF3 no ha sido caracterizado exhaustivamente con anterioridad, pero ha sido demostrado por Sugiura *et al.* que RNF43 posee actividad de ubiquitina ligasa E3. Sugiura T, Yamaguchi A y Miyamoto K, "A cancer-associated RING finger protein, RNF43, is an ubiquitin ligase that interacts with a nuclear protein, HAP95". *Exp. Cell Res.* 314(7):1519-28 (15 de abril de 2008). RNF43 también se ha descrito en la Pat. de EE. UU. N.º 7 425 612, titulada «Genes y polipéptidos relacionados con los cánceres humanos de colon».

Los inventores realizaron tres pruebas para demostrar que ZNRF3 y RNF43 son proteínas de superficie celular.

15 En primer lugar, las observaciones de microscopio mostraron que ZNRF3 se localiza en la membrana de la superficie celular. Los inventores modificaron por ingeniería genética ciertas células HEK293 para que expresaran de forma estable una proteína de fusión fluorescente verde (GFP) C-terminal de ZNRF3 y otras células HEK293 para que expresaran de forma estable ZNRF3-GFP con el péptido señal eliminado.

20 Para nuestros ensayos de transfección, los inventores generaron ADNc de ZNRF3 humano de longitud completa (NM\_001206998) fusionando una variante corta (NM\_032173) y un fragmento N-terminal de 300 pares de bases sintetizado. Construimos un ADNc de ZNRF3 resistente a ARNip mediante PCR de dos pasos y se utilizó como molde para generar ZNRF3 ΔRING (aminoácidos ausentes 293-334) y ZNF3 de dominio extracelular (ECD)-transmembrana (TM) (aminoácidos 1-256). Los ADNc se clonaron en vectores de expresión de mamífero bajo el control del promotor de CMV. Los plásmidos se secuenciaron para confirmar su identidad y la ausencia de mutaciones no deseadas.

Los inventores introdujeron los diferentes constructos en células HEK293 o HEK293 con un marcador SuperTopFlash (STF) clonado (es decir, células HEK293-STF) mediante infección retroviral o lentiviral utilizando protocolos estándar.

30 Para el cultivo celular de nuestros ensayos, cultivamos células HEK293 o las líneas celulares derivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%.

En segundo lugar, el análisis de microscopía confocal para nuestras células HEK293 y las líneas celulares derivadas mostró que ZNRF3-GFP se localizaba en la membrana plasmática, mientras que ZNRF3-GFP con el péptido señal eliminado se localizaba de forma difusa en el citoplasma.

5

En tercer lugar, los inventores confirmaron nuestros resultados de microscopía en un ensayo de biotilación de proteínas de la superficie celular. Transfectamos células HEK293 con un marcador SuperTopFlash (STF) clonado o bien con ZNRF3-HA de longitud completa o con ZNRF3  $\Delta$ SP-HA con el péptido señal eliminado.

10

Para nuestros ensayos de inmunotransferencia e inmunoprecipitación, utilizamos los siguientes métodos: Los lisados celulares totales se prepararon sometiendo las células a lisis utilizando tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,1%, EDTA 1 mM) suplementado con inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasa, lo cual fue seguido por una centrifugación a 14 000 rpm durante 10 min a 4 °C. A continuación, una cantidad equivalente de proteína procedente de cada alisado (25~50  $\mu$ g) se resolvió mediante SDS-PAGE y se transfirió a membranas de nitrocelulosa para llevar a cabo el bloqueo y la incubación con los anticuerpos primarios indicados durante toda la noche a 4 °C. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con o bien HRP o tintes infrarrojos para la visualización de la señal mediante un método de película de ECL o un escáner LI-COR Odyssey, respectivamente. La cuantificación de las bandas de inmunotransferencia se llevó a cabo mediante un análisis densitométrico con el software AlphaEaseFC<sup>®</sup>. Para los experimentos de coimmunoprecipitación, las células se sometieron a lisis en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Nonidet P40 al 0,8%, inhibidores de fosfatasa y de proteasas. Los lisados celulares aclarados se incubaron con los anticuerpos indicados y microesferas de Proteína G-sefarosa (Amersham) durante toda la noche a 4 °C. Las microesferas se lavaron cuatro veces con tampón de lisis y las proteínas unidas se eluyeron en tampón de muestra de SDS para el análisis de inmunotransferencia.

15

20

25

Ambos conjuntos de células HEK293 transfectadas se biotinilaron y se purificaron por afinidad mediante estreptavidina-agarosa de acuerdo con las instrucciones del kit de aislamiento de proteínas de la superficie celular Pierce<sup>®</sup> que se puede adquirir de proveedores comerciales (Thermo Fisher Scientific Inc., N.º de producto 89881). Tanto el lisado celular (entrada) como el eluato extraído se sometieron a inmunotransferencia con un anticuerpo anti-HA que se puede adquirir de proveedores comerciales (Roche).

30

Nuestros resultados mostraron que se recuperó ZNRF3-HA, pero no la proteína mutada deficiente en el péptido señal ( $\Delta$ SP), en la extracción con estreptavidina tras la biotilación de las proteínas de la superficie celular. Estos resultados inmunológicos confirmaron la presencia de una región extracelular en la proteína ZNRF.

35

Por lo tanto, nuestros resultados muestran que ZNRF3 y RNF43 son ubiquitina ligasas E3 localizadas en la superficie celular. Debido a que ZNRF3 y RNF43 se encuentran en la superficie celular, sus actividades pueden ser reguladas directamente por la unión de ligandos y, por lo tanto, son susceptibles de ser moduladas por fármacos.

40

ZNRF3 y RNF43 son dianas de la señalización de la  $\beta$ -catenina y reguladores negativos de la  $\beta$ -catenina y la vía de señalización Wnt. Considerados conjuntamente, nuestros resultados de las figuras FIG. 1 a FIG. 5 muestran que ZNRF3 y RNF43 son dianas de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina y reguladores negativos de la  $\beta$ -catenina y la vía de señalización Wnt.

45

En primer lugar, la expresión de ZNRF3 y RNF43 está inducida por el medio acondicionado (CM) de Wnt3a en células con una vía de señalización Wnt normal, como se muestra en la FIG. 1.

50

Para nuestros análisis de PCR, se extrajo ARN total de células tratadas utilizando el kit RNeasy Plus Mini<sup>®</sup> (Qiagen) y se sometió a transcripción inversa con los reactivos de transcripción inversa de Taqman<sup>®</sup> (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles de transcritos se evaluaron utilizando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7900HT<sup>®</sup>. La PCR a tiempo real se llevó a cabo en reacciones de 12  $\mu$ l que consistían en 0,6  $\mu$ l de 20X mezcla Assay-on-Demand<sup>®</sup> (concentración premezclada de 18  $\mu$ M para cada cebador y 5  $\mu$ M para la sonda Taqman<sup>®</sup>), 6  $\mu$ l de 2X mezcla maestra para PCR universal Taqman<sup>®</sup> y 5,4  $\mu$ l de molde de ADNc diluido. Las condiciones de termociclación utilizadas fueron 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C.

55

Los inventores llevaron a cabo el análisis de expresión génica utilizando el método comparativo de  $\Delta\Delta$ CT con el gen constitutivo, GUSB, para la normalización. Los reactivos de Assay-on-Demand<sup>®</sup> utilizados se adquirieron de Applied Biosystems.

60

En células L de ratón, el tratamiento de Wnt3A incrementó la expresión de ZNRF3 y RNF43 en 12.9 veces y 2.2 veces, respectivamente, según se midió mediante PCR cuantitativa. Nuestros resultados muestran que ZNRF3 y RNF43 son dianas de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina.

En segundo lugar, la expresión de ZNRF3 y RNF43 se incrementa en cánceres colorrectales con una señalización de la  $\beta$ -catenina hiperactiva, según se muestra en la FIG. 2. Tanto la expresión de ZNRF3 (FIG. 2A) como la expresión de RNF43 (FIG. 2B) son elevadas en células de adenocarcinoma de colon, según se muestra mediante un análisis de PCR cuantitativa, con los métodos descritos anteriormente.

Existe constancia de que el carcinoma de colon tiene una señalización de Wnt hiperactivada debido a una mutación en el gen de APC (*adenomatous polyposis coli*) de modo que la proteína APC está truncada. La proteína APC es un componente del «complejo de destrucción» de la  $\beta$ -catenina. Por lo tanto, la expresión de ZNRF3 y RNF43 se ve inducida porque la  $\beta$ -catenina está estabilizada.

En tercer lugar, la expresión del ARNm de ZNRF3 en la línea celular de cáncer colorrectal SW480 se ve reducida tras la supresión de la  $\beta$ -catenina mediada por el ARNip, según se muestra en la FIG. 3.

En cuarto lugar, la atenuación del ARNip de ZNRF3 incrementa la señalización de Wnt en células no cancerosas. En quinto lugar, la expresión de un mutante negativo dominante de ZNRF3 incrementa del mismo modo la señalización de Wnt.

Utilizando células HEK293, los inventores han descubierto que la atenuación del ARNip de ZNRF3 incrementa significativamente la actividad del marcador de Wnt según se mide mediante la actividad del marcador SuperTopFlash (STF), como se muestra en la FIG. 4. Células HEK293-STF que expresaban de forma estable el vector vacío (EV), ZNRF3 de origen natural (WT) resistente a ARNip o ZNRF3  $\Delta$ RING se transfectaron con ARNip de pGL2 de control o ARNip de ZNRF3, y se midió la actividad de STF. Para nuestros ensayos, los ensayos de STF luciferasa se llevaron a cabo utilizando los kits de ensayo para luciferasa BrightGlo<sup>®</sup> o DualGlo<sup>®</sup> (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Según se ha descrito anteriormente, STF es un ensayo de marcadores de Wnt. Los constructos de ARNip utilizados en los ensayos de la FIG. 4 se enumeran en la TABLA 2.

TABLA 2	
Constructos de ARNip	
ZNRF3-1 (QiagenSI03089744), sentido (SEQ ID NO: 7)	cccaguauga gaccaugua
ZNRF3-1 (QiagenSI03089744), antisentido (SEQ ID NO: 8)	uacauggucu cauacuggga g
ZNRF3-2 (Qiagen1027020), sentido (SEQ ID NO: 9)	gcugcuacac ugaggacua
ZNRF3-2 (Qiagen1027020), antisentido (SEQ ID NO: 10)	uaguccucag uguagcagcc g

La sobreexpresión de ZNRF3 resistente a ARNip eliminó por completo la activación de STF inducida por el ARNip de ZNRF3, según se muestra en la FIG. 4. Estos resultados indican que el efecto del ARNip de ZNRF3 está bien dirigido.

Hemos descubierto además que la sobreexpresión de un mutante de ZNRF3 que carece del dominio RING (ZNRF3  $\Delta$ RING) incrementa en gran medida la actividad de STF, según se muestra en la FIG. 4. La sobreexpresión de ZNRF3 que carecía del dominio RING ( $\Delta$ R) incrementó la actividad del marcador STF de por sí. Cabe destacar que estos efectos también se observaron sin la adición del medio acondicionado de Wnt3A exógeno.

Para resumir nuestros resultados en la FIG. 4, la activación de STF inducida por el ARNip de ZNRF3 se ve inhibida por ZNRF3 resistente a ARNip y ZNRF3  $\Delta$ RING incrementa STF. Nuestros resultados también muestran la función negativa dominante de ZNRF3  $\Delta$ RING.

En sexto lugar, los resultados de la FIG. 5 muestran que RNF43 es un homólogo funcional de ZNRF3 y por lo tanto un regulador negativo de la  $\beta$ -catenina y la vía de señalización Wnt. Según se ha descrito anteriormente, la ligasa E3 RNF43 presenta una elevada homología de secuencia con la ligasa E3 ZNRF3. Los resultados en la FIG. 5 muestran que la expresión de RNF43 rescató el efecto del ARNip de ZNRF3 sobre la actividad del marcador STF. Los constructos de ARNip utilizados en los ensayos de la FIG. 5 se enumeran en la TABLA 3.

TABLA 3	
Constructos de ARNip	
RNF43 (Dharmacon J-007004-09-0005) (SEQ ID NO: 11)	gcagaacaga aagcuauua

FZD6 (Dharmacon J-005505-07) (SEQ ID NO: 12)	gaaggaagga uuaguccaa
LGR4-1 (Dharmacon J-003673-07) (SEQ ID NO: 13)	aggauucacu gaaacguua
LGR4-2 (Dharmacon J-003673-08) (SEQ ID NO: 14)	uuacugaagc gacguguua
CTNNB1, sentido (SEQ ID NO: 15)	uguggucacc ugugcagcu
CTNNB1, antisentido (SEQ ID NO: 16)	agcugcacag gugaccaca

5 La sobreexpresión de RNF43 de origen natural bloqueó la activación de STF inducida por el ARNip de ZNRF3, mientras que la sobreexpresión de RNF43  $\Delta$ RING incremento STF. RNF43 ( $\Delta$ R), que carece del dominio RING, también mostró una actividad negativa dominante contra ZNRF3.

10 En séptimo lugar, IWP-2 es un inhibidor conocido del puercoespín que bloquea la secreción de Wnt. Chen B. *et al.* "Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer". *Nat. Chem. Biol.* 5, 100-107 (2009). Hemos descubierto que IWP2 inhibe completamente la activación de STF y la acumulación de  $\beta$ -catenina inducida por ZNRF3  $\Delta$ RING o el ARNip de ZNRF3 en ausencia de Wnt exógena. Nuestros resultados indican que ZNRF3 suprime la señalización de la  $\beta$ -catenina iniciada por las proteínas Wnt endógenas. Por lo tanto, nuestros resultados diferencian a ZNRF3 de los otros reguladores negativos de la señalización de Wnt.

15 En octavo lugar, los ensayos bioquímicos mostraron el mecanismo molecular mediante el cual ZNRF3 regula la señalización de la  $\beta$ -catenina. Células HEK293 que expresaban de forma estable el vector vacío (EV), ZNRF3 mutante o de origen natural resistente a ARNip se transfectaron con ARNip de pGL2 de control o ARNip de ZNRF3.

20 Nuestros resultados del ensayo de inmunotransferencia se muestran en la FIG. 6. Las fuentes de los anticuerpos primarios son: anti-LRP6, anti-fosfo-LRP6 (Ser1490) y anti-Dvl2 (Cell Signaling Technology); anti-HA (Roche); y anti-tubulina (Sigma).

25 Los ensayos de inmunotransferencia mostraron que el tratamiento con el ARNip de ZNRF3 o la sobreexpresión de ZNRF3  $\Delta$ RING incrementaron el nivel de fosfo-LRP6 y LRP6 total. Remítase a la FIG. 7, línea 1, línea 2 y línea 5. El efecto del ARNip de ZNRF3 fue bloqueado por la expresión de ZNRF3 resistente a ARNip. Remítase a la FIG. 7, línea 2 y línea 4.

El nivel de expresión proteica de ZNRF3  $\Delta$ RING es mucho más elevado en comparación con ZNRF3 de origen natural en la FIG. 7, lo cual concuerda con el hecho de que ZNRF3 es una ubiquitina ligasa E3 y se somete a una autoubiquitinación y degradación posterior.

30 Cabe destacar que el tratamiento con el ARNip de ZNRF3 y la sobreexpresión de ZNRF3  $\Delta$ RING incrementaron la fosforilación de Dvl2, el *segment polarity protein Dishevelled homolog*. Remítase a la FIG. 7, línea 1, línea 2 y línea 5. La sobreexpresión de ZNRF3 de origen natural redujo la fosforilación de Dvl2. Remítase a la FIG. 7, línea 1 y línea 3. La fosforilación de Dishevelled es una lectura directa de la activación de Frizzled y no depende de la activación de LRP6. MacDonald BT, Tamai K y He X, "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases". *Dev. Cell* 17, 9-26 (2009). Por lo tanto, los resultados muestran que la actividad de Frizzled también se ve afectada por ZNRF3.

35 El incremento de la expresión de LRP6 en la membrana plasmática tras la inhibición de ZNRF3 se confirmó utilizando un análisis de citometría de flujo, utilizando un anticuerpo anti-LRP6 que se une a células HEK293 que expresan de forma estable o bien el vector vacío (EV) o ZNRF3  $\Delta$ RING.

40 Para la citometría de flujo, las células se recolectaron utilizando un tampón de disociación celular exento de tripsina (Invitrogen) y se suspendieron de nuevo en tampón FACS (PBS con BSA al 1% y azida sódica al 0,02%). Después de bloquearlas, las células se incubaron con anti-LRP6 (R&D system) durante 1 hora a 4 °C. Después de lavados exhaustivos en tampón FACS, las células se tiñeron con yoduro de propidio (PI) y se sometieron a un análisis de múltiples canales utilizando un citómetro de flujo BD LSR II.

45 En noveno lugar, los inventores llevaron a cabo un ensayo para probar que el nivel o actividad de Frizzled también se ve afectado por ZNRF3. Para crear un FZD8 marcado con Myc N-terminal, preparamos constructos genéticos en los que Frizzled 8 (FZD8) estaba marcado con un epítipo de triple Myc N-terminal justo después del péptido señal. ZNRF3 se marcó con un epítipo de triple Myc justo después de un péptido señal o un epítipo de hemaglutinina (HA) C-terminal.

50 Se construyeron células HEK293 que expresaban de forma estable FZD8 marcado con Myc N-terminal mediante transfección. La mayor parte de Myc-FZD8 en esta línea celular es citoplasmático y tan solo una pequeña fracción de Myc-FZD8 se localiza en la membrana plasmática.

55

Un ensayo de biotilación de las proteínas de la superficie celular reveló que el ARNip de ZNRF3 incrementaba en gran medida el nivel de Myc-FZD8 en la membrana plasmática sin que se viera afectado el nivel de Myc-FZD8 total. Remítase a la FIG. 7. Las fuentes de anticuerpos primarios fueron: marca de anti-Myc (Cell Signaling Technology) y anti-tubulina (Sigma).

Además, el ARNip de ZNRF3 y ZNRF3 ΔRING incrementaron el nivel de membrana de Myc-FZD8, según se muestra mediante citometría de flujo, mientras que ZNRF3 de origen natural lo redujo. Utilizando un anticuerpo pan-Frizzled, observamos que el nivel en la superficie celular de las proteínas Frizzled endógenas se redujo o incrementó al sobreexpresar ZNRF3 de origen natural o ZNRF3 ΔRING, respectivamente.

Considerados conjuntamente, estos resultados muestran que ZNRF3 regula el nivel de Frizzled y LRP6 en la membrana plasmática.

En resumen, ZNRF3 y RNF43 son dianas de la señalización de Wnt/β-catenina y reguladores negativos de la β-catenina y la vía de señalización Wnt.

Anticuerpos antagonizantes para ZNRF3. Debido a que ZNRF3 se localiza en la superficie celular y contiene un dominio extracelular conservado, los inventores llevaron a cabo una inmunoadsorción de anticuerpos basada en presentación de fagos utilizando el dominio extracelular de ZNRF3 purificado y técnicas estándar para identificar anticuerpos que se unen al dominio extracelular de ZNRF3 y modulan la función de ZNRF3.

Se utilizó la proteína Fc-ZNRF3 ECD (dominio extracelular, aminoácidos 56-219 de SEQ ID NO: 1) para la inmunoadsorción de fagos. Se cribaron clones de fragmentos de unión al antígeno (Fab) mediante ELISA utilizando Fc-ZNRF3 ECD y su unión a ZNRF3 se verificó mediante un análisis de FACS utilizando células HEK293 que expresaban de forma estable ZNRF3 ΔRING.

Dos de los anticuerpos resultantes (clones de Fab Ab1 y Ab2) exhibieron actividad estimuladora de Wnt, que se midió mediante el marcador STF, incluso en ausencia de la adición de Wnt3a exógeno. Además, la FIG. 8 muestra que los dos anticuerpos fomentaron la actividad de STF inducida por Wnt3a. Las secuencias de los anticuerpos se proporcionan en la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 (para Ab1) y en la SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 (para Ab2).

**TABLA 4**

Secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas para los clones de Fab Ab1 y Ab2

Ab1, Lch-lambda3 (SEQ ID NO: 3)	<p>DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSIPSK YAHWYQOKPG                  QAPVLVIYGK SHRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE                  DEADYYCAAW DLLGDGWVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF                  PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAFTVAW KADSSPVKAG                  VETTTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE                  GSTVEKTVAP TEA</p>
Ab1, Hch-VH1B (SEQ ID NO: 4)	<p>QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYHMHWVRQA                  PGQGLEWMGW INPYTGDTNY AOKFQGRVTM TRDTSISTAY                  MELSRLRSED TAVYYCAREK VYMDIWGQGT LVTVSSASTK                  GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG                  ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN                  VNHKPSNTKV DKKVEPKSEF DYKDDDDKGA PHHHHHH</p>

<p>Ab2, Lch-lambda3 (SEQ ID NO: 5)</p>	<p>DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG          QAPVLVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE          DEADYYCQTY DWMYSSRVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF          PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG          VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE          GSTVEKTVAP TEA</p>
<p>Ab1, Hch-VH1B (SEQ ID NO: 6)</p>	<p>EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYGIHWVRQA          PGKGLEWVGR IKSKT DGGIT EYAAPVKGRF TISRDDSKNT          LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGT LVTVS          SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV          SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ          TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSEFDYKDD DDKGAPHHHH          HH</p>

Además, los dos anticuerpos incrementaron de forma modesta el nivel de LRP6 y Myc-FZD8 de membrana. Estos resultados indican además que ZNRF3 inhibe la señalización de Wnt mediante la reducción del nivel en membrana de Frizzled y LRP6.

Nuestros resultados muestran que los dos anticuerpos imitan la inhibición de ZNRF3 como se ha mostrado anteriormente mediante la atenuación del ARNip mediante la expresión de una mutación negativa dominante de ZNRF3. Estos anticuerpos anti-ZNRF3 son anticuerpos antagonizantes, ya que su actividad es similar a la del ARNip de ZNRF3. Por consiguiente, estos anticuerpos anti-ZNRF3 son anticuerpos antagonizantes que incrementan la señalización de Wnt.

Además, los inventores han seleccionado variantes Fab de Ab2 mediante una maduración por afinidad de acuerdo con un protocolo proporcionado por Morphosys. Remítase a *HuCAL® Antibodies - Technical Manual* (2.<sup>a</sup> edición, 2010). En resumen, los inventores digirieron plásmidos que codificaban la cadena ligera de Ab2 con endonucleasas de restricción y, para eliminar las secuencias que codificaban L<sub>CDR3</sub>, añadieron un casete de L<sub>CDR3</sub> en forma de polinucleótidos con secuencias aleatorias de una longitud que podría codificar una región de L<sub>CDR3</sub>, a continuación ligaron de nuevo el plásmido y el casete de L<sub>CDR3</sub> para formar una colección de expresión que expresaría formas variantes de las cadenas ligeras de Ab2. Utilizando esta colección, se seleccionaron Fab variantes de Ab2 (cadena ligera variante y cadena pesada no variante) que se unieron a ZNRF3.

De un modo similar, los inventores digirieron plásmidos que codificaban la cadena pesada de Ab2 con endonucleasas de restricción y, para eliminar las secuencias que codificaban H<sub>CDR2</sub>, añadieron un casete de H<sub>CDR2</sub> en forma de polinucleótidos con secuencias aleatorias de una longitud que podría codificar una región de H<sub>CDR2</sub>, a continuación ligaron de nuevo el plásmido y el casete de H<sub>CDR2</sub> para formar una colección de expresión que expresaría formas variantes de las cadenas pesadas de Ab2. Para esta colección, el plásmido utilizado tenía un casete de H<sub>CDR1</sub> que difería de H<sub>CDR1</sub> de la cadena pesada sin variaciones de Ab2. Utilizando esta colección, se seleccionaron Fab variantes de Ab2 (cadena ligera variante y cadena pesada no variante) que se unieron a ZNRF3.

Para la maduración por afinidad de las cadenas ligeras, se modificó el dominio de L<sub>CDR3</sub>. Por consiguiente, la secuencia de L<sub>CDR3</sub> de la cadena ligera de Ab2 (SEQ ID NO: 39) difiere de L<sub>CDR3</sub> de la cadena ligera de las variantes de Ab2, e incluyen 1F2(3\_1B1) (SEQ ID NO: 93); 2A6(3\_4A10) (SEQ ID NO: 99); 2B7(3\_4G1) (SEQ ID NO: 105); 2B8(4\_3E10) (SEQ ID NO: 111); 2C9(4\_4E3) (SEQ ID NO: 117); 2F5(3\_4A4) (SEQ ID NO: 123); y 2G6(3\_4D9) (SEQ ID NO: 129).

Para la maduración por afinidad de las cadenas pesadas, se modificó el dominio de H<sub>CDR2</sub>. Por consiguiente, la secuencia de H<sub>CDR2</sub> de la cadena pesada de Ab2 (SEQ ID NO: 41) difiere de H<sub>CDR2</sub> de la cadena ligera de las variantes de Ab2, e incluyen 2C1(2\_3A5) (SEQ ID NO: 137); 2D1(2\_3A7) (SEQ ID NO: 143); y 2H2(2\_3H8) (SEQ ID NO: 149).

ES 2 769 786 T3

Además, la secuencia de HCR1 de la cadena pesada de Ab2 (SEQ ID NO: 40) difiere de HCDR3 de la cadena pesada de las variantes de Ab2 donde las cadenas pesadas se modificaron a partir de la cadena pesada de Ab2, e incluyen SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 142 y SEQ ID NO: 148.

5 Algunas de las cadenas pesadas de las variantes de Ab2 contienen un péptido que permite que las cadenas pesadas dimericen de una forma en cierto modo similar a la estructura proteica cuaternaria dimérica de las proteínas IgG. Remítase a *HuCAL® Antibodies - Technical Manual* (2.ª edición, 2010). Remítase también al panfleto "Choosing the Best HuCAL® Antibody Format", disponible en AbD Serotec, una división de Morphosys. Por consiguiente, las cadenas pesadas que contienen el péptido se denominan en la presente «dímero Hch».

10 Las variantes de Ab2 se unen específicamente a ZNRF3 en lisados no purificados del mismo modo o mejor que el Ab2 progenitor en un ensayo ELISA. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de las variantes de Ab2 se muestran en la TABLA 5.

<u>TABLA 5</u>	
<u>Secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas para las variantes de Fab de Ab2</u>	
Ab2, Lch-lambda3, variante 1F2(3_1B1) (SEQ ID NO: 67)	<p>                     DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG                      QAPVLVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE                      DEADYYCQTF DSQAVTNVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF                      PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG                      VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE                      GSTVEKTVAP TEA                 </p>
Ab2, Hch-VH1B, variante 1F2(3_1B1) (SEQ ID NO: 68)	<p>                     EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYGIHWVRQA                      PGKGLEWVGR IKSKTDGGIT EYAAPVKGRF TISRDDSKNT                      LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGTLVTVS                      SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV                      SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ                      TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSEFDYKD DDDKGAPHHHH                      HH                 </p>
Ab2, Lch-lambda3, variante 2A6(3_4A10) (SEQ ID NO: 69)	<p>                     DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG                      QAPVLVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE                      DEADYYCQTF DSQAVTNVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF                      PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG                      VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE                      GSTVEKTVAP TEA                 </p>
Ab2, dímero Hch, variante 2A6(3_4A10) (SEQ ID NO: 70)	<p>                     EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYGIHWVRQA                      PGKGLEWVGR IKSKTDGGIT EYAAPVKGRF TISRDDSKNT                      LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGTLVTVS                      SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV                      SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ                      TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSEFPKPST PPGSSGELEE                      LLKHLKELLK GPRKGELEEL LKHLKELLKG GSGGAPEQKL                      ISEEDLNDAP HHHHHH                 </p>

ES 2 769 786 T3

TABLA 5	
Secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas para las variantes de Fab de Ab2	
Ab2, Lch-lambda3, variante 2B7(3_4G1) (SEQ ID NO: 71)	<p> DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG  QAPVLVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE  DDADYYCATY DSSSWWNVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF  PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG  VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE  GSTVEKTVAP TEA </p>
Ab2, dímero Hch, variante 2B7(3_4G1) (SEQ ID NO: 72)	<p> EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYGIHWVRQA  PGKGLEWVGR IKSKTDGGIT EYAAPVKGRF TISRDDSNT  LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGTLVTVS  SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV  SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ  TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSEFPKPST PPGSSGELEE  LLKHLKELLK GPRKGELEEL LKHLKELLKG GSGGAPEQKL  ISEEDLNDAP HHHHHH </p>
Ab2, Lch-lambda3, variante 2B8(4_3E10) (SEQ ID NO: 73)	<p> DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG  QAPVLVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE  DEADYYCQTW DWWARHWVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF  PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG  VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE  GSTVEKTVAP TEA </p>
Ab2, dímero Hch, variante 2B8(4_3E10) (SEQ ID NO: 74)	<p> EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYGIHWVRQA  PGKGLEWVGR IKSKTDGGIT EYAAPVKGRF TISRDDSNT  LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGTLVTVS  SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV  SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ  TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSEFPKPST PPGSSGELEE  LLKHLKELLK GPRKGELEEL LKHLKELLKG GSGGAPEQKL  ISEEDLNDAP HHHHHH </p>
Ab2, Lch-lambda3, variante 2C9(4_4E3) (SEQ ID NO: 75)	<p> DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG  QAPVLVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE  DEADYYCASY TSPINVFSGG TKLTVLGQPK AAPSVTLFPP  SSEELQANKA TLVCLISDFY PGAVTVAWKA DSSPVKAGVE  TTTPSKQSNN KYAASSYLSL TPEQWKSHRS YSCQVTHEGS  TVEKTVAPTE A </p>

ES 2 769 786 T3

TABLA 5			
Secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas para las variantes de Fab de Ab2			
Ab2, dímero Hch, variante 2C9(4_4E3) (SEQ ID NO: 76)	EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS DYGIHWVRQA
	PGKGLEWVGR	IKSKTDGGIT	EYAAPVKGRF TISRDDSKNT
	LYLQMNSLKT	EDTAVYYCAR	AIYYLEAFDV WGQGTSLVTVS
	SASTKGPSVF	PLAPSSKSTS	GGTAALGCLV KDYFPEPVTV
	SWNSGALTSG	VHTFPAVLQS	SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
	TYICNVNHKP	SNTKVDKKVE	PKSEFPPKST PPGSSGELEE
	LLKHLKELLK	GPRKGELEEL	LKHLKELLKG GSGGAPEQKL
	ISEEDLNDAP	HHHHHH	
Ab2, Lch-lambda3, variante 2F5(3_4A4) (SEQ ID NO: 77)	DIELTQPPSV	SVSPGQTASI	TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG
	QAPVLVIYRN	KQRPSGIPER	FSGSNSGNTA TLTISGTQAE
	DDADYYCAVW	DDEPHHDVFG	GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF
	PPSSEELQAN	KATLVCLISD	FYPGAVTVAW KADSSPVKAG
	VETTTPSKQS	NNKYAASSYL	SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE
	GSTVEKTVAP	TEA	
Ab2, dímero Hch, variante 2F5(3_4A4) (SEQ ID NO: 78)	EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS DYGIHWVRQA
	PGKGLEWVGR	IKSKTDGGIT	EYAAPVKGRF TISRDDSKNT
	LYLQMNSLKT	EDTAVYYCAR	AIYYLEAFDV WGQGTSLVTVS
	SASTKGPSVF	PLAPSSKSTS	GGTAALGCLV KDYFPEPVTV
	SWNSGALTSG	VHTFPAVLQS	SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
	TYICNVNHKP	SNTKVDKKVE	PKSEFPPKST PPGSSGELEE
	LLKHLKELLK	GPRKGELEEL	LKHLKELLKG GSGGAPEQKL
	ISEEDLNDAP	HHHHHH	
Ab2, Lch-lambda3, variante 2G6(3_4D9) (SEQ ID NO: 79)	DIELTQPPSV	SVSPGQTASI	TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG
	QAPVLVIYRN	KQRPSGIPER	FSGSNSGNTA TLTISGTQAE
	DDADYYCQTY	DSLKFSRVFG	GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF
	PPSSEELQAN	KATLVCLISD	FYPGAVTVAW KADSSPVKAG
	VETTTPSKQS	NNKYAASSYL	SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE
	GSTVEKTVAP	TEA	
Ab2, dímero Hch, variante 2G6(3_4D9) (SEQ ID NO: 80)	EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS DYGIHWVRQA
	PGKGLEWVGR	IKSKTDGGIT	EYAAPVKGRF TISRDDSKNT
	LYLQMNSLKT	EDTAVYYCAR	AIYYLEAFDV WGQGTSLVTVS
	SASTKGPSVF	PLAPSSKSTS	GGTAALGCLV KDYFPEPVTV
	SWNSGALTSG	VHTFPAVLQS	SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
	TYICNVNHKP	SNTKVDKKVE	PKSEFPPKST PPGSSGELEE
	LLKHLKELLK	GPRKGELEEL	LKHLKELLKG GSGGAPEQKL
	ISEEDLNDAP	HHHHHH	

ES 2 769 786 T3

TABLA 5	
Secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas para las variantes de Fab de Ab2	
Ab2, Lch-lambda3, variante 2C1(2_3A5) (SEQ ID NO: 81)	<p> DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG  QAPVLVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE  DEADYYCQTY DWMYSSRVFG GGKLTVLGQ PKAAPSVTLF  PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG  VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE  GSTVEKTVAP TEA </p>
Ab2, dímero Hch, variante 2C1(2_3A5) (SEQ ID NO: 82)	<p> EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS NAWMSWVRQA  PGKGLEWVGH IKSSNMGGAA QYAASVKGRF TISRDDSKNT  LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGTLLVTVS  SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV  SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ  TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSEFPPKST PPGSSGELEE  LLKHLKELLK GPRKGELEEL LKHLKELLKG GSGGAPEQKL  ISEEDLNDAP HHHHHH </p>
Ab2, Lch-lambda3, variante 2D1(2_3A7) (SEQ ID NO: 83)	<p> DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG  QAPVLVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE  DEADYYCQTY DWMYSSRVFG GGKLTVLGQ PKAAPSVTLF  PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG  VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE  GSTVEKTVAP TEA </p>
Ab2, dímero Hch, variante 2D1(2_3A7) (SEQ ID NO: 84)	<p> EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS NAWMSWVRQA  PGKGLEWVGF TKNEVGGYTT EYAASVKGRF TISRDDSKNT  LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGTLLVTVS  SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV  SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ  TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSEFPPKST PPGSSGELEE  LLKHLKELLK GPRKGELEEL LKHLKELLKG GSGGAPEQKL  ISEEDLNDAP HHHHHH </p>
Ab2, Lch-lambda3, variante 2H2(2_3H8) (SEQ ID NO: 85)	<p> DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG  QAPVLVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE  DEADYYCQTY DWMYSSRVFG GGKLTVLGQ PKAAPSVTLF  PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG  VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE  GSTVEKTVAP TEA </p>

<u>TABLA 5</u>	
<u>Secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas para las variantes de Fab de Ab2</u>	
Ab2, dímero Hch, variante 2H2(2_3H8) (SEQ ID NO: 86)	<p>EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS NAWMSWVRQA                      PGKGLEWVGR IKAFKEGYIT QYAASVKGRF TISRDDSKNT                      LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGTLVTVS                      SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV                      SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ                      TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSEFPPKST PPGSSGELEE                      LLKHLKELLK GPRKGELEEL LKHLKELKKG GSGGAPEQKL                      ISEEDLNDAP HHHHHH</p>

5 Los inventores convirtieron los Fab anti-ZNRF3 (Ab1 y Ab2) en un formato LALA de IgG1 humana. La conversión se llevó a cabo utilizando un servicio comercial disponible de GeneWiz, que tiene una ubicación en 19 Blackstone Street, Cambridge, MA 02139.

Los resultados de la FIG. 11 muestran que las IgG resultantes (IgG-Ab1 e IgG-Ab2) conservan la actividad antagonista de ZNRF3 según muestra un ensayo del marcador SuperTopFlash (STF).

10 La TABLA 6 muestra las secuencias de las cadenas ligeras humanas y pesadas humanas de IgG-Ab1 (h\_Kappa\_ZNRF3\_Ab1\_Lch y h\_IgG1f\_LALA\_ZNRF3\_Ab1\_Hch) y de IgG-Ab2 (h\_Kappa\_ZNRF3\_Ab2\_Lch y h\_IgG1f\_LALA\_ZNRF3\_Ab2\_Hch).

<u>TABLA 6</u>	
<u>Secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-ZNRF3 en un formato LALA de IgG1 humana</u>	
<p>h_Kappa_ZNRF3_Ab1_Lch (SEQ ID NO: 87)</p> <p>El dominio variable corresponde a los aminoácidos 1-110.</p> <p>El dominio constante corresponde a los aminoácidos 111-214.</p>	<p><u>DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSIPSK YAHWYQQKPG</u>  <u>QAPVLVIYGK SHRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE</u>                      DEADYCAAW DLLGDGWVFG GGTCLTVLQ PKAAPSVTLF                      PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KGDSSPVKAG                      VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE                      GSTVEKTVAP TECS</p>
<p>h_IgG1f_LALA_ZNRF3_Ab1_Hch (SEQ ID NO: 88)</p> <p>El dominio variable corresponde a los aminoácidos 1-116.</p> <p>Los 3 dominios constantes corresponden a los aminoácidos 117-229, 230-339 y 340-446.</p>	<p><u>QVQLVQSGAE VVKPGASVKV SCKASGYTFT SYHMHWVRQA</u>  <u>PGQGLEWMGW INPYTGDTNY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY</u>  <u>MELSRLRSED TAVYYCAREK VYMDIWGQGT LVTVSSASTK</u>                      GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG                      ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN                      VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KHTCPCCPA PEAAGGPSVF  <u>LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG</u>  <u>VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC</u>                      KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN                      QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPLVLDSD                      GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL                      SLSPGK</p>
<p>h_Kappa_ZNRF3_Ab2_Lch (SEQ ID NO: 89)</p> <p>El dominio variable corresponde a los aminoácidos 1-110.</p> <p>El dominio constante corresponde a los aminoácidos 111-214.</p>	<p><u>DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG</u>  <u>QAPVLVIYRN QQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE</u>                      DEADYCYQTY DWMYSSRVFG GGTCLTVLQ PKAAPSVTLF                      PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KGDSSPVKAG                      VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE                      GSTVEKTVAP TECS</p>

h_lgG1f_LALA_ZNRF3_ Ab2_Hch (SEQ ID NO: 90)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYGIHWVRQA PGKGLEWVGR IKSKTGGIT EYAAPVKGRF TISRDDSKNT LYLQMNLSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGTLLVTVS
El dominio variable corresponde a los aminoácidos 1-121.	SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCAPEAAG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K
Los 3 dominios constantes corresponden a los aminoácidos 122-234, 235-344 y 345-451.	

Métodos de producción de los anticuerpos. Se pueden producir varios tipos de anticuerpos para ZNRF3 o RNF43 utilizando métodos conocidos de producción de anticuerpos con una unión especificada, según se describe más adelante.

5

Definiciones. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que interpretan habitualmente los expertos en la técnica inmunológica.

10

El término «anticuerpo», tal como se utiliza en la presente, incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, «porción de unión al antígeno») o cadenas individuales de este. Un anticuerpo de origen natural tiene normalmente al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente como VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente como VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR.

15

20

La expresión «porción de unión al antígeno» de un anticuerpo, tal como se utiliza en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno dado (por ejemplo, las regiones extracelulares de ZNRF o RNF43). Las funciones de unión al antígeno de un anticuerpo pueden ser ejecutadas por fragmentos de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados en la expresión «porción de unión al antígeno» de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente constituido por los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab)<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd constituido por los dominios VH y CH1; un fragmento Fv constituido por los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo de dominio único (dAb), que está constituido por un dominio VH o un dominio VL; y una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. (Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546 (1989).

25

30

Los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector peptídico artificial que les permite estar conformados como una cadena proteica única en la que las regiones VL y VH se aparean para formar anticuerpos monovalentes y fragmentos de estos, conocidos como Fv de cadena única (scFv). Remítase, por ejemplo, a Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988) y Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883 (1988). Tales anticuerpos de cadena única incluyen una o más «porciones de unión al antígeno» de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos se criban para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

35

40

Las porciones de unión al antígeno también se pueden incorporar en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv. Remítase, por ejemplo, a Hollinger y Hudson, *Nature Biotechnology* 23, 9, 1126-1136 (2005). Las porciones de unión al antígeno de los anticuerpos se pueden injertar en estructuras basadas en polipéptidos tales como la fibronectina de tipo III (Fn3). Remítase a la Pat. de EE. UU. N.º 6 703 199, que describe monocuerpos de polipéptidos de fibronectina.

45

Las porciones de unión al antígeno se pueden incorporar en anticuerpos de cadena única y fragmentos de estos que comprenden un par de segmentos Fv tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de la cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión al antígeno. Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995); Pat. de EE. UU. N.º 5 641 870.

50

La expresión «especificidad de unión», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la capacidad de un sitio de combinación del anticuerpo individual para reaccionar con solo un determinante antigénico. El sitio de combinación del

5 anticuerpo está localizado en la porción Fab de los anticuerpos o fragmento de estos y está construido a partir de la regiones hipervariables de las cadenas ligera y pesada. Por lo tanto, la invención proporciona una gama de estructuras de anticuerpos mediante las cuales un anticuerpo «se une específicamente» al dominio extracelular de ZNRF3 y una gama de estructuras de anticuerpos mediante las cuales un anticuerpo «se une específicamente» al dominio extracelular de RNF43.

10 La expresión «anticuerpo quimérico» se refiere a un anticuerpo o fragmento de este en el que (a) la región constante, o una porción de esta, se altera, reemplaza o intercambia de modo que el sitio de unión al antígeno (región variable) se une a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o una molécula totalmente diferente que confiere propiedades nuevas al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de esta, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad por el antígeno diferente o alterada. Por ejemplo, un anticuerpo de ratón se puede modificar reemplazando su región constante con la región constante de una inmunoglobulina humana. Debido al reemplazo con una región constante humana, el anticuerpo quimérico puede conservar su especificidad a la hora de reconocer el antígeno a la vez que presenta una menor antigenicidad en un ser humano, en comparación con el anticuerpo de ratón original.

20 Las expresiones «región determinante de la complementariedad» y «CDR», tal como se utilizan en la presente, se refieren a las secuencias de aminoácidos dentro de las regiones variables del anticuerpo que confieren especificidad y afinidad de unión por el antígeno. En general, existen tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) en cada región variable de la cadena ligera y tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) en cada región variable de la cadena pesada.

25 Los límites exactos de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada pueden determinarse fácilmente utilizando uno cualquiera de una serie de esquemas muy conocidos, que incluyen los descritos por Kabat *et al.* (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.<sup>a</sup> edición (Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991) (método de numeración de «Kabat») o por Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273,927-948 (1997) (método de numeración de «Chothia»).

30 A modo de ejemplo de cómo se puede llevar a cabo la determinación de los límites de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada, la TABLA 7 proporciona las CDR de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de Ab1 (SEQ ID NOS: 3 y 4) y Ab2 (SEQ ID NOS: 5 y 6). Los inventores realizaron la determinación inicial de la secuencia de Kabat para las CDR para las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de Ab1 y Ab2 (SEQ ID NOS: 31-42, «initial») utilizando un método de alineación similar al proporcionado por el grupo del Dr. Andrew CR Martin en la University College de Londres. El MRC Centre for Protein Engineering y THE INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM® proporcionan más información y métodos de alineación útiles para realizar una determinación inicial de las secuencias de Kabat para las CDR.

40 La TABLA 7 también muestra una determinación actualizada de las CDR para las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de Ab1 y Ab2 (SEQ ID NOS: 43-54, «Kabat»), realizada según el método de numeración de Kabat. La TABLA 7 muestra además una determinación actualizada de las CDR para las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de Ab1 y Ab2 (SEQ ID NOS: 55-66, «Chothia»), realizada según el método de numeración de Chothia.

TABLA 7					
Secuencias de aminoácidos para las CDR de Ab1 y Ab2					
SEQ ID N.º	Cadena del anticuerpo	Aminoácidos	CDR	Secuencia	Método de determinación
31	Ab1, LC	23-33	LCDR1	SGDSIPSKYAH	inicial
32	Ab1, LC	45-55	LCDR2	LVIYGKSHRPS	inicial
33	Ab1, LC	88-97	LCDR3	AAWDLLGDGW	inicial
34	Ab1, HC	27-35	HCDR1	YTFTSYHMH	inicial
35	Ab1, HC	50-67	HCDR2	WINPYTGDTNYAQKFQGR	inicial
36	Ab1, HC	100-106	HCDR3	KVYMDIW	inicial
37	Ab2 LC	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	inicial
38	Ab2 LC	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	inicial
39	Ab2 LC	88-97	LCDR3	QTYDWMYSSR	inicial
40	Ab2 HC	27-35	HCDR1	FTFSDYGIH	inicial
41	Ab2 HC	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	inicial
42	Ab2 HC	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	inicial
43	Ab1, LC	23-33	LCDR1	SGDSIPSKYAH	Kabat

TABLA 7					
Secuencias de aminoácidos para las CDR de Ab1 y Ab2					
SEQ ID N.º	Cadena del anticuerpo	Aminoácidos	CDR	Secuencia	Método de determinación
44	Ab1, LC	49-55	LCDR2	GKSHRPS	Kabat
45	Ab1, LC	88-98	LCDR3	AAWDLG DGWV	Kabat
46	Ab1, HC	31-35	HCDR1	SYHMH	Kabat
47	Ab1, HC	50-66	HCDR2	WINPYTGD TNYAQKFQG	Kabat
48	Ab1, HC	99-105	HCDR3	EKVYMDI	Kabat
49	Ab2 LC	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	Kabat
50	Ab2 LC	49-55	LCDR2	RNKQRPS	Kabat
51	Ab2 LC	88-98	LCDR3	QTYDWMYSSRV	Kabat
52	Ab2 HC	31-35	HCDR1	DYGIH	Kabat
53	Ab2 HC	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	Kabat
54	Ab2 HC	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	Kabat
55	Ab1, LC	25-31	LCDR1	DSIPSKY	Chothia
56	Ab1, LC	49-51	LCDR2	GKS	Chothia
57	Ab1, LC	90-97	LCDR3	WDL LGDW	Chothia
58	Ab1, HC	26-32	HCDR1	GYTFTSY	Chothia
59	Ab1, HC	52-57	HCDR2	NPYTG D	Chothia
60	Ab1, HC	99-105	HCDR3	EKVYMDI	Chothia
61	Ab2 LC	25-31	LCDR1	DSLGSYY	Chothia
62	Ab2 LC	49-51	LCDR2	RNK	Chothia
63	Ab2 LC	90-97	LCDR3	YDWMYSSR	Chothia
64	Ab2 HC	26-32	HCDR1	GFTFSDY	Chothia
65	Ab2 HC	52-59	HCDR2	KSKTDGGI	Chothia
66	Ab2 HC	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	Chothia

LC = Lch-lambda3  
HC = Hch-VH1B

Además, se calcularon las secuencias de CDR para las variantes Fab de Ab2 (remítase a la TABLA 5), utilizando el método descrito anteriormente para determinar la secuencia de Kabat según el método de determinación «inicial». La TABLA 8 muestra las secuencias de CDR y las ubicaciones de los aminoácidos en las cadenas ligeras o pesadas.

TABLA 8					
Secuencias de aminoácidos para las CDR de las variantes de Ab2					
SEQ ID NO.	Cadena del anticuerpo	Aminoácidos	CDR	Secuencia	Método de determinación
91	Ab2, LC, 1F2	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	inicial
92	Ab2, LC, 1F2	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	inicial
93	Ab2, LC, 1F2	88-97	LCDR3	QTFDSQAVTN	inicial
94	Ab2, HC, 1F2	26-35	HCDR1	FTFSDYGIH	inicial
95	Ab2, HC, 1F2	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	inicial
96	Ab2, HC, 1F2	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	inicial
97	Ab2, LC, 2A6	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	inicial
98	Ab2, LC, 2A6	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	inicial
99	Ab2, LC, 2A6	88-97	LCDR3	QTFDSQAVTN	inicial
100	Ab2, HC, 2A6	26-35	HCDR1	FTFSDYGIH	inicial
101	Ab2, HC, 2A6	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	inicial
102	Ab2, HC, 2A6	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	inicial
103	Ab2, LC, 2B7	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	inicial
104	Ab2, LC, 2B7	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	inicial
105	Ab2, LC, 2B7	88-97	LCDR3	ATYDSSSWWN	inicial

ES 2 769 786 T3

TABLA 8					
Secuencias de aminoácidos para las CDR de las variantes de Ab2					
SEQ ID NO.	Cadena del anticuerpo	Aminoácidos	CDR	Secuencia	Método de determinación
106	Ab2, HC, 2B7	26-35	HCDR1	FTFSDYGIH	inicial
107	Ab2, HC, 2B7	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	inicial
108	Ab2, HC, 2B7	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	inicial
109	Ab2, LC, 2B8	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	inicial
110	Ab2, LC, 2B8	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	inicial
111	Ab2, LC, 2B8	88-97	LCDR3	QTWDWWARHW	inicial
112	Ab2, HC, 2B8	27-35	HCDR1	FTFSDYGIH	inicial
113	Ab2, HC, 2B8	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	inicial
114	Ab2, HC, 2B8	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	inicial
115	Ab2, LC, 2C9	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	inicial
116	Ab2, LC, 2C9	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	inicial
117	Ab2, LC, 2C9	88-95	LCDR3	ASYTSPIN	inicial
118	Ab2, HC, 2C9	26-35	HCDR1	FTFSDYGIH	inicial
119	Ab2, HC, 2C9	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	inicial
120	Ab2, HC, 2C9	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	inicial
121	Ab2, LC, 2F5	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	inicial
122	Ab2, LC, 2F5	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	inicial
123	Ab2, LC, 2F5	88-97	LCDR3	AVWDDEPHHD	inicial
124	Ab2, HC, 2F5	26-35	HCDR1	FTFSDYGIH	inicial
125	Ab2, HC, 2F5	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	inicial
126	Ab2, HC, 2F5	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	inicial
127	Ab2, LC, 2G6	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	inicial
128	Ab2, LC, 2G6	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	inicial
129	Ab2, LC, 2G6	88-97	LCDR3	QTYDSLKFSR	inicial
130	Ab2, HC, 2G6	26-35	HCDR1	FTFSDYGIH	inicial
131	Ab2, HC, 2G6	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	inicial
132	Ab2, HC, 2G6	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	inicial
133	Ab2, LC, 2C1	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	inicial
134	Ab2, LC, 2C1	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	inicial
135	Ab2, LC, 2C1	88-97	LCDR3	QTYDWMYSSR	inicial
136	Ab2, HC, 2C1	27-35	HCDR1	FTFSNAWMS	inicial
137	Ab2, HC, 2C1	50-68	HCDR2	HIKSSNMGGAAQYAASVKG	inicial
138	Ab2, HC, 2C1	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	inicial
139	Ab2, LC, 2D1	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	inicial
140	Ab2, LC, 2D1	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	inicial
141	Ab2, LC, 2D1	88-97	LCDR3	QTYDWMYSSR	inicial
142	Ab2, HC, 2D1	27-35	HCDR1	FTFSNAWMS	inicial
143	Ab2, HC, 2D1	50-68	HCDR2	FTKNEVGGYTTEYAASVKG	inicial
144	Ab2, HC, 2D1	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	inicial
145	Ab2, LC, 2H2	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	inicial
146	Ab2, LC, 2H2	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	inicial
147	Ab2, LC, 2H2	88-97	LCDR3	QTYDWMYSSR	inicial
148	Ab2, HC, 2H2	27-35	HCDR1	FTFSNAWMS	inicial
149	Ab2, HC, 2H2	50-68	HCDR2	RIKAFKEGYITQYAASVKG	inicial
150	Ab2, HC, 2H2	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	inicial

LC = Lch-lambda3

HC = Hch-VH1B or Hch dimer

Además, se calcularon las regiones CDR para los anticuerpos anti-ZNRF3 en formato de IgG, utilizando el método descrito anteriormente para determinar la secuencia de Kabat según el método de determinación «inicial». La TABLA 9 muestra las secuencias y las ubicaciones de los aminoácidos en las cadenas ligeras o pesadas.

5

TABLA 9					
Secuencias de aminoácidos para las CDR de los anticuerpos anti-ZNRF3 en formato de IgG					
SEQ ID NO.	Cadena del anticuerpo	Aminoácidos	CDR	Secuencia	Método de determinación
151	h_Kappa_ZNRF3_Ab1_Lch	23-33	LCDR1	SGDSIPSKYAH	inicial
152	h_Kappa_ZNRF3_Ab1_Lch	45-55	LCDR2	LVIYGKSHRPS	inicial
153	h_Kappa_ZNRF3_Ab1_Lch	87-96	LCDR3	AAWDLGDDG	inicial
154	h_IgG1f_LALA_ZNRF3_Ab1_Hc	27-35	HCDR1	TFTSYHMH	inicial
155	h_IgG1f_LALA_ZNRF3_Ab1_Hc	50-66	HCDR2	WINPYTGDTNYAQKFQG	inicial
156	h_IgG1f_LALA_ZNRF3_Ab1_Hc	99-105	HCDR3	EKVYMDI	inicial
157	h_Kappa_ZNRF3_Ab2_Lch	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	inicial
158	h_Kappa_ZNRF3_Ab2_Lch	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	inicial
159	h_Kappa_ZNRF3_Ab2_Lch	87-96	LCDR3	QTYDWMYSSR	inicial
160	h_IgG1f_LALA_ZNRF3_Ab2_Hc	27-35	HCDR1	FTFSDYGIH	inicial
161	h_IgG1f_LALA_ZNRF3_Ab2_Hc	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVK G	inicial
162	h_IgG1f_LALA_ZNRF3_Ab2_Hc	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	inicial

LC = human Kappa  
HC = human IgG1f LALA

10

La expresión «variante modificada de forma conservadora» se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, las variantes modificadas de forma conservadora se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, hasta secuencias esencialmente idénticas. Para las secuencias de polipéptidos, las «variantes modificadas de forma conservadora» incluyen sustituciones, deleciones o adiciones individuales en una secuencia polipeptídica que dan como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Dichas variantes modificadas de forma conservadora son adicionales y no excluyen variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la divulgación. Los ocho grupos siguientes contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) Remítase, por ejemplo, a Creighton, *Proteins* (1984). En algunos aspectos, la expresión «modificaciones conservadoras de la secuencia» se utiliza para referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan ni alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos.

15

20

25

30

Las expresiones «bloquear de forma cruzada», «bloqueo de forma cruzada», «bloqueo cruzado» se utilizan indistintamente en la presente para indicar la capacidad de un anticuerpo u otro agente de unión para interferir con la unión de otros ligandos (tales como la R-espondina) en un ensayo de unión competitiva estándar. La capacidad o el grado en que un anticuerpo u otro agente de unión puede interferir con la unión de otro ligando y, por lo tanto, si se puede decir que bloquea de forma cruzada de acuerdo con la divulgación, se puede determinar utilizando ensayos de unión competitiva estándar. Un ensayo adecuado implica el uso de la tecnología Biacore (por ejemplo, utilizando el instrumento Biacore 3000® (Biacore, Uppsala, Suecia)), que puede medir el alcance de las interacciones utilizando la tecnología de resonancia de plasmones superficiales. Otro ensayo para medir el bloqueo cruzado utiliza una estrategia basada en ELISA.

35

El término «epítipo» significa un determinante proteico con capacidad de unión específica a un anticuerpo. Los epítipos habitualmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o

5 cadenas laterales glucídicas y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítomos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión de los primeros, pero no de los últimos, se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. Para los anticuerpos de la divulgación, el epítomo se puede encontrar en el dominio extracelular de ZNRF3 o RNF43. En un aspecto, el epítomo se encuentra en el dominio extracelular de ZNRF3 o RNF43 de un vertebrado, por ejemplo, ZNRF3 o RNF43 de pez cebra, *Xenopus*, murino o ser humano. En un aspecto más específico, el epítomo se encuentra en el dominio extracelular de ZNRF3 o RNF43 de ser humano o de cinomólogo, o ZNRF3 o RNF43 tanto de ser humano como de cinomólogo.

10 La expresión «modificado genéticamente» se refiere a la alteración de la estructura del material genético en un organismo vivo mediante intervención humana, a través de la producción y el uso de técnicas de ADN recombinante y la expresión de polipéptidos a partir del ADN recombinante. Las técnicas para el uso de ADN recombinante y la expresión de los polipéptidos son conocidas por los expertos en la técnica. Las técnicas para la producción de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado genéticamente de la invención se describen en la referencias proporcionadas en la presente. Remítase, por ejemplo, a Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988) y Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883 (1988). Remítase también, por ejemplo, a Riechmann L *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988); Jones P *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Queen C *et al.*, *Proc. Natl. Acad., U.S.A.* 86:10029-10033 (1989); Pat. de EE. UU. N.º 5 225 539 concedida a Winter y Pat. de EE. UU. N.ºs 5 530 101, 5 585 089, 5 693 762 y 6 180 370 concedidas a Queen *et al.*

20 La expresión «anticuerpo humano» incluye anticuerpos con regiones variables en las que tanto las regiones de entramado como las CDR proceden de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de tales secuencias humanas, por ejemplo, secuencias de la línea germinal humana o versiones mutadas de secuencias de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos aminoacídicos no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o dirigida *in vitro*, o mediante mutación somática *in vivo*).

25 La expresión «anticuerpo monoclonal humano» se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión, los cuales presentan regiones variables en las que tanto las regiones de entramado como de CDR derivan de secuencias humanas. En un aspecto, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

30 Un anticuerpo «humanizado» es un anticuerpo que conserva la reactividad de un anticuerpo no humano a la vez que es menos inmunogénico en seres humanos. Esto puede conseguirse, por ejemplo, conservando las regiones CDR no humanas y reemplazando las partes restantes del anticuerpo con sus equivalentes humanos (es decir, la región constante, así como las porciones de entramado de la región variable). Remítase, por ejemplo, a Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536, (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); y Padlan, *Molec. Immun.*, 31:169-217 (1994). Otro ejemplo de tecnología de modificación genética humana es la tecnología Xoma que se describe en el documento US 5 766 886.

40 La expresión «anticuerpo aislado» se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos con especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a ZNRF3 o RNF43 está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de ZNRF3 o RNF43). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína de interés puede, sin embargo, tener reactividad cruzada respecto a otros antígenos. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o productos químicos.

45 El término «isotipo» se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgE e IgG tal como IgG1 o IgG4) que es proporcionada por los genes de la región constante de la cadena pesada. El isotipo también incluye versiones modificadas de una de estas clases, donde las modificaciones se han hecho para alterar la función de Fc, por ejemplo, para potenciar o reducir las funciones efectoras o la unión a receptores de Fc. Para consultar ejemplos de anticuerpos anti-ZNRF3 en el formato de IgG, remítase a la TABLA 6.

50 Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en la presente, se refieren a un preparado de anticuerpos de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal tiene una especificidad y afinidad de unión únicas por un epítomo particular.

55 Se pretende que el término «vector» se refiera a un polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido al cual se ha conectado.

60 Anticuerpos con modificaciones conservadoras. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención tiene una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 o una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 o ambas, donde una o más de estas secuencias de CDR tienen secuencias de aminoácidos especificadas basadas en los anticuerpos descritos en la presente. Remítase a las

SEQ ID NOS: 3-6 y las secuencias de CDR descritas en ellas, las SEQ ID NOS: 67-86 y las secuencias de CDR descritas en ellas, y las SEQ ID NOS: 87-90 y las secuencias de CDR descritas en ellas. Remítase también a las SEQ ID NOS: 31-66 en la TABLA 7, las SEQ ID NOS: 91-150 en la TABLA 8 y las SEQ ID NOS: 151-162 en la TABLA 9.

5 Por consiguiente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la divulgación puede ser un polipéptido que tenga tres regiones CDR dispuestas desde el extremo amino del polipéptido hacia el extremo carboxilo, como sobreentienden los expertos en la técnica inmunológica.

10 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno tiene al menos un 95% de identidad secuencial respecto a una secuencia seleccionada del grupo constituido por

(a) SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4;

(b) SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

15 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención comprende:

(a) la secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 3 y la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4;

(b) la secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6.

20 En la presente se describe un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, donde (a) la primera región tiene una secuencia peptídica seleccionada a partir de una primera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 91; SEQ ID NO: 97; SEQ ID NO: 103; SEQ ID NO: 109; SEQ ID NO: 115; SEQ ID NO: 121; SEQ ID NO: 127; SEQ ID NO: 133; SEQ ID NO: 139; SEQ ID NO: 145; SEQ ID NO: 151 o SEQ ID NO: 157; (b) la segunda región tiene una secuencia peptídica seleccionada entre SEQ ID NO: 92; SEQ ID NO: 98; SEQ ID NO: 104; SEQ ID NO: 110; SEQ ID NO: 116; SEQ ID NO: 122; SEQ ID NO: 128; SEQ ID NO: 134; SEQ ID NO: 140; SEQ ID NO: 146; SEQ ID NO: 152; o SEQ ID NO: 158; y (c) la tercera región tiene una secuencia peptídica seleccionada entre SEQ ID NO: 93; SEQ ID NO: 99; SEQ ID NO: 105; SEQ ID NO: 111; SEQ ID NO: 117; SEQ ID NO: 123; SEQ ID NO: 129; SEQ ID NO: 135; SEQ ID NO: 141; SEQ ID NO: 147; SEQ ID NO: 153; o SEQ ID NO: 159. En un aspecto específico de la divulgación, este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno tiene uno o más polipéptidos, teniendo al menos uno de los polipéptidos las secuencias peptídicas de las regiones CDR de las tres regiones CDR seleccionadas como se ha descrito en la frase precedente. En un aspecto más específico de la divulgación, este polipéptido es una cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

30 En otro aspecto, este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la divulgación tiene (a) la primera región tiene una secuencia peptídica seleccionada entre SEQ ID NO: 94; SEQ ID NO: 100; SEQ ID NO: 106; SEQ ID NO: 112; SEQ ID NO: 118; SEQ ID NO: 124; SEQ ID NO: 130; SEQ ID NO: 136; SEQ ID NO: 142; SEQ ID NO: 148; SEQ ID NO: 154; o SEQ ID NO: 160; (b) la segunda región tiene una secuencia peptídica seleccionada entre SEQ ID NO: 95; SEQ ID NO: 101; SEQ ID NO: 107; SEQ ID NO: 113; SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 131; SEQ ID NO: 137; SEQ ID NO: 143; SEQ ID NO: 149; SEQ ID NO: 155; o SEQ ID NO: 161; y (c) la tercera región tiene una secuencia peptídica seleccionada entre SEQ ID NO: 96; SEQ ID NO: 102; SEQ ID NO: 108; SEQ ID NO: 114; SEQ ID NO: 120; SEQ ID NO: 126; SEQ ID NO: 132; SEQ ID NO: 138; SEQ ID NO: 144; SEQ ID NO: 150; SEQ ID NO: 156; o SEQ ID NO: 162. En un aspecto específico de la divulgación, este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno tiene uno o más polipéptidos, teniendo al menos uno de los polipéptidos las secuencias peptídicas de las regiones CDR de las tres regiones CDR seleccionadas como se ha descrito en la frase precedente. En un aspecto más específico de la divulgación, este polipéptido es una cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

45 En otra realización más, este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención tiene (a) la primera región tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 37; (b) la segunda región tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 38; y (c) la tercera región tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 39. En un aspecto específico de la divulgación, este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno tiene uno o más polipéptidos, teniendo al menos uno de los polipéptidos las secuencias peptídicas de las regiones CDR de las tres regiones CDR seleccionadas como se ha descrito en la frase precedente. En un aspecto más específico de la divulgación, este polipéptido es una cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

50 En otra realización más, este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención tiene (a) la primera región tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 40; (b) la segunda región tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 41; y (c) la tercera región tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 42. En un aspecto específico de la divulgación, este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno tiene uno o más polipéptidos, teniendo al menos uno de los polipéptidos las secuencias peptídicas de las regiones CDR de las tres regiones CDR

seleccionadas como se ha descrito en la frase precedente. En un aspecto más específico de la divulgación, este polipéptido es una cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

5 Para los aminoácidos en el anticuerpo de la invención que se encuentran fuera de las regiones CDR, se pueden realizar sustituciones conservadoras de los aminoácidos sin alterar las propiedades funcionales de los anticuerpos de la invención.

10 Por consiguiente, en varias realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención puede ser un polipéptido que tenga un grado elevado de identidad de la secuencia peptídica con un polipéptido de la cadena ligera o cadena pesada seleccionado entre Ab1, Ab2, variantes de Ab2, IgG-Ab1 o IgG-Ab2, que se describen en la presente.

15 En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención tiene al menos un 95% de identidad secuencial respecto a una secuencia seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. En un aspecto específico de la divulgación, este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno tiene uno o más polipéptidos, teniendo al menos uno de los polipéptidos al menos un 95% de identidad secuencial respecto a una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 67; SEQ ID NO: 69; SEQ ID NO: 71; SEQ ID NO: 73; SEQ ID NO: 75; SEQ ID NO: 77; SEQ ID NO: 79; SEQ ID NO: 81; SEQ ID NO: 83; o SEQ ID NO: 85. En un aspecto más específico de la divulgación, este polipéptido es una cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de un Fab.

20 En otro aspecto, este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la divulgación tiene al menos un 95% de identidad secuencial respecto a una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 68; SEQ ID NO: 70; SEQ ID NO: 72; SEQ ID NO: 74; SEQ ID NO: 76; SEQ ID NO: 78; SEQ ID NO: 80; SEQ ID NO: 82; SEQ ID NO: 84; SEQ ID NO: 86. En un aspecto específico de la divulgación, este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno tiene uno o más polipéptidos, teniendo al menos uno de los polipéptidos al menos un 95% de identidad secuencial respecto a una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 68; SEQ ID NO: 70; SEQ ID NO: 72; SEQ ID NO: 74; SEQ ID NO: 76; SEQ ID NO: 78; SEQ ID NO: 80; SEQ ID NO: 82; SEQ ID NO: 84; o SEQ ID NO: 86. En un aspecto más específico de la divulgación, este polipéptido es una cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de un Fab.

25 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención comprende (a) la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 88 y la secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 87, o (b) la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 90 y la secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 89.

30 En otro aspecto, este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la divulgación tiene al menos un 95% de identidad secuencial respecto a una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 90. En un aspecto más específico de la divulgación, este polipéptido es una cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de una IgG.

35 Anticuerpos que se unen al mismo epítipo. La invención proporciona anticuerpos que se unen a ZNRF23 y RNF43. Por lo tanto, se pueden identificar anticuerpos adicionales en función de su capacidad para competir de forma cruzada con (por ejemplo, inhibir competitivamente la unión de, de una manera estadísticamente significativa) anticuerpos de la invención en ensayos de unión. Tal como se utiliza en la presente, un anticuerpo «compite» por la unión cuando el anticuerpo competidor inhibe la unión de un anticuerpo de la invención en más de un 50%, en presencia de concentraciones del anticuerpo competidor superiores a  $10^6 \times K_D$  del anticuerpo competidor.

40 Anticuerpos modificados y manipulados genéticamente. Un anticuerpo de la divulgación se puede preparar además utilizando un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias de VH y/o VL que se muestran en la presente como material de partida para producir por manipulación genética un anticuerpo modificado, donde dicho anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas respecto al anticuerpo de partida. Un tipo de manipulación genética de la región variable que puede realizarse es el injerto de CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de los anticuerpos de origen natural específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyan secuencias de CDR del anticuerpo de origen natural específico injertadas en las secuencias de entramado de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes. Remítase, por ejemplo, a Riechmann L *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1998); Jones P *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Queen C *et al.*, *Proc. Natl. Acad., U.S.A.* 86:10029-10033 (1989); Pat. de EE. UU. N.º 5 225 539 concedida a Winter y Pat. de EE. UU. N.ºs 5 530 101, 5 585 089, 5 693 762 y 6 180 370 concedidas a Queen *et al.*  
45 Dichas secuencias de entramado se pueden obtener a partir de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, se pueden encontrar secuencias de ADN de la línea germinal para genes humanos de la región variable de la cadena ligera y pesada en la base de datos de secuencias de la línea germinal humana «VBase». Remítase a Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición*, Publicación de NIH N.º 91-3242 (U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda MD, 1991); Tomlinson IM *et al.*, *J. Mol. Biol.* 227:776-798 (1992); y Cox JPL *et al.*, *Eur. J Immunol.* 24:827-836 (1994).  
50  
55  
60

Injerto de dominios de unión al antígeno en armazones o entramados alternativos. Se puede emplear una amplia variedad de armazones o entramados de anticuerpos/inmunoglobulinas siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una

región de unión que se una específicamente a ZNRF3 o RNF43. Dichos armazones o entramados incluyen los 5 idiotipos principales de inmunoglobulinas humanas, o fragmentos de estas, e incluyen inmunoglobulinas de otras especies animales, preferentemente que tengan aspectos humanizados. Los anticuerpos de una sola cadena pesada, tales como los identificados en camélidos, son de particular interés a este respecto.

En un aspecto, la divulgación se refiere a la generación de anticuerpos no basados en inmunoglobulina utilizando armazones no inmunoglobulínicos en los que se pueden injertar las CDR de la divulgación. Se pueden emplear armazones y entramados no inmunoglobulínicos conocidos o futuros, siempre que comprendan una región de unión específica para la proteína diana (por ejemplo, ZNRF3 o RNF43 humana y/o de cinomólogo). Los armazones o entramados no inmunoglobulínicos conocidos incluyen, sin carácter limitante, fibronectina (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), anquirina (Molecular Partners AG, Zurich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd., Cambridge, MA y Ablynx nv, Zwijnaarde, Bélgica), lipocalina (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), inmunofármacos modulares pequeños (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicuerpos (Avidia, Inc., Mountain View, CA), proteína A (Affibody AG, Suecia) y afilina (gamma-cristalinina o ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania).

Los avímeros derivan de proteína natural que contiene dominio A tal como LRP-1. Estos dominios son utilizados por la naturaleza para las interacciones proteína-proteína y en humanos más de 250 proteínas se basan estructuralmente en dominios A. Los avímeros consisten en varios monómeros diferentes de «dominio A» (2-10) unidos mediante conectores de aminoácidos. Se pueden crear avímeros que se puedan unir al antígeno diana utilizando la metodología descrita, por ejemplo, en las Solicitudes de Patente de EE. UU. N.ºs 2004/0175756, 2005/0053973, 2005/0048512 y 2006/0008844.

Los ligandos de afinidad Affibody son proteínas simples y pequeñas compuestas de un haz de tres hélices basado en el armazón de uno de los dominios de unión a IgG de la Proteína A. La Proteína A es una proteína superficial de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Este dominio de armazón consiste en 58 aminoácidos, de los que 13 se aleatorizan para generar colecciones de Affibody con una gran cantidad de variantes de ligandos. Remítase, por ejemplo, a la Pat. de EE. UU. N.º 5 831 012. Las moléculas Affibody imitan a los anticuerpos y tienen un peso molecular de aproximadamente 6 kDa, mientras que el peso molecular de los anticuerpos es de aproximadamente 150 kDa.

Anticuerpos humanos o humanizados. La invención proporciona anticuerpos completamente humanos que se unen específicamente a una proteína ZNRF3 o RNF43 (por ejemplo, ZNRF3 o RNF43 humana y/o de cinomólogo). En comparación con los anticuerpos quiméricos o humanizados, los anticuerpos de unión a ZNRF3 o RNF43 humanos de la invención tienen una antigenicidad más reducida cuando se administran a sujetos humanos.

Los anticuerpos de unión a ZNRF3 o RNF43 humanos se pueden generar empleando métodos que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la tecnología de humanización utilizada para convertir anticuerpos no humanos en anticuerpos humanos manipulados genéticamente. La Publicación de Patente de EE. UU. N.º 2005/0008625 describe un método *in vivo* para reemplazar una región variable de un anticuerpo no humano con una región variable humana en un anticuerpo a la vez que se mantienen las mismas características de unión o proporcionando mejores características de unión en relación con las del anticuerpo no humano. Además, los anticuerpos de unión a ZNRF3 o RNF43 humanos también se pueden obtener comercialmente de empresas que habitualmente producen anticuerpos humanos, por ejemplo, KaloBios, Inc. (Mountain View, CA).

Anticuerpos de camélido. Se han caracterizado proteínas que son anticuerpos obtenidas a partir de miembros de la familia de los camellos y dromedarios (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromaderius*), incluidos miembros del Nuevo Mundo tales como especies de llamas (*Lama paccos*, *Lama glama* y *Lama vicugna*), con respecto a su tamaño, complejidad estructural y antigenicidad para sujetos humanos. Determinados anticuerpos de tipo IgG de esta familia de mamíferos que se encuentran en la naturaleza carecen de cadenas ligeras y, por tanto, son estructuralmente distintos de la estructura cuaternaria típica de cuatro cadenas que tiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, para anticuerpos de otros animales. Remítase a la Solicitud de Patente Internacional WO 94/04678, publicada el 3 de marzo de 1994. Se puede obtener una región del anticuerpo de camélido que es el dominio variable pequeño único identificado como VHH mediante manipulación genética para producir una proteína pequeña con una elevada afinidad por una diana, lo que da como resultado una proteína derivada de anticuerpo de bajo peso molecular conocida como «nanocuerpo de camélido». Remítase a la Pat. de EE. UU. N.º 5 759 808, publicada el 2 de junio de 1998. Remítase también a Stijlemans B *et al.*, *J Biol Chem* 279: 1256-1261 (2004); Dumoulin M *et al.*, *Nature* 424: 783-788 (2003); Pleschberger M *et al.* *Bioconjugate Chem* 14: 440-448 (2003); Cortez-Retamozo V *et al.*, *Int J Cancer* 89: 456-62 (2002); y Lauwereys M *et al.*, *EMBO J* 17: 3512-3520 (1998). Hay colecciones manipuladas genéticamente de anticuerpos de camélido y fragmentos de anticuerpos disponibles en el mercado, por ejemplo, en Ablynx, Gante, Bélgica. Como con otros anticuerpos de origen no humano, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de camélido puede alterarse de forma recombinante para obtener una secuencia que se parezca más a una secuencia humana, es decir, el nanocuerpo se puede «humanizar». Por tanto, la baja antigenicidad natural de los anticuerpos de camélido para seres humanos se puede reducir aún más.

Métodos para producir anticuerpos de la invención. En algunos aspectos, se utilizan células hospedadoras de mamífero para expresar y producir los anticuerpos de la invención. Por ejemplo, pueden ser una línea celular del hibridoma que

expresen genes de inmunoglobulina endógenos o una línea celular de mamífero que albergue un vector de expresión exógeno. Estas incluyen cualquier célula animal o humana normal mortal o normal o anómala inmortal. Por ejemplo, se han desarrollado una serie de líneas celulares hospedadoras adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas, incluidas las líneas celulares CHO, varias líneas celulares COS, células HeLa, líneas celulares de mieloma, linfocitos B transformados e hibridomas. El uso del cultivo de células de tejidos de mamíferos para expresar polipéptidos se trata en general en, por ejemplo, Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Los vectores de expresión para células hospedadoras de mamífero pueden incluir secuencias de control de la expresión tales como un origen de la replicación, un promotor y un potenciador. Remítase, por ejemplo, a Queen, *et al.*, *Immunol. Rev.* 89:49-68 (1986) y sitios de información del procesamiento necesarios tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación de la transcripción. Estos vectores de expresión contienen normalmente promotores derivados de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos, específicos del tipo de célula, específicos del estadio y/o modulables o regulables. Los promotores útiles incluyen, sin carácter limitante, el promotor de metalotioneína, el promotor constitutivo tardío mayor del adenovirus, el promotor MMTV inducible por dexametasona, el promotor SV40, el promotor MRP polIII, el promotor constitutivo MPSV, el promotor CMV inducible por tetraciclina (tal como el promotor CMV temprano inmediato humano), el promotor CMV constitutivo y combinaciones de promotor-potenciador conocidas en la técnica.

Generación de anticuerpos monoclonales de la invención. Los anticuerpos monoclonales (mAb) se pueden producir mediante varias técnicas, que incluyen la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica convencional de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Pueden emplearse muchas técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la transformación vírica u oncogénica de linfocitos B.

Un sistema animal para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridoma en ratones es un procedimiento bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son conocidos en la técnica. Los compañeros de fusión (por ejemplo, células murinas de mieloma) y procedimientos de fusión también son conocidos.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la invención se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera se puede obtener a partir del hibridoma murino de interés y manipularse genéticamente para que contenga secuencias de inmunoglobulina no murina (por ejemplo, humana) usando técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden unirse a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica. Remítase, por ejemplo, a la Pat. de EE. UU. N.º 4 816 567 otorgada a Cabilly *et al.* Para crear un anticuerpo humanizado, se pueden insertar regiones CDR murinas en un entramado humano empleando métodos conocidos en la técnica. Remítase, por ejemplo, a la Pat. de EE. UU. N.º 5 225 539 otorgada a Winter y las Pat. de EE. UU. N.ºs 5 530 101, 5 585 089, 5 693 762 y 6 180 370 otorgadas a Queen *et al.*

En una realización determinada, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra ZNRF3 o RNF43 se pueden generar utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados en la presente ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en la presente «ratones de Ig humana».

El ratón HuMAb® (Medarex, Inc.) contiene minilocus de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada ( $\mu$  y  $\gamma$ ) y ligera  $\kappa$  humanas no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los locus de cadena  $\mu$  y  $\kappa$  endógenos. Remítase, por ejemplo, a Lonberg, *et al.*, *Nature* 368(6474): 856-859 (1994). Por consiguiente, los ratones exhiben una expresión reducida de IgM o  $\kappa$  de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de las cadenas pesada y ligera humanas introducidos experimentan un cambio de clase y mutación somática para generar IgGk monoclonal humana de elevada afinidad. Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101 (1994); Lonberg, N. y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995), y Harding, F. y Lonberg, N., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546 (1995). La preparación y uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas portadas por dichos ratones, se describen adicionalmente en Taylor, L. *et al.*, *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295 (1992); Chen, J. *et al.*, *International Immunology* 5: 647-656 (1993); Tuailleon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3720-3724 (1993); Choi *et al.*, *Nature Genetics* 4:117-123 (1993); Chen, J. *et al.*, *EMBO J.* 12: 821-830 (1993); Tuailleon *et al.*, *J. Immunol.* 152:2912-2920 (1994); Taylor, L. *et al.*, *International Immunology* 579-591 (1994); y Fishwild, D. *et al.*, *Nature Biotechnology* 14: 845-851 (1996). Remítase además a las Pat. de EE. UU. N.ºs 5 545 806, 5 569 825, 5 625 126, 5 633 425, 5 789 650, 5 877 397, 5 661 016, 5 814 318, 5 874 299 y 5 770 429; otorgadas todas ellas a Lonberg y Kay; la Pat. de EE. UU. N.º 5 545 807 otorgada a Surani *et al.*; las Publicaciones de PCT N.ºs WO 92/103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/113852, WO 98/24884 y WO 99/45962, otorgadas todas ellas a Lonberg y Kay; y la Publicación de PCT N.º WO 01/14424 otorgada a Korman *et al.*

En otro aspecto, los anticuerpos humanos de la divulgación pueden generarse utilizando un ratón que porte secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porte un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Tales ratones, denominados en la presente «ratones KM», se describen detalladamente en la Publicación de PCT WO 02/43478.

Además, están disponibles en la técnica sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden utilizarse para generar anticuerpos de la divulgación. Por ejemplo, se puede utilizar un sistema transgénico alternativo denominado Xenoratón (Abgenix, Inc.). Tales ratones se describen, por ejemplo, en las Pat. de EE. UU. N.ºs 5 939 598, 6 075 181, 6 114 598, 6 150 584 y 6 162 963 otorgadas a Kucherlapati *et al.*

Además, están disponibles en la técnica sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden utilizarse para generar anticuerpos de la divulgación. Por ejemplo, se pueden utilizar ratones que porten tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, denominados «ratones TC»; tales ratones se describen en Tomizuka *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727 (2000). Además, se han descrito en la técnica vacas que portan transcromosomas de las cadenas pesada y ligera humanas y se pueden utilizar para generar anticuerpos de la divulgación. Kuroiwa *et al.*, *Nature Biotechnology* 20:889-894 (2002).

Los anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación también se pueden preparar utilizando métodos de presentación de fagos para cribar colecciones de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de presentación de fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica o se describen en los ejemplos más adelante. Remítase, por ejemplo, a: las Pat. de EE. UU. N.ºs 5 223 409, 5 403 484 y 5 571 698 otorgadas a Ladner *et al.*; las Pat. de EE. UU. N.ºs 5 427 908 y 5 580 717 otorgadas a Dower *et al.*; las Pat. de EE. UU. N.ºs 5 969 108 y 6 172 197 otorgadas a McCafferty *et al.*; y las Pat. de EE. UU. N.ºs 5 885 793, 6 521 404, 6 544 731, 6 555 313, 6 582 915 y 6 593 081 otorgadas a Griffiths *et al.*

Los anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación también se pueden preparar utilizando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de modo que pueda generarse una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Tales ratones se describen, por ejemplo, en las Pat. de EE. UU. N.ºs 5 476 996 y 5 698 767 otorgadas a Wilson *et al.*

Manipulación genética del entramado o Fc. Los anticuerpos manipulados genéticamente de la divulgación incluyen aquellos en los que se han realizado modificaciones en los residuos del entramado dentro de VH y/o VL, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, tales modificaciones del entramado se realizan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia consiste en «retromutar» uno o más residuos del entramado hasta la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha experimentado una mutación somática puede contener residuos del entramado que difieran de la secuencia de la línea germinal de la que deriva el anticuerpo. Tales residuos se pueden identificar comparando las secuencias del entramado del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las que deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región de entramado a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas se pueden «retromutar» hasta la secuencia de la línea germinal, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio. Se pretende que tales anticuerpos «retromutados» también queden englobados en la divulgación.

Otro tipo de modificación en el entramado implica mutar uno o más residuos dentro de la región de entramado, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar los epítomos de linfocitos T con el fin de reducir de este modo la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Esta estrategia también se denomina «desinmunización» y se describe en mayor detalle en la Publicación de Patente de EE. UU. N.º 20030153043 de Carr *et al.*

Además o como alternativa a las modificaciones hechas dentro de las regiones de entramado o CDR, los anticuerpos de la invención se pueden manipular genéticamente para que incluyan modificaciones dentro de la región Fc, habitualmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor de Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo de la invención se puede modificar químicamente (por ejemplo, pueden adherirse uno o más restos químicos al anticuerpo) o modificarse para alterar su glucosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada uno de estos aspectos se describe con más detalle a continuación. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

En un aspecto de la divulgación, la región de bisagra de CH1 se modifica de modo que el número de residuos de cisteína en la región de bisagra se altere, por ejemplo, se aumente o disminuya. Esta estrategia se describe con más detalle en la Pat. de EE. UU. N.º 5 677 425 de Bodmer *et al.* El número de residuos de cisteína en la región de bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otro aspecto de la divulgación, la región de bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región interfacial del dominio CH2-CH3 del fragmento de Fc-bisagra de modo que el anticuerpo tenga una unión alterada a la proteína A estafilocócica (SpA) con respecto a la unión de SpA al dominio de Fc-bisagra nativo. Esta estrategia se describe con más detalle en la Pat. de EE. UU. N.º 6 165 745 de Ward *et al.*

En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversas estrategias. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S y T256F, según se describe en la Pat. de EE. UU. N.º 6 277 375 otorgada a Ward. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo se puede alterar dentro de la región CH1 o CL para que contenga una epitopo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Pat. de EE. UU. N.ºs 5 869 046 y 6 121 022 de Presta *et al.*

En otro aspecto más de la divulgación, la región Fc se altera reemplazando al menos un residuo aminoacídico con un residuo aminoacídico diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden reemplazar uno o más aminoácidos con un residuo aminoacídico diferente de modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector, pero conserve la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo precursor. El ligando efector para el que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Esta estrategia se describe con más detalle en las Pat. de EE. UU. N.ºs 5 624 821 y 5 648 260, ambas de Winter *et al.*

En otro aspecto de la divulgación, se pueden reemplazar uno o más aminoácidos seleccionados entre residuos aminoacídicos con un residuo aminoacídico diferente de modo que el anticuerpo tenga unión alterada a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o anulada. Esta estrategia se describe con más detalle en las Pat. de EE. UU. N.ºs 6 194 551 de Idusogie *et al.*

En otro aspecto de la divulgación, se alteran uno o más residuos aminoacídicos con el fin de alterar de este modo la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Esta estrategia se describe con más detalle en la Publicación de PCT WO 94/29351 de Bodmer *et al.*

En otro aspecto más de la divulgación, la región Fc se modifica con el fin de aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos. Esta estrategia se describe con más detalle en la Publicación de PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de unión en IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn se han cartografiado y se han descrito variantes con una unión mejorada. Remítase a Shields RL *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001).

En otro aspecto más de la divulgación, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el «antígeno». Tales modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación del entramado de la región variable para eliminar de este modo la glicosilación en ese sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Una estrategia de este tipo se describe con más detalle en las Pat. de EE. UU. N.ºs 5 714 350 y 6 350 861 de Co *et al.*

Adicionalmente o de forma alternativa, se puede preparar un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glicosilación tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tenga cantidades mayores de estructuras de GlcNac entrecruzadas. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de los carbohidratos se pueden conseguir, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con una maquinaria de glicosilación alterada. En la técnica se han descrito células con una maquinaria de glicosilación alterada y estas se pueden utilizar como células hospedadoras en las que se expresan los anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con una glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1 176 195 de Hang *et al.* describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en una línea celular de este tipo presentan hipofucosilación. La Publicación de PCT WO 03/035835 de Presta describe una variante de la línea celular CHO, las células Lecl3, con menor capacidad para unir fucosa a carbohidratos unidos a Asn(297), lo que también da como resultado la hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula hospedadora. Remítase también a Shields, R.L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740 (2002). La Solicitud de Patente Internacional WO 99/54342 de Umana *et al.* describe líneas celulares manipuladas genéticamente para que expresen glicosil-transferasas modificadoras de glicoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares manipuladas genéticamente exhiben un incremento de estructuras GlcNac entrecruzadas, lo cual da como resultado una mayor actividad de ADCC de los anticuerpos. Remítase también a Umana *et al.*, *Nat. Biotech.* 17:176-180 (1999).

La inhibición de ZNRF3 fomenta la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina y altera la señalización de Wnt/PCP *in vivo*. Las proteínas Frizzled se requieren para la señalización tanto de Wnt/ $\beta$ -catenina como de Wnt/PCP, y la inhibición de ZNRF3 incrementa el nivel en membrana de las proteínas Frizzled. Por consiguiente, cabe esperar que la inhibición de ZNRF3 fomente la señalización tanto de Wnt/ $\beta$ -catenina como de Wnt/PCP. Los inventores evaluaron esta hipótesis en organismos modelo.

En primer lugar, la sobreexpresión de ZNRF3  $\Delta$ RING, pero no de ZNRF3 de origen natural, en embriones de pez cebra dio como resultado la pérdida de estructuras anterieurales, de forma más prominente los ojos. La supresión de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina en el neuroectodermo anterior es un paso importante para el establecimiento del patrón neural temprano durante la gastrulación, y la activación ectópica de la señalización de la  $\beta$ -catenina da como resultado la pérdida de estructuras anterieurales.

Los peces cebra se mantuvieron utilizando métodos estándar. Nusslein-Volhard C y Dahm R *Zebrafish. A practical approach*. (Oxford University Press, Reino Unido, 2002); Westerfield M *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Brachydanio rerio)*. (University of Oregon Press, Eugene, OR, 1995).

Se llevó a cabo una transcripción *in vitro* para sintetizar ARNm con caperuza utilizando plásmidos linearizados que contenían ZNRF3 humana, ZNRF3  $\Delta$ RING y la secuencia codificante de GFP como molde utilizando el kit mMACHINE mMESSAGE (Ambion). Para el pez cebra, se inyectaron 200 pg de ARNm de ZNRF3 WT o 400 pg de ARNm de ZNRF3  $\Delta$ RING en los embriones en el estadio celular 1-2.

Para la hibridación *in situ*, los embriones se fijaron en los estadios indicados durante toda la noche en paraformaldehído al 4%/PBS. Se generaron sondas antisentido marcadas con DIG y se utilizaron de acuerdo con protocolos estándar. Nusslein-Volhard C y Dahm R, *Zebrafish. A practical approach*. (Oxford University Press, Reino Unido, 2002).

Se realizó un análisis de los movimientos mediante rastreo celular según ha descrito previamente Gerdes *et al.*, *Nature Genetics* 39, 1350 (2007). En resumen, se inyectó 1 nL de trazador de linaje Alexa 488 conjugado con dextrano de PM 10 000 (Invitrogen) en la yema justo por debajo de las células en el estadio celular 256. Los embriones con clones fluorescentes en la región dorsal se observaron para determinar los movimientos celulares hacia la línea central del embrión y que se extendían hacia el eje anteroposterior. Se tomaron imágenes a tiempo real en los estadios de un 30% de epibolia, escudo y un 75% de epibolia de los mismos embriones.

En segundo lugar, la sobreexpresión de ZNRF3  $\Delta$ RING en embriones *Xenopus* llevó a la duplicación del eje y una mayor expresión de los genes diana de  $\beta$ -catenina en las células *cap* de los animales.

Los experimentos que utilizaban embriones *Xenopus* fueron como se ha descrito previamente. Goentoro L y Kirschner MW, "Evidence that fold-change, and not absolute level, of beta-catenin dictates Wnt signaling". *Mol. Cell* 36, 872-884 (2009).

Se llevó a cabo una transcripción *in vitro* para sintetizar ARNm con caperuza utilizando plásmidos linearizados que contenían ZNRF3 humana, ZNRF3  $\Delta$ RING y la secuencia codificante de GFP como molde utilizando el kit mMACHINE mMESSAGE (Ambion). Para *Xenopus*, se inyectaron 200 pg de ARNm de ZNRF3 WT o ZNRF3  $\Delta$ RING así como ARNm de control de GFP en 2 blastómeros de embriones en estadio celular 4 en la zona marginal.

Para analizar el patrón de expresión de *Znrf3* de *Xenopus*, se extrajo el ARN total de los embriones en diferentes estadios. Se llevó a cabo una PCR cuantitativa en este ADNc utilizando la mezcla maestra verde SYBR de Applied Biosystems. Los cebadores utilizados fueron: ZNRF3 5'-GATGGAGAGGAGCTGAGAGTCATTC-3' (directo) (SEQ ID NO: 17); 5'-GATAACTCGCTGTTGCTGCTG-3' (inverso) (SEQ ID NO: 18); histona H4 5'-CGGGATAACATTCAGGGTA-3' (directo) (SEQ ID NO: 19); 5'-TCCATGGCGGTAAGTGC-3' (inverso) (SEQ ID NO: 20). Las muestras se normalizaron respecto a la histona H4 como control interno. Para la RT-PCR con células *cap* de animales *Xenopus*, se inyectó ARNm en los polos de los animales de ambos blastómeros en el estadio celular 2. Las células *cap* de los animales se aislaron en el estadio 8.5 y se cultivaron hasta el estadio 10.5 para la RT-PCR. Los cebadores utilizados fueron: Siamois, 5'-CTCCAGCCACCAGTACCAGATC-3' (directo) (SEQ ID NO: 21); 5'-GGGGAGAGTGAAAGTGGTTG-3' (inverso) (SEQ ID NO: 22); *Xnr3*, 5'-TCCACTTGTGCAGTTCCACAG-3' (directo) (SEQ ID NO: 23); 5-ATCTCTTCATGGTGCCTCAGG-3' (inverso) (SEQ ID NO: 24); y *Elf1*alfa, 5-CAGATTGGTGTGGATATGC-3' (directo) (SEQ ID NO: 25), 5'-ACTGCCTTGATGACTCCTAG-3' (inverso) (SEQ ID NO: 26).

Considerando nuestros resultados de los ensayos con pez cebra y *Xenopus* conjuntamente, hemos descubierto que la inducción de fenotipos típicos asociados con una señalización excesiva de la  $\beta$ -catenina por parte de ZNRF3  $\Delta$ RING indica que ZNRF3 suprime la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina *in vivo*. Se requiere una regulación exacta de la respuesta de señalización de PCP para una gastrulación normal y una señalización tanto aumentada como reducida de PCP altera los movimientos de extensión convergente. Cabe destacar que la sobreexpresión de ZNRF3 de origen natural o ZNRF3

ΔRING en embriones de pez cebra produjo fenotipos característicos de defectos de extensión convergente tales como unos ejes corporales acortados y unos somitas más anchos tal como se pone de manifiesto mediante tinción con ribosondas frente a *myoD* y *pcdh8*. La sobreexpresión de ZNRF3 de origen natural provocó la bifurcación del eje y cabe destacar que también se produjo el mismo fenotipo mediante la sobreexpresión de una Frizzled negativa dominante. 5 Nasevicius A. *et al.* "Evidence for a frizzled-mediated wnt pathway required for zebrafish dorsal mesoderm formation". *Development* 125, 4283-4292 (1998).

Todos los fenotipos observados concuerdan con los defectos de extensión convergente e indican que el hecho de alterar la actividad de ZNRF3 afecta a los movimientos de gastrulación. Esto se confirma en un experimento de trazado de linaje fluorescente. En embriones de control, las células convergen en la línea media dorsal. Por el contrario, las células que sobreexpresaban ZNRF3 de origen natural o ZNRF3 ΔRING presentaron movimientos dorsolaterales defectuosos ya que no convergieron de manera normal hacia la línea media. 10

En tercer lugar, para estudiar la función de ZNRF3 en ratones, los inventores crearon ratones con supresión de *Znrf3* y retrocruzaron la mutación de supresión en un entorno de C57BL/6. Los embriones deficientes en *Znrf3* fallecieron poco después de nacer. 15

En el vector que actúa sobre la diana, el exón 7 que codifica el dominio RING está flanqueado por dos sitios loxP. El vector que actúa sobre la diana linearizado se sometió a electroporación en células 129/SvJ ES y los clones de ES resistentes a G418 en primer lugar se cribaron mediante PCR anidada y a continuación se sometieron a un análisis de inmunotransferencia de Southern. Los ADN genómicos se digirieron con las enzimas de restricción XmnI o BglII y se hibridaron con sondas situadas fuera de las regiones homólogas 5' y 3', respectivamente. El clon de ES 5A7 se utilizó para la inyección de blastocitos y los machos quiméricos se aparearon con ratones supresores de CRE en el entorno de C57BL/6J. Se identificaron los ratones F1 con delección mediada por cre del exón 7 mediante PCR y se retrocruzaron adicionalmente en el entorno de C57BL/6J antes de los intercruces de ratones heterocigóticos para producir ratones/embriones homocigóticos. Los ratones homocigóticos y heterocigóticos de origen natural se identificaron mediante PCR «multiplex» con los siguientes cebadores: NEO (T, directo), 5'-TATCATGGTCTGTATAACCGGGATCG-3' (SEQ ID NO: 27); #523 (E, inverso): 5'-CATACTTTGGGCTCATGAGCAAGC-3' (SEQ ID NO: 28); #521 (E, T, inverso): 5'-GCAGGTATACATTACCACACCC-3' (SEQ ID NO: 29). Los ratones deficientes en *Znrf3* se cruzaron en el entorno de C57BL/6J. Se generaron embriones de ratón *Znrf3*<sup>-/-</sup> y controles de la camada de origen natural mediante un apareamiento programado de los progenitores heterocigóticos. En el estadio embrionario indicado, las hembras embarazadas fueron sacrificadas y los embriones se diseccionaron para realizar la tomografía o histología tras su fijación en paraformaldehído al 4% durante toda la noche a 4 °C. Los genotipos de los embriones se determinaron mediante un genotipado de PCR utilizando ADN genómico extraído del saco vitelino. Tras la deshidratación en series de gradientes de etanol, el embrión se embebió en parafina de frente para seccionarlo horizontalmente y los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se llevó a cabo una hibridación *in situ* de preparación completa (*whole mount*) con embriones de ratón E9.5 de acuerdo con los protocolos estándar utilizando una sonda de ácido nucleico bloqueado (LNA) marcado con DIG doble 25 nM de Exiqon. Secuencia de la sonda de Axin2 de ratón: TCTCTAACATCCACTGCCAGA (SEQ ID NO: 30). 20 25 30 35

El fenotipo más apreciable de los embriones que carecen de *Znrf3* es la falta de formación de lentes. Probablemente este fenotipo es debido a la señalización hiperactiva de β-catenina durante el desarrollo de las lentes ya que la expresión del gen que tiene como diana β-catenina Axin2 aumentó de forma significativa en la región ocular de los embriones E9.5 que carecían de *Znrf3*. 40

Existe constancia de que la supresión de la señalización de Wnt/β-catenina en el ectodermo superficial es importante para el desarrollo de las lentes. La activación ectópica de la señalización de β-catenina en los ojos bloquea la formación de las lentes mientras que la supresión de la β-catenina específica en los ojos conduce a la formación de cuerpos lentoides ectópicos. Smith AN, Miller LA, Song N, Taketo MM y Lang RA, "The duality of beta-catenin function: a requirement in lens morphogenesis and signaling suppression of lens fate in periocular ectoderm". *Dev. Biol.* 285, 477-489 (2005); Kreslova J *et al.* "Abnormal lens morphogenesis and ectopic lens formation in the absence of beta-catenin function". *Genesis*. 45, 157-168 (2007); Machon O *et al.* "Lens morphogenesis is dependent on Pax6-mediated inhibition of the canonical Wnt/beta-catenin signaling in the lens surface ectoderm". *Genesis*. 48, 86-95 (2010). 45 50

Existe constancia de que la señalización de Wnt/PCP es importante para los movimientos celulares durante el estrechamiento de la placa neural en plegamiento y que ratones deficientes en Frizzled y Dishevelled muestran defectos de cierre del tubo neural. Wang Y, Guo N y Nathans J, «The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells». *J. Neurosci.* 26, 2147-2156 (2006); Yu H *et al.* "Frizzled 1 and frizzled 2 genes function in palate, ventricular septum and neural tube closure: general implications for tissue fusion processes". *Development* 137, 3707-3717 (2010); Wang J *et al.* "Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation". *Development* 133, 1767-1778 (2006); Etheridge SL *et al.* "Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development". *PLoS Genet.* 4, e1000259 (2008). Cabe destacar que aproximadamente un 20% de nuestros embriones que carecen de *Znrf3* muestran defectos de cierre del tubo neural, que probablemente son el resultado de una 55 60

señalización de Wnt/PCP alterada. Considerados conjuntamente, estos resultados indican que ZNRF3 regula la señalización tanto de Wnt/ $\beta$ -catenina como de Wnt/PCP *in vivo*.

La R-espondina fomenta la señalización de Wnt mediante la inhibición de ZNRF3. Tal como se describe en más detalle posteriormente, las proteínas de tipo R-espondina (por ejemplo, RSPO1 - RSPO4) son una familia de moléculas secretadas que potencian en gran medida la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina y Wnt/PCP, por lo que poseen significancia terapéutica y biológica. Los inventores han descubierto que ZNRF3 es la diana molecular de la R-espondina. Nuestros resultados muestran que ZNRF3 inhibe la señalización de Wnt fomentando el recambio de Frizzled y LRP6, y que esta actividad de ZNRF3 es inhibida por la R-espondina.

La R-espondina potencia la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina y Wnt/PCP. Ya que Frizzled es compartida por las vías de Wnt/ $\beta$ -catenina y Wnt/PCP y la R-espondina induce la fosforilación de Dvl, evaluamos si la R-espondina potencia la señalización de Wnt mediante el incremento del nivel en membrana de Frizzled. En efecto, determinamos que la R-espondina 1 (RSPO1) incrementa el nivel en membrana de Myc-FZD8, utilizando un ensayo de biotilación de proteínas de la superficie celular y un ensayo de citometría de flujo. Descubrimos que RSPO1 también incrementa el nivel en la superficie celular de proteínas Frizzled endógenas en un ensayo de citometría de flujo utilizando un anticuerpo pan-Frizzled.

Ya que ZNRF3 regula el nivel en membrana de las proteínas Frizzled, evaluamos si la R-espondina fomenta la señalización de Wnt a través de la inhibición de ZNRF3. Descubrimos que la R-espondina interacciona físicamente con el dominio extracelular de la R-espondina. Para ello, los inventores transfectaron de forma transitoria células HEK293 con FZD4 (Frizzled 4) marcada con Myc N-terminal, o ZNRF3 ECD-TM, o ZNRF3 P103A ECD-TM, a continuación incubaron estas células con medio acondicionado de RSPO1-GFP durante 1 hora. Determinamos la unión de RSPO1-GFP a las proteínas marcadas con Myc expresadas sobre la superficie celular utilizando inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-GFP y anti-Myc. Utilizando este ensayo de unión basado en células, se demostró que RSPO1-GFP se unía a ZNRF3 ECD-TM, pero no a ZNRF3 P103A ECD-TM o FZD4. De este modo, nuestros resultados muestran que la R-espondina interacciona específicamente con el dominio extracelular de ZNRF3.

Ya que también existe constancia de que la R-espondina se une a LGR4, los inventores evaluaron si la R-espondina interaccionaba con LGR4 y ZNRF3 de forma simultánea para inducir la interacción entre ZNRF3 y la R-espondina. Esto se muestra en la FIG. 9. Se trataron células HEK293 que coexpresaban LGR4-HA y Myc-ZNRF3  $\Delta$ RING con medio acondicionado (CM) de RSPO1-GFP durante 1 hora. A continuación, los lisados celulares se sometieron a inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Myc. Los inmunoprecipitados se resolvieron y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos anti-HA, anti-Myc y anti-GFP. La FIG. 9 muestra que RSPO1 incrementa la interacción entre ZNRF3 y LGR4.

Ya que la R-espondina incrementa la señalización de Wnt mediante la unión a ZNRF3 y la supresión de su actividad, evaluamos si la sobreexpresión de ZNRF3 ECD evita la interacción entre la R-espondina y ZNRF3 endógena, e inhibe la señalización mediada por la R-espondina. Esto se muestra en la FIG. 10. Células HEK293 que expresaban de forma estable un marcador de luciferasa STF junto con un vector vacío o ZNRF3 ECD-TM se trataron con medio acondicionado de Wnt3a o medio acondicionado de RSPO1  $\Delta$ C con las concentraciones y combinaciones indicadas durante toda la noche. A continuación, las células se sometieron al ensayo de marcador de luciferasa. Según se muestra en la FIG. 10, la sobreexpresión de ZNRF3 ECD-TM bloqueó la activación de STF inducida por RSPO1 pero no la inducida por Wnt3a.

Por consiguiente, nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de ZNRF3 ECD-TM inhibió la estabilización de la  $\beta$ -catenina inducida por la R-espondina pero no la inducida por Wnt3a en células HEK293. La sobreexpresión de ZNRF3 ECD-TM también bloqueó la acumulación en membrana inducida por RSPO1 de proteínas Frizzled endógenas en un ensayo de citometría de flujo utilizando un anticuerpo pan-Frizzled. Conjuntamente, nuestros resultados de la FIG. 9 y la FIG. 10 muestran que la R-espondina fomenta la señalización de Wnt mediante la inhibición de ZNRF3 y el incremento del nivel en superficie celular de proteínas Frizzled. La R-espondina interacciona físicamente con el dominio extracelular de ZNRF3 e induce la asociación entre ZNRF3 y LGR4.

Según se discute en más detalle posteriormente, nuestros resultados indican que un anticuerpo biespecífico que se uniera tanto a ZNRF3 (o RNF43) como a LGR4 (o LGR5 o LGR6) imitaría la actividad de la R-espondina y fomentaría la señalización de Wnt.

Administración de los anticuerpos de la invención para tratar enfermedades resultantes de una señalización de Wnt insuficiente y formulaciones farmacéuticas para la administración de los anticuerpos de la invención. Los anticuerpos de la invención son útiles para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una señalización baja de Wnt.

Unos niveles patológicamente bajos de la señalización de Wnt se han asociado con osteoporosis, enfermedad renal poliquística y enfermedades neurodegenerativas. Se ha demostrado que una activación controlada de la vía Wnt fomenta procesos regenerativos tales como la reparación de tejidos y la curación de heridas. Zhao J, Kim KA y Abo A, "Tipping

the balance: modulating the Wnt pathway for tissue repair". *Trends Biotechnol.* 27(3):131-6 (marzo de 2009). Remítase también a Logan CY y Nusse R, "The Wnt signaling pathway in development and disease". *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20:781-810 (2004); Nusse R., "Wnt signaling in disease and in development". *Cell Res.* 15(1):28-32 (Jan. 2005); Clevers H, "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease". *Cell* 127(3):469-80 (3 de noviembre de 2006). Se han llevado a cabo experimentos demostrativos preliminares para mostrar el papel de la señalización de Wnt en la osteoporosis o mucositis. Además, se ha sugerido que el hecho de incrementar la señalización de Wnt podría resultar beneficioso para el tratamiento de la diabetes y otras enfermedades metabólicas.

Los anticuerpos que se unen al dominio extracelular de ZNRF3 y RNF43 para inhibir la función de ZNRF3 y RNF43 sensibilizan a las células frente a la señalización de Wnt y, por lo tanto, se pueden utilizar para enfermedades u otras indicaciones que se beneficiarán de los estimuladores de Wnt. Algunas de las enfermedades y afecciones asociadas con una señalización baja de Wnt incluyen, sin carácter limitante, mucositis, síndrome del intestino corto, traslado bacteriano en la mucosa gastrointestinal, diarrea infecciosa enterotoxigénica o enteropática, enfermedad celíaca, esprúe no tropical, intolerancia a la lactosa y otras afecciones en las que exposiciones dietéticas provocan un embotamiento de las vellosidades de la mucosa y mala absorción, gastritis atrófica y diabetes. También se incluye la osteoporosis, fractura ósea, enfermedades metabólicas tales como diabetes, enfermedad neurodegenerativa y melanoma. Además, los anticuerpos antagonizantes de la invención se pueden utilizar con el fin de fomentar la señalización de Wnt para la regeneración de tejidos tal como la reparación de tejidos y la curación de heridas. Algunos ejemplos de tejido dañado que se puede tratar utilizando los métodos de la invención incluyen tejido intestinal, tejido cardíaco, tejido hepático, tejido renal, tejido esquelético, tejido cerebral, tejido óseo, tejido conectivo y tejido cutáneo.

La Solicitud de Patente de EE. UU. 2009/0220488 describe la administración de anticuerpos (que no son los anticuerpos de la invención) para modular terapéuticamente la actividad de una vía de señalización de Wnt, especialmente anticuerpos que se unen a un componente secretado de una vía de señalización de Wnt o a una región extracelular de un componente de una vía de señalización de Wnt. La Solicitud de Patente de EE. UU. 2009/0220488 describe, por ejemplo, anticuerpos que se unen a Wnt e inhiben la actividad de Wnt, por ejemplo, inhiben la unión de Wnt a un receptor de la superficie celular, por ejemplo, un receptor Frizzled o LRP5/6. Otra clase de anticuerpos citados en la solicitud de patente incluyen anticuerpos que se unen a la región extracelular de un receptor de la superficie celular para Wnt, tal como un receptor Frizzled o LRP5/6, con el fin de reducir o evitar la interacción de Wnt con el receptor o reducir de otro modo la señalización del receptor. Los métodos de administración descritos por la solicitud de patente se pueden adaptar para anticuerpos que se unen al dominio extracelular de ZNRF3 o RNF43. Por lo tanto, el anticuerpo de la invención se puede utilizar para la administración a un sujeto con una enfermedad o afección caracterizada por una señalización baja de Wnt. Mediante esta administración, los anticuerpos de la invención se utilizan para «tratar» al sujeto. A medida que se incrementa la señalización de Wnt en el sujeto, la administración del anticuerpo de la invención «mejorará» la enfermedad o afección en el sujeto.

La mucositis es una complicación clínica de la terapia del cáncer. La mucositis está provocada por los efectos citotóxicos de la irradiación o quimioterapia en células que proliferan rápidamente. La mucositis consiste en daños epiteliales que afectan principalmente a la mucosa oral e intestinal. Los signos químicos son dolor intenso de la cavidad oral, náusea, diarrea, malnutrición y, en los casos graves, sepsis y fallecimiento. Los síntomas pueden llevar a menudo a una limitación de la dosis de la terapia contra el cáncer. En la actualidad no existen tratamientos disponibles para la mucositis oral o gastrointestinal asociada con la terapia de radiación o quimioterapia para tumores sólidos.

La mucositis oral es una complicación común y a menudo debilitante del tratamiento contra el cáncer. Un 50% de los pacientes sometidos a radioterapia para el cáncer de cabeza y cuello y un 10-15% de los pacientes tratados con 5-FU desarrollan mucositis oral de grado 3-4. Se ha demostrado que RSPO1 mejora la mucositis oral en un modelo animal. Zhao J *et al.*, *PNAS* 106:2331 (2010).

El síndrome del intestino corto (SIC) es el resultado de la pérdida anatómica y funcional de segmentos extensos del intestino delgado, de modo que las capacidades digestivas y de absorción se ven afectadas gravemente. Cada año, mucha gente se ve sometida a una extirpación de segmentos largos del intestino delgado debido a varios trastornos, que incluyen traumatismo, enfermedad intestinal inflamatoria, neoplasia, isquemia mesentérica y otros. Varios procedimientos no operativos tales como la radiación pueden provocar un síndrome del intestino corto funcional. Las terapias actuales para el síndrome del intestino corto incluyen estrategias dietéticas, nutrición parenteral total (NPT), trasplante intestinal y operaciones abdominales que no sean trasplantes. Aunque estos tratamientos han contribuido a mejorar los resultados de los pacientes con SIC, tan solo corrigen parcialmente el problema subyacente de una función intestinal reducida. Ninguna terapia actual puede acelerar la recuperación del resto del intestino delgado en los pacientes con SIC. Remítase a Seetharam y Rodrigues, "Short bowel syndrome: a review of management of options" *The Saudi Journal of Gastroenterology* 17, 229-235 (2011).

El intestino de un mamífero adulto constituye uno de los tejidos que se autorrenuevan con mayor rapidez, donde la mucosa intestinal comprende una estructura continua plegada en las criptas proliferativas y las vellosidades diferenciadas. Como respuesta a la alteración de la mucosa, el hospedador inicia una respuesta de curación que da como resultado la

restauración de la integridad de la mucosa y la regeneración de la arquitectura de la mucosa. Este proceso depende en gran medida de la proliferación de las células madre intestinales. Neal *et al.*, "Intestinal stem cells and their roles during mucosal injury and repair". *Journal of Surgical Research* 167, 1-8 (2010); van der Flier and Clevers, "Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium". *Annual Review of Physiology* 71, 241-261 (2009).

Por consiguiente, los factores que regulan la actividad de las células madre intestinales juegan un papel dominante en la capacidad del hospedador para responder a una lesión en el tracto intestinal. Debido a que las proteínas Wnt son los factores de crecimiento más importantes que apoyan la proliferación de las células madre intestinales, la fomentación de la señalización de Wnt incrementará la proliferación del epitelio intestinal. Esto conducirá a un incremento del número de vellosidades intestinales pequeñas y un incremento del área superficial de absorción de la mucosa.

Por lo tanto, en un aspecto de la divulgación, el anticuerpo de la invención se administra a una persona con síndrome del intestino corto. El anticuerpo se administra con el fin de incrementar el área superficial de absorción de la mucosa gastrointestinal. La administración del anticuerpo de la invención tiene un resultado exitoso cuando la persona con síndrome del intestino corto incidente se adapta a una alimentación enteral o cuando la persona con SIC prevalente absorbe nutrientes procedentes de alimentos enterales o cuando la persona reduce la cantidad de nutrición parenteral total requerida diariamente para que la persona mantenga su peso.

Prevención del traslado bacteriano. En un aspecto, el anticuerpo de la divulgación se administra a una persona que corre el riesgo de sufrir septicemia provocada por bacterias entéricas. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo se administra con el fin de incrementar la integridad de la mucosa gastrointestinal, con lo que se previene de este modo que las bacterias entéricas lleguen al torrente sanguíneo de la persona. La reducción de la integridad de la mucosa gastrointestinal (en comparación con la integridad de la mucosa gastrointestinal que es normal para la población humana) es la fuente principal de infecciones del torrente sanguíneo y sepsis en pacientes enfermos en estado crítico. La administración del anticuerpo tiene un resultado exitoso cuando se observan menos casos de bacteriemia y sepsis en pacientes de la unidad de cuidados intensivos (UCI) que en pacientes a los que no se les administra la anticuerpo de la invención.

Recuperación acelerada durante o después de la diarrea infecciosa enterotoxigénica o enteropática. La diarrea infecciosa es un problema pediátrico importante. En un aspecto, el anticuerpo de la invención se administra con el propósito de acortar el tiempo requerido hasta llegar al final de la diarrea o el tiempo requerido para restablecer los movimientos intestinales normales. En un aspecto, el anticuerpo de la invención se puede administrar además del estándar de atención sanitaria, que incluye rehidratación oral o parenteral y, a veces, antibióticos. La administración del anticuerpo tiene un resultado exitoso cuando se observa una disminución de las hospitalizaciones, un acortamiento de las hospitalizaciones o una disminución de la incidencia de complicaciones de deshidratación y anomalías electrolíticas en pacientes pediátricos en comparación con pacientes pediátricos a los que no se les administra el anticuerpo de la invención.

Enfermedad celíaca, esprúe no tropical, intolerancia a la lactosa y otras afecciones en las que exposiciones dietéticas provocan un embotamiento de las vellosidades de la mucosa y mala absorción. En un aspecto, el anticuerpo de la invención se administra con el fin de incrementar el área superficial de absorción de la mucosa. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo de la invención se puede administrar además del estándar de atención sanitaria, que consiste principalmente en evitar los alimentos perjudiciales y, a veces, los suplementos dietéticos. La administración del anticuerpo de la invención tiene un resultado exitoso cuando la persona con enfermedad celíaca, esprúe no tropical, intolerancia a la lactosa u otra afección se adapta a una alimentación enteral o cuando la persona con cualquiera de las afecciones absorbe nutrientes procedentes de alimentos enterales o cuando la persona reduce la cantidad de nutrición parenteral total requerida diariamente para que la persona mantenga su peso.

Gastritis atrófica, específicamente la forma denominada gastritis atrófica metaplásica ambiental. La gastritis atrófica es una afección común en la tercera edad, que se trata actualmente con inyecciones de vitamina B12. Los pacientes corren un mayor riesgo de padecer tumores carcinoides y adenocarcinoma. La administración del anticuerpo tiene un resultado exitoso cuando un médico experto observa la disminución de la incidencia del tumor, en el caso de los carcinoides al disminuir la producción de gastrina de las células G metaplásicas. El anticuerpo no debe administrarse al sujeto si un médico experto determina que los tumores se activan por aumentos en la vía Wnt.

Diabetes mellitus de tipo 2. En un aspecto, el anticuerpo de la invención se administra con el fin de aumentar los niveles de hormonas de tipo incretina, por ejemplo, el péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) y el péptido inhibidor gástrico (GIP). Las incretinas provocan un aumento en la cantidad de insulina liberada por las células beta de los islotes de Langerhans después de comer. Ambas incretinas GLP-1 y GIP son rápidamente inactivadas por la enzima dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4). Los inhibidores de DPP-4 aumentan los niveles de incretina activa al prevenir la desactivación de incretinas endógenas por parte de DPP-4.

La eficacia de los inhibidores de DPP-4 depende de los niveles de incretina activa endógena que parecen estar reducidos en pacientes con diabetes mellitus de tipo II. Remítase a Pratley RE y Gilbert M, *Rev. Diabet. Stud.* 5(2):73-94 (2008).

5 La administración del anticuerpo de la invención aumenta el número de células enteroendocrinas (por ejemplo, células L y células K) al inhibir la vía Wnt, lo que provoca una proliferación de células en los intestinos que son capaces de producir incretinas. Dado que los inhibidores de DPP-4 requieren una producción endógena de incretinas para su eficacia, el anticuerpo de la invención se puede administrar como una terapia combinada con un inhibidor de DPP-4, tal como vildagliptina (Galvus®), sitagliptina (Januvia®), saxagliptina (Onglyza®), linagliptina (Trajenta®), dutogliptina, gemigliptina, alogliptina u otro inhibidor de DPP-4, o con un compuesto con inhibidor de DPP-4, tal como la berberina, para uso en personas con diabetes de tipo II.

10 La terapia combinada puede ser la administración del anticuerpo de la invención al sujeto antes de la administración de un inhibidor de DPP-4. La cantidad de tiempo que debe transcurrir antes de la administración del inhibidor de DPP-4 será tal que las células enteroendocrinas del sujeto proliferen lo suficiente como para producir incretinas. La producción de incretinas se puede evaluar mediante métodos de laboratorio.

15 La terapia combinada puede ser, en su lugar, la administración del anticuerpo de la invención al sujeto concurrente con la administración de un inhibidor de DPP-4, de modo que la proliferación de las células enteroendocrinas y la inhibición de DPP-4 ocurran simultáneamente. La expresión «concurrente con» significa que el anticuerpo de la invención se administra al sujeto con diabetes de tipo II mientras el sujeto se somete a una terapia con un inhibidor de DPP-4. La administración del anticuerpo de la invención puede producirse o no producirse al mismo tiempo que la administración del inhibidor de DPP-4 o de forma combinada con el inhibidor de DPP-4. Debido a que las incretinas tales como GLP-1 también provocan la proliferación de células L (remítase a Grigoryan M *et al.*, *Endocrinology* 153: 3076-3088 (2012), la administración del anticuerpo de la invención con un inhibidor de DPP-4 puede fomentar un bucle de retroalimentación positivo, puesto que el aumento de los niveles de incretina (procedente de la inhibición de DPP-4) aumenta la expresión de las células L intestinales epiteliales y el aumento de las células L (procedente del antagonismo de ZNRF3) aumenta los niveles de incretina.

20 La administración del anticuerpo de la invención, ya sea antes de la administración de un inhibidor de DPP-4 o combinada con un inhibidor de DPP-4, tiene un resultado exitoso cuando el sujeto tiene un mejor control de la diabetes mellitus de tipo II, que se evalúa según el cambio de HgbA1c desde la línea de base. Para consultar un método de evaluación del cambio de HgbA1c desde la línea de base, remítase, por ejemplo, a Vilsbøll T *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab* 88:4897-4903 (2003).

25 Enfermedad metabólica. La disminución de la señalización de Wnt se ha asociado con la enfermedad metabólica. La mutación de pérdida de función LRP6<sup>R611C</sup> da como resultado arteriopatía coronaria temprana, síndrome metabólico y osteoporosis en seres humanos. Main A *et al.*, *Science* 315:1278 (2007). La mutación de pérdida de función LRP5 se asocia con osteoporosis, metabolismo de glucosa alterado e hipercolesterolemia en seres humanos. Saarinen *et al.*, *Clin Endocrinol* 72:481 (2010). Hipercolesterolemia grave, intolerancia a la grasa y aterosclerosis avanzada en ratones que carecen de LRP5 y apoE. Magoori K *et al.*, *JBC* 11331 (2003). LRP5 es esencial para la secreción de la insulina inducida por la glucosa y el metabolismo del colesterol normal en ratones. Fujino *et al.*, *PNAS* 100:229 (2003). La variante TCF7L2 confiere riesgo de padecer diabetes de tipo 2. En resumen, existe constancia de que un aumento de la señalización de Wnt puede ser beneficioso para el tratamiento de enfermedades metabólicas. Por consiguiente, la administración del anticuerpo de la invención a un sujeto con una enfermedad metabólica es útil para tratar la enfermedad metabólica del sujeto.

30 La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un grupo de afecciones inflamatorias del colon y el intestino delgado. Los principales tipos de EII son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Se ha demostrado que la proteína RSPO1 mejora la enfermedad inflamatoria intestinal en un modelo animal. Zhao J *et al.*, *Gastroenterology* 132:1331 (2007). Por consiguiente, la administración del anticuerpo de la invención a un sujeto con EII es útil para tratar la EII del sujeto.

35 Formulaciones. La divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención formulados junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables mejoran o estabilizan la composición, o se pueden utilizar para facilitar la preparación de la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles.

40 Una composición farmacéutica de la divulgación se puede administrar mediante varios métodos conocidos en la técnica. La vía y/o modo de administración varían dependiendo de los resultados deseados. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, o que se administre de forma próxima al sitio de la diana. El portador farmacéuticamente aceptable debe ser adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos o fragmentos de estos, pueden

estar recubiertos por un material para proteger el compuesto frente a la acción de ácidos y otras condiciones naturales que podrían desactivar el compuesto.

La composición debe ser estéril y fluida. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de surfactantes. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables se puede conseguir incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden preparar de acuerdo con métodos muy conocidos y practicados de forma rutinaria en la técnica. Remítase, por ejemplo, a *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (Mack Publishing Co., 20.<sup>a</sup> ed., 2000); y *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978). Las composiciones farmacéuticas se elaboran preferentemente en condiciones de GMP. Habitualmente, en las composiciones farmacéuticas de la divulgación se emplea una dosis terapéuticamente efectiva o dosis eficaz del anticuerpo de la invención. Los anticuerpos se formulan en formas farmacéuticas que sean farmacéuticamente aceptables utilizando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Las pautas posológicas se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o incrementar de forma proporcional la dosis según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente favorable formular composiciones parenterales en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma farmacéutica unitaria, tal como se utiliza en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se han de tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociada con el portador farmacéutico requerido.

Dosis. Los niveles de dosis reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden modificar con el fin de obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un sujeto, una composición y un modo de administración particulares, sin que sean tóxicos para el sujeto. El nivel de dosis seleccionado depende de diversos factores farmacocinéticos, que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la invención empleadas, o el éster, la sal o amida de estas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se esté empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el género, el peso, la afección, el estado general de salud y el historial médico previo del sujeto que se esté tratando, y factores similares.

Un médico o veterinario puede comenzar con dosis de los anticuerpos de la invención que se emplean en la composición farmacéutica de niveles inferiores a los necesarios para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar la dosis gradualmente hasta que se consiga el efecto deseado. En general, las dosis eficaces de las composiciones de la divulgación, para el tratamiento de un trastorno inflamatorio alérgico descrito en la presente varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del sujeto, si el sujeto es humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosis del tratamiento deben ser tituladas para optimizar su seguridad y eficacia. Para la administración sistémica con un anticuerpo, la dosis varía en el intervalo de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 15 mg/kg, de peso corporal del hospedador. Un régimen de tratamiento ilustrativo implica la administración sistémica una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3-6 meses. Para la administración intravítrea con un anticuerpo, la dosis varía en el intervalo de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10 mg. Un régimen de tratamiento ilustrativo implica la administración sistémica una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3-6 meses.

El anticuerpo se administra habitualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, según se indique al medir los niveles en sangre del anticuerpo de la invención en el sujeto. En algunos métodos de administración sistémica, la dosis se ajusta para conseguir una concentración del anticuerpo en plasma de 1-1000 µg/ml y en algunos métodos de 25-500 µg/ml. Como alternativa, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el sujeto. En general, los anticuerpos humanizados presentan una semivida más prolongada que la de los anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja con intervalos relativamente poco frecuentes durante un periodo de tiempo prolongado. Algunos sujetos siguen recibiendo el tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, en ocasiones se requiere una dosis relativamente elevada con intervalos relativamente cortos hasta que la evolución de la enfermedad se reduzca o termine, y preferentemente hasta que el sujeto muestre una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, se puede administrar al sujeto un régimen profiláctico.

Anticuerpos biespecíficos. ZNRF3 es una diana molecular de la R-espondina. La R-espondina interactúa tanto con ZNRF3 como con LGR4 e inhibe la función de ZNRF3. Cabe esperar que la dimerización inducida de ZNRF3 y LGR4 imite a la R-espondina e inhiba la función de ZNRF3. Por consiguiente, la invención proporciona anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos o fragmentos de unión al antígeno de estos. Una parte del anticuerpo se une al dominio extracelular de ZNRF3 o RNF43. La otra parte del anticuerpo se une al correceptor de la R-espondina LGR4, LGR5 o LGR6. Tales anticuerpos deberían imitar a la R-espondina y mejorar la señalización de Wnt.

Un anticuerpo de la invención, o regiones de unión al antígeno de este, pueden derivatizarse o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar anticuerpos biespecíficos y fragmentos de estos que se unan a al menos dos sitios de unión o moléculas diana diferentes. El anticuerpo de la invención, de hecho, puede derivatizarse o unirse a más de una molécula funcional diferente para generar moléculas multiespecíficas que se unan a más de dos sitios de unión y/o moléculas diana diferentes; se pretende que tales moléculas multiespecíficas también estén englobadas por la expresión «molécula biespecífica» tal como se utiliza en la presente. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede unirse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro tipo) a una o más moléculas de unión diferentes, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de modo que se produzca una molécula biespecífica.

Además, para la divulgación en que los anticuerpos biespecíficos y fragmentos de estos son multiespecíficos, los anticuerpos y fragmentos de estos pueden incluir además una tercera especificidad de unión, además del primer y segundo epítipo diana.

En un aspecto, las moléculas biespecíficas de la divulgación comprenden como especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de este, que incluye, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv o un Fv monocatenario. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o de cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo de este tal como un Fv o un constructo monocatenario tal como se describe en la Pat. de EE. UU. N.º 4 946 778.

Los diacuerpos son moléculas bivalentes biespecíficas en las que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, conectados por un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Los dominios VH y VL se aparean con dominios complementarios de otra cadena, creando así dos sitios de unión al antígeno. Remítase, por ejemplo, a Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993); Poljak *et al.*, *Structure* 2:1121-1123 (1994). Los diacuerpos se pueden producir expresando dos cadenas polipeptídicas con la estructura VHA-VLB y VHB-VLA (configuración VH-VL), o VLA-VHB y VLB-VHA (configuración VL-VH) dentro de la misma célula. La mayoría de ellos se pueden expresar en forma soluble en bacterias. Los diacuerpos de cadena simple (scDb) se producen conectando las dos cadenas polipeptídicas formadoras del diacuerpo con un conector de aproximadamente 15 residuos aminoácidos. Remítase a Holliger y Winter, *Cancer Immunol. Immunother.* 45(3-4):128-30 (1997); Wu *et al.*, *Immunotechnology* 2(1):21-36 (1996). Los scDb se pueden expresar en bacterias en forma monomérica activa soluble. Remítase a Holliger y Winter, *Cancer Immunol. Immunother.*, 45(34): 128-30 (1997); Wu *et al.*, *Immunotechnology* 2(1):21-36 (1996); Pluckthun y Pack, *Immunotechnology* 3(2): 83-105 (1997); Ridgway *et al.*, *Protein Eng.* 9(7):617-21 (1996). Un diacuerpo puede fusionarse con Fc para generar un «di-diacuerpo». Remítase a Lu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(4):2856-65 (2004).

Otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas de la divulgación son anticuerpos monoclonales de murino, quiméricos y humanizados.

Los anticuerpos biespecíficos de la divulgación se pueden preparar conjugando las especificidades de unión de los constituyentes, utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión del anticuerpo biespecífico puede generarse por separado y después conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se puede utilizar varios agentes de acoplamiento o reticulación para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC). Remítase, por ejemplo, a Karpovsky *et al.*, *J. Exp. Med.* 160:1686 (1984); Liu, MA *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648 (1985). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus, *Behring Ins. Mitt.* N.º 78,118-132 (1985); Brennan *et al.*, *Science* 229:81-83 (1985), y Glennie *et al.*, *J. Immunol.* 139: 2367-2375 (1987). Los agentes de conjugación son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, se pueden conjugar mediante enlaces sulfhidrilo de las regiones bisagra del extremo C de las dos cadenas pesadas. En un aspecto particular, la región bisagra se modifica para que contenga un número impar de residuos sulfhidrilo, por ejemplo, uno, antes de la conjugación.

Como alternativa, ambas especificidades de unión se pueden codificar en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula hospedadora. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión de mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')<sub>2</sub> o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la divulgación puede ser una molécula monocatenaria que comprenda un anticuerpo monocatenario y un determinante de unión, o una molécula biespecífica monocatenaria que comprenda dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas monocatenarias. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en la Pat. de EE.UU. N.º 5 260 203; la Pat. de EE.UU. N.º 5 455 030; la Pat. de EE.UU. N.º 4 881 175; la Pat. de EE.UU. N.º 5 132 405; la Pat. de EE.UU. N.º 5 091 513; la Pat. de EE.UU. N.º 5 476 786; la Pat. de EE.UU. N.º 5 013 653; la Pat. de EE.UU. N.º 5 258 498; y la Pat. de EE.UU. N.º 5 482 858.

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

En otro aspecto, la divulgación proporciona compuestos multivalentes que comprenden al menos dos porciones de unión al antígeno idénticas o diferentes de los anticuerpos de la invención. Las porciones de unión al antígeno pueden unirse entre sí mediante fusión de proteínas o enlace covalente o no covalente. Como alternativa, se han descrito métodos de enlace para los anticuerpos biespecíficos y fragmentos de estos. Se pueden obtener anticuerpos tetravalentes y fragmentos de estos, por ejemplo, mediante la reticulación de los anticuerpos de la invención con un anticuerpo que se una a las regiones constantes de los anticuerpos de la invención, por ejemplo, la región Fc o bisagra.

Por lo tanto, los anticuerpos biespecíficos (u otros agentes similares tales como las quimeras de proteínas) que se unen tanto a LGR4/LGR5/LGR6 como a ZNRF3/RNF43 sensibilizarán las células frente a la señalización de Wnt y se pueden utilizar para enfermedades u otras afecciones que se beneficiarán de los estimuladores de Wnt. Tales afecciones incluyen, sin carácter limitante, mucositis, síndrome del intestino corto, traslado bacteriano en la mucosa gastrointestinal, diarrea infecciosa enterotoxigénica o enteropática, enfermedad celíaca, esprúe no tropical, intolerancia a la lactosa y otras afecciones en las que exposiciones dietéticas provocan un embotamiento de las vellosidades de la mucosa y mala absorción, gastritis atrófica y diabetes mellitus de tipo II. También se incluye la osteoporosis, fractura ósea, enfermedades metabólicas tales como diabetes, enfermedad neurodegenerativa y melanoma.

Por ejemplo, en ciertos aspectos, la divulgación se refiere:

- (i) a anticuerpos donde una parte del anticuerpo se une al dominio extracelular de ZNRF3 y la otra parte del anticuerpo se une al dominio extracelular de un correceptor de R-espondina o
- (ii) a anticuerpos donde una parte del anticuerpo se une al dominio extracelular de RNF43 y la otra parte del anticuerpo se une al dominio extracelular de un correceptor de R-espondina.

R-espondina. Las proteínas R-espondinas (RSPO1-4) son una familia de moléculas secretadas que fomentan en gran medida la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina y la señalización de Wnt/PCP. Kazanskaya O *et al.* "R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis". *Dev. Cell* 7, 525-534 (2004); Kim KA *et al.*, "Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium". *Science* 309, 1256-1259 (2005); Kim KA, "R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism". *Mol. Biol. Cell* 19, 2588-2596 (2008); Ohkawara B, Glinka A y Niehrs C, "Rspo3 binds syndecan 4 and induces Wnt/PCP signaling via clathrin-mediated endocytosis to promote morphogenesis". *Dev. Cell* 20, 303-314 (2011); Kamata T *et al.*, "R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants". *Biochim. Biophys. Acta* 1676, 51-62 (2004); Nam JS., Turcotte TJ y Yoon JK, "Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development". *Gene Expr. Patterns* 7, 306-312 (2007); Aoki M *et al.*, "R-spondin3 is required for mouse placental development". *Dev. Biol.* 301, 218-226 (2007); Blaydon DC *et al.*, "The gene encoding R-spondin 4 (RSPO4), a secreted protein implicated in Wnt signaling, is mutated in inherited onychia". *Nat. Genet.* 38, 1245-1247 (2006); Kazanskaya O. *et al.* "The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development". *Development* 135, 3655-3664 (2008); Parma P *et al.*, "R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy". *Nat. Genet.* 38, 1304-1309 (2006). Las R-espondinas son coexpresadas o inducidas por Wnt y están involucradas en el patrón y la diferenciación de tejidos.

La Rspo1 se expresa en las células de Paneth de las criptas intestinales, que forman el nicho de las células madre Lgr5+. La RSPO1 estimula la proliferación de las células madre de las criptas y protege a los ratones de la mucositis inducida por la quimioterapia. Zhao J *et al.* "R-Spondin1 protects mice from chemotherapy or radiation-induced oral mucositis through the canonical Wnt/beta-catenin pathway". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 2331-2336 (2009).

5 Por consiguiente, la invención proporciona anticuerpos que se unen al dominio extracelular de ZNRF3 y RNF43 que bloquean la interacción entre la R-espondina y ZNRF3 o RNF43. Tales anticuerpos se pueden formular en un portador farmacéuticamente aceptable. Tales anticuerpos bloquearán la señalización de Wnt estimulada por la R-espondina y se pueden utilizar para afecciones que se beneficiarán de los inhibidores de Wnt. Tales afecciones incluyen, sin carácter limitante, varios tipos de cáncer, esclerosteosis, fibrosis pulmonar idiopática, hipertrofia cardíaca.

10 Además, la divulgación proporciona el dominio extracelular de ZNRF3 y RNF43. Estos dominios extracelulares se pueden administrar para conseguir un efecto terapéutico, ya que estas proteínas se unirán a la R-espondina que circula en los tejidos para inhibir la señalización de la R-espondina. El dominio extracelular administrado de ZNRF3 o RNF43 actúa como un pseudorreceptor. Tales proteínas administradas se pueden formular en un portador farmacéuticamente aceptable. Tales proteínas administradas bloquearán la señalización de Wnt estimulada por la R-espondina y se pueden utilizar para afecciones que se beneficiarán de los inhibidores de Wnt. Tales afecciones incluyen, sin carácter limitante, varios tipos de cáncer, esclerosteosis, fibrosis pulmonar idiopática, hipertrofia cardíaca.

15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente al dominio extracelular de una ubiquitina ligasa E3 de transmembrana, donde:
- (a) la ubiquitina ligasa E3 de transmembrana se selecciona del grupo constituido por ZNRF3 y RNF43; y
- 10 (b) la unión del anticuerpo al dominio extracelular de la ubiquitina ligasa E3 de transmembrana, donde la ubiquitina ligasa E3 de transmembrana se encuentra sobre la superficie de una célula eucariota, incrementa la señalización canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina en la célula eucariota, para su uso como medicamento, donde el incremento de la señalización canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina se detecta en un ensayo *in vitro*.
- 15 2. El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el medicamento se utiliza para tratar una enfermedad seleccionada del grupo constituido por osteoporosis, fractura ósea, diabetes, enfermedad neurodegenerativa o curación de heridas.
- 20 3. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente al dominio extracelular de una ubiquitina ligasa E3 de transmembrana, donde:
- la ubiquitina ligasa E3 de transmembrana se selecciona del grupo constituido por ZNRF3 y RNF43; y
- 25 la unión del anticuerpo al dominio extracelular de la ubiquitina ligasa E3 de transmembrana, donde la ubiquitina ligasa E3 de transmembrana se encuentra sobre la superficie de una célula eucariota, incrementa la señalización de Wnt en la célula eucariota; y donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo constituido por
- (a) uno o más polipéptidos que tienen seis regiones, que comprenden:
- 30 (i) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 31; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 32 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 33; y
- 35 (ii) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 34; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 35 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 36; y
- 40 (b) uno o más polipéptidos que tienen seis regiones, que comprenden:
- (i) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 37; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 38 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 39; y
- 45 (ii) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 40; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 41 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 42; y
- 50 (c) uno o más polipéptidos que tienen seis regiones, que comprenden:
- (i) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 43; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 44 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 45; y
- 55 (ii) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 46; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 47 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 48; y
- 60

- (d) uno o más polipéptidos que tienen seis regiones, que comprenden:
- (i) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 49; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 50 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 51; y
- (ii) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 52; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 53 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 54; y
- (e) uno o más polipéptidos que tienen seis regiones, que comprenden:
- (i) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 55; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 56 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 57; y
- (ii) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 58; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 59 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 60; y
- (f) uno o más polipéptidos que tienen seis regiones, que comprenden:
- (i) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 61; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 62 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 63; y
- (ii) tres regiones desde el extremo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno hasta el extremo carboxilo: una primera región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 64; una segunda región que tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 65 y una tercera región que tiene una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 66.
4. El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 3, donde la secuencia peptídica del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno tiene al menos un 95% de identidad secuencial respecto a una secuencia seleccionada del grupo constituido por
- (a) SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4;
- (b) SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
5. El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 4, que comprende:
- (a) la secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 3 y la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4; o
- (b) la secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6.
6. El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende:
- (a) la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 88 y la secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 87; o
- (b) la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 90 y la secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 89.
7. El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 3-6, para su uso como medicamento.
8. El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde el medicamento se utiliza para tratar una enfermedad seleccionada del grupo constituido por osteoporosis, fractura ósea, diabetes, enfermedad neurodegenerativa o curación de heridas.

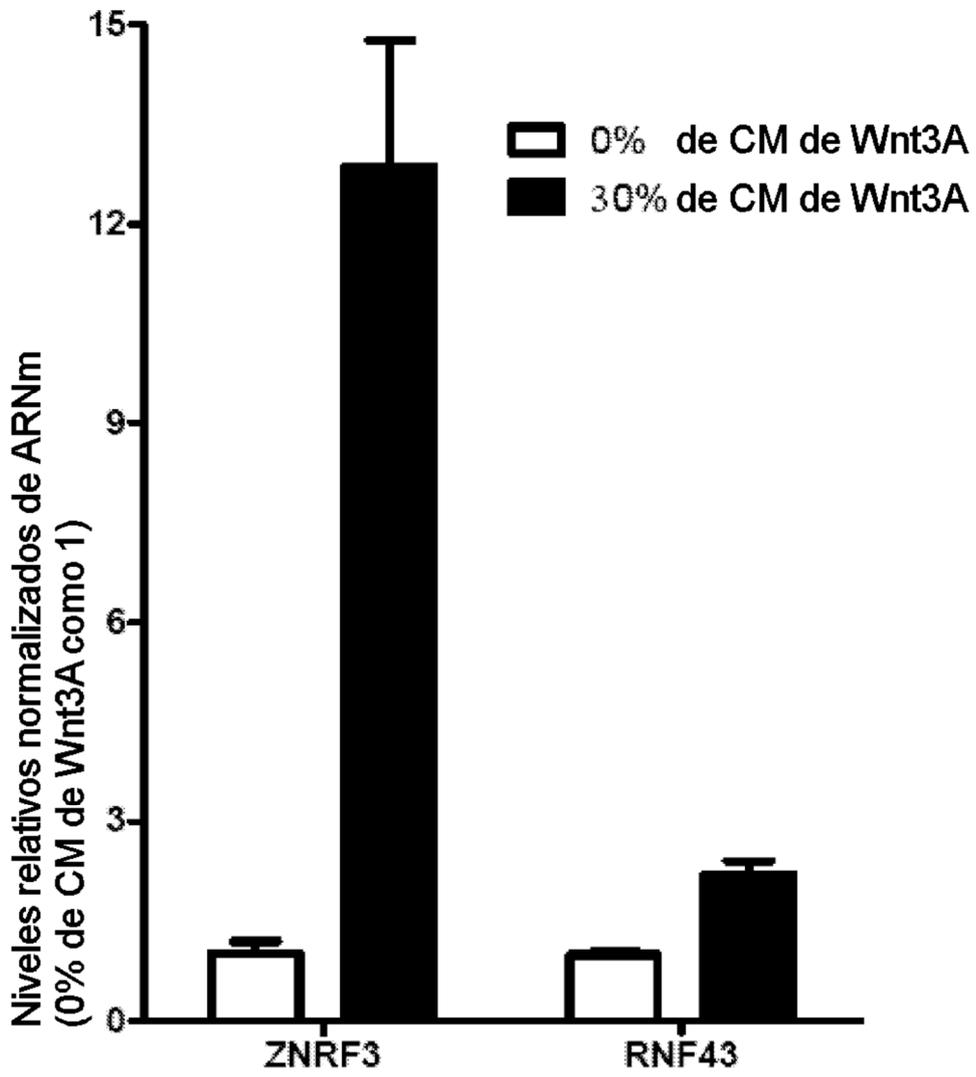


FIG. 1

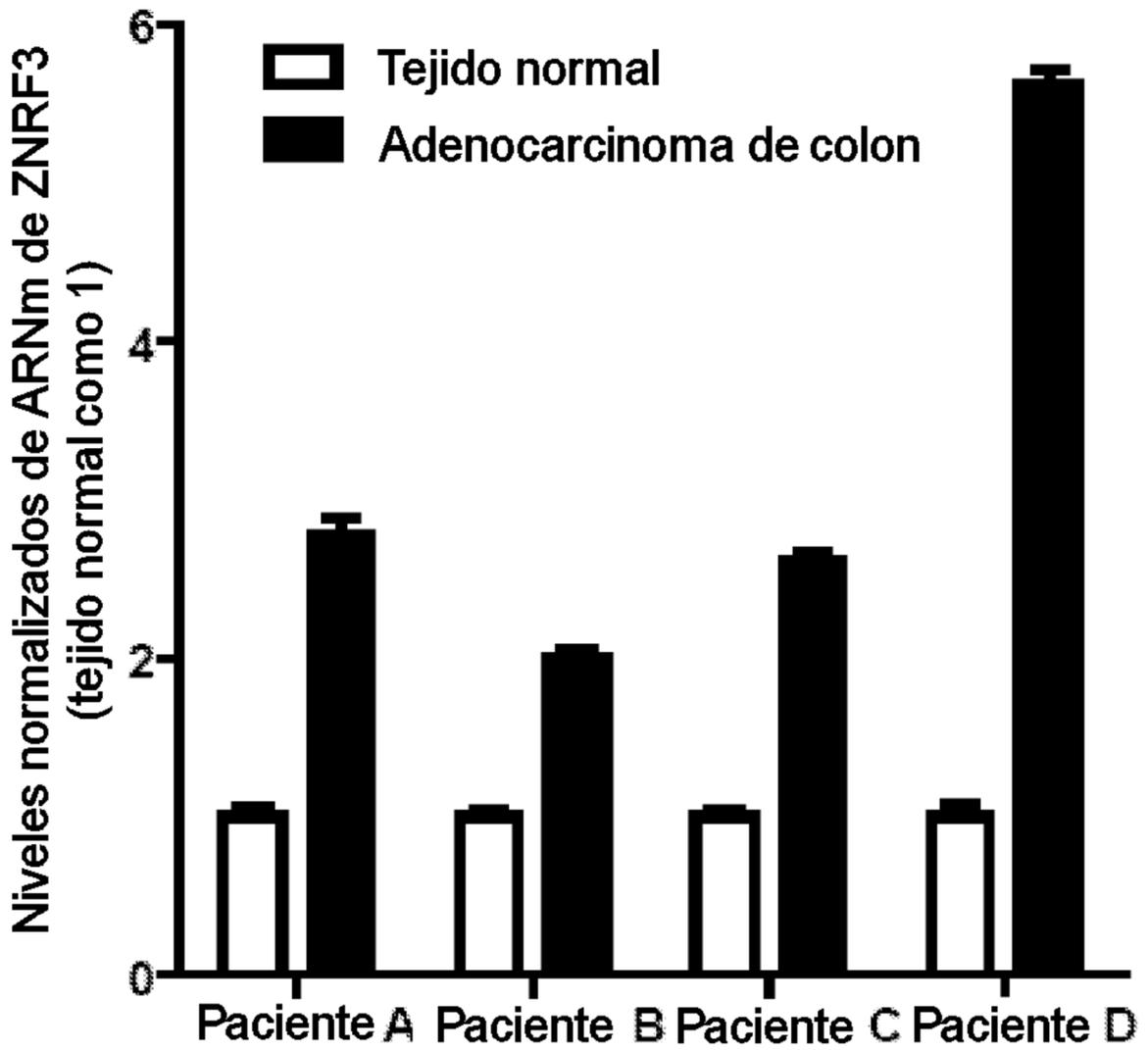


FIG. 2A

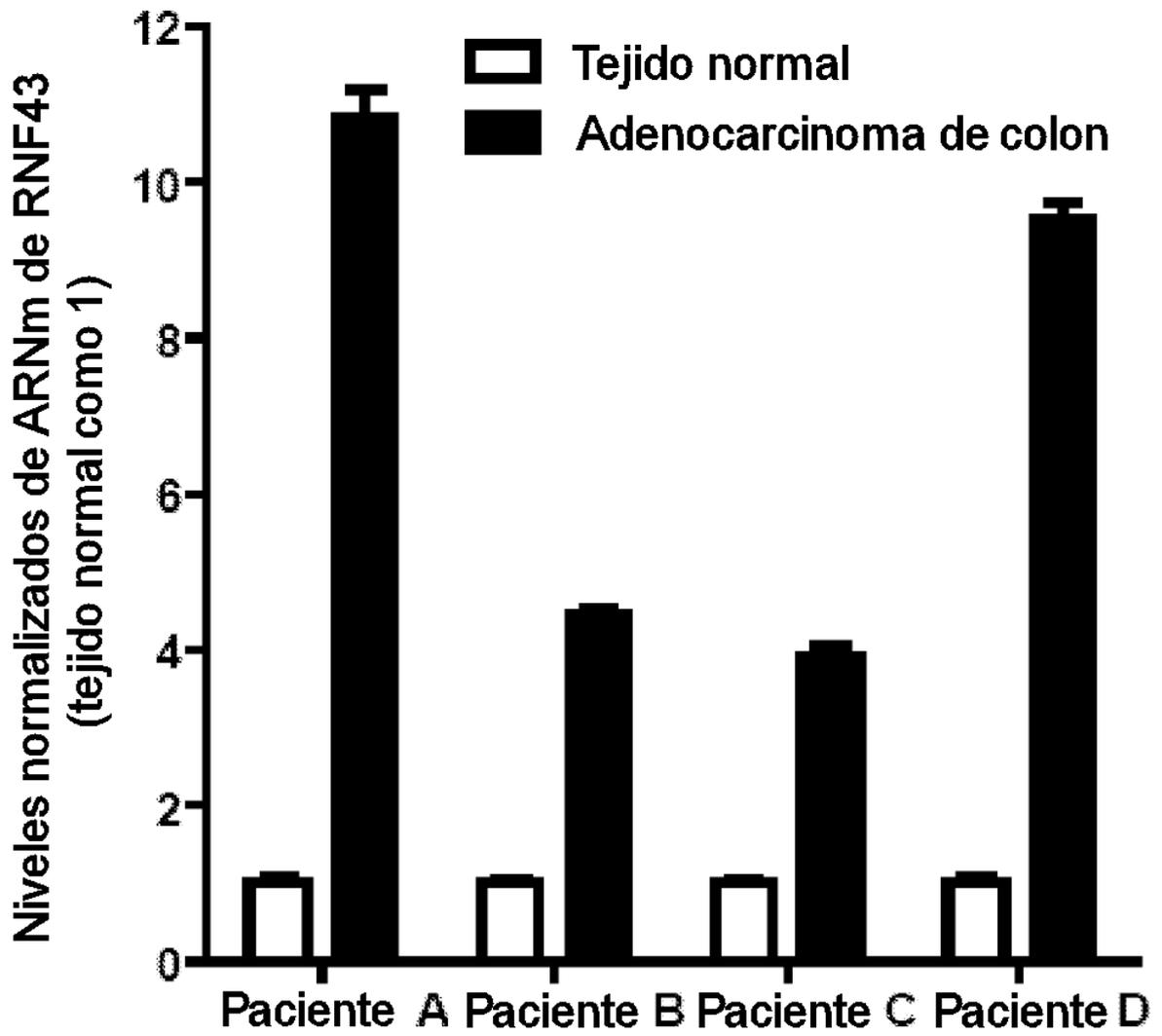


FIG. 2B

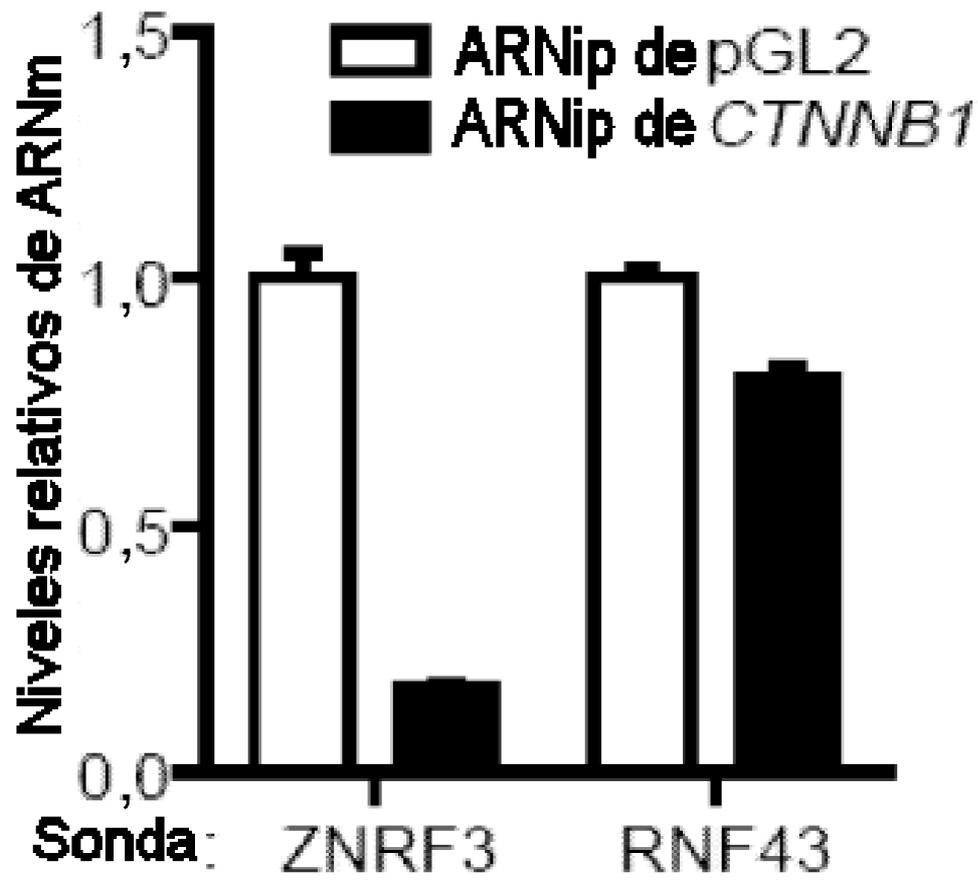


FIG. 3

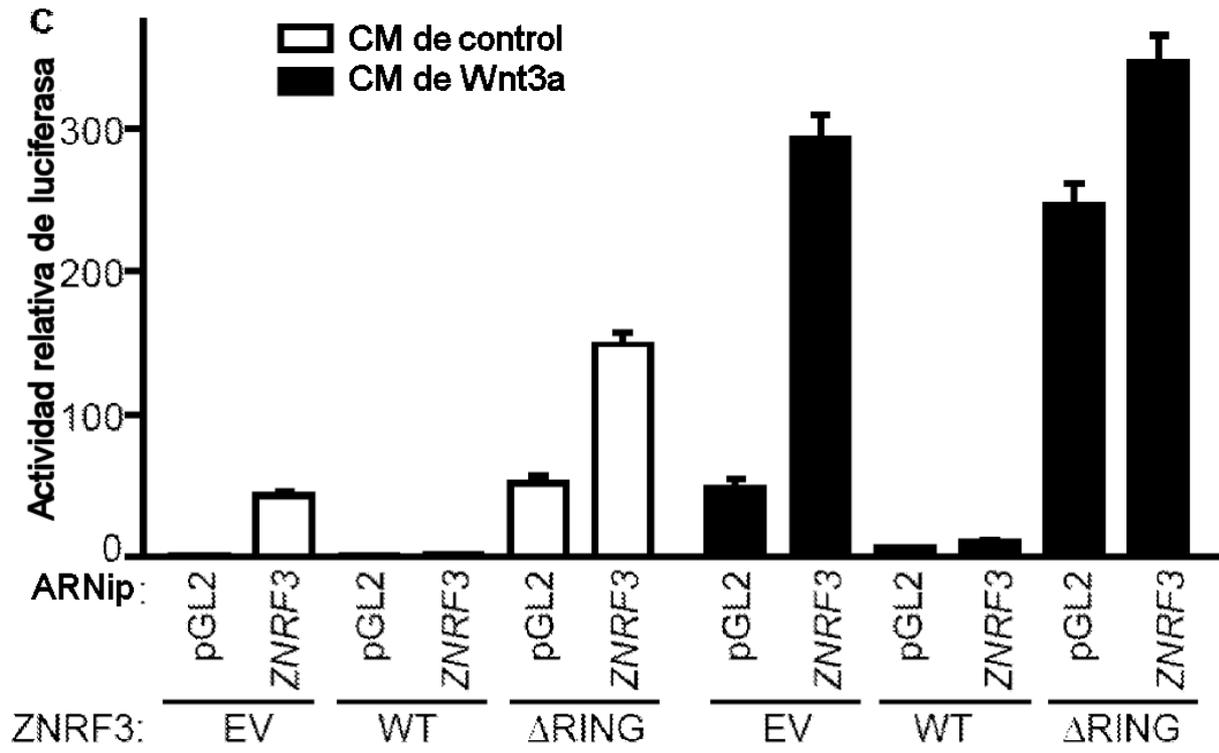


FIG. 4

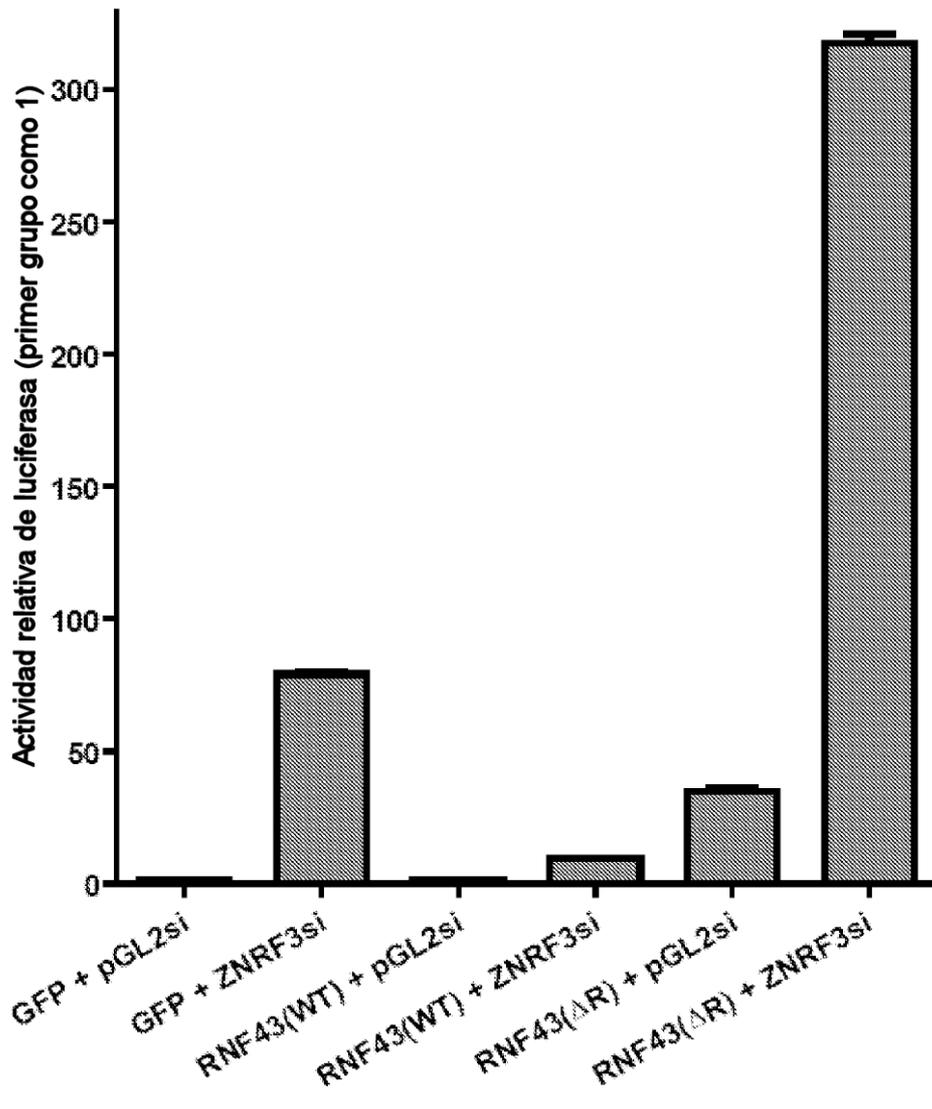


FIG. 5

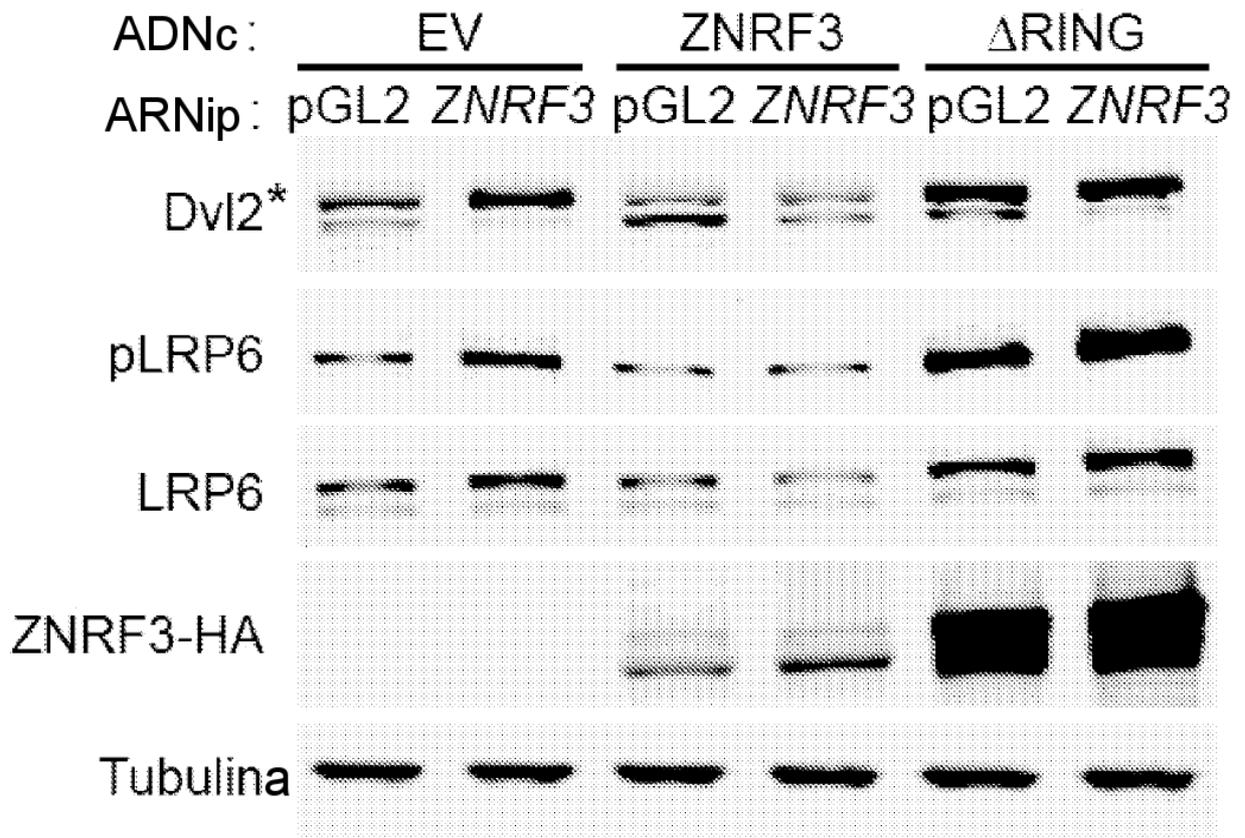


FIG. 6

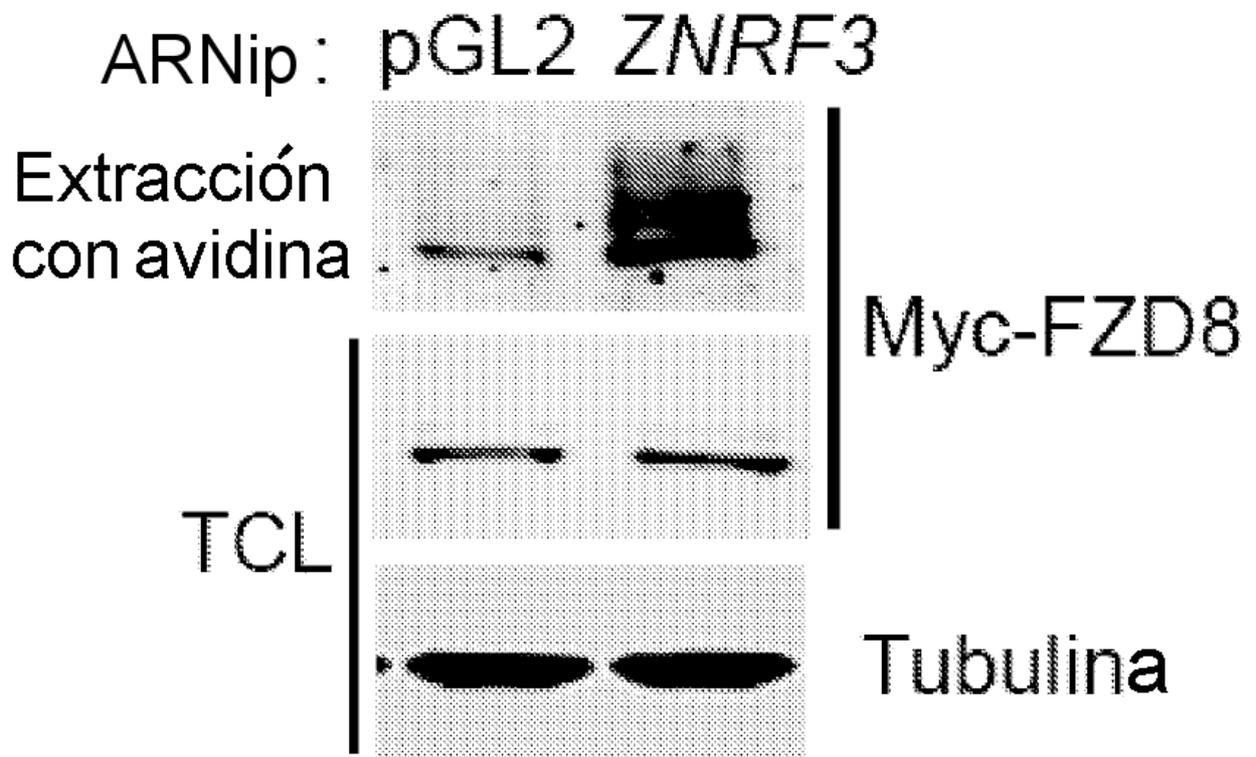


FIG. 7

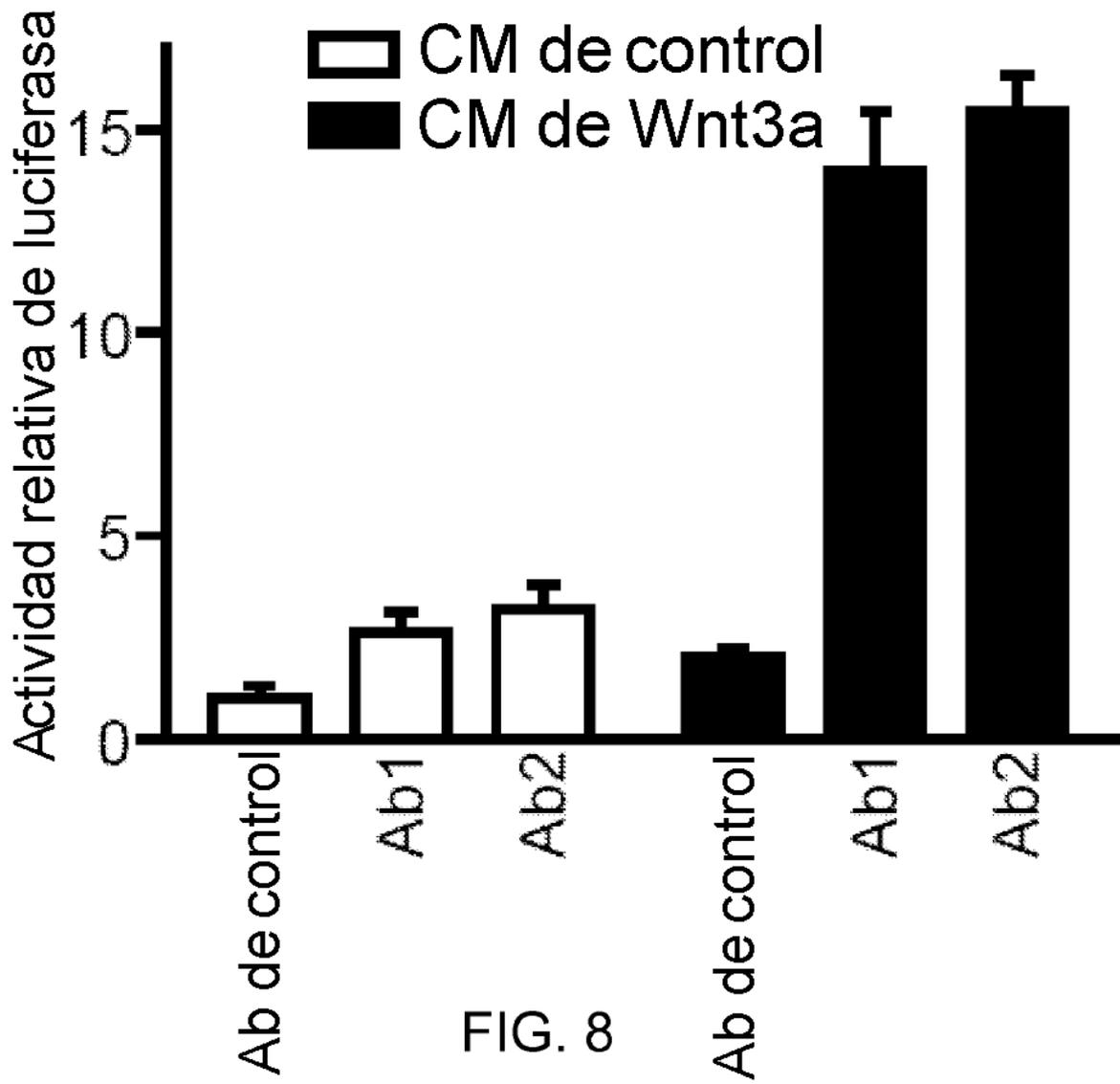


FIG. 8

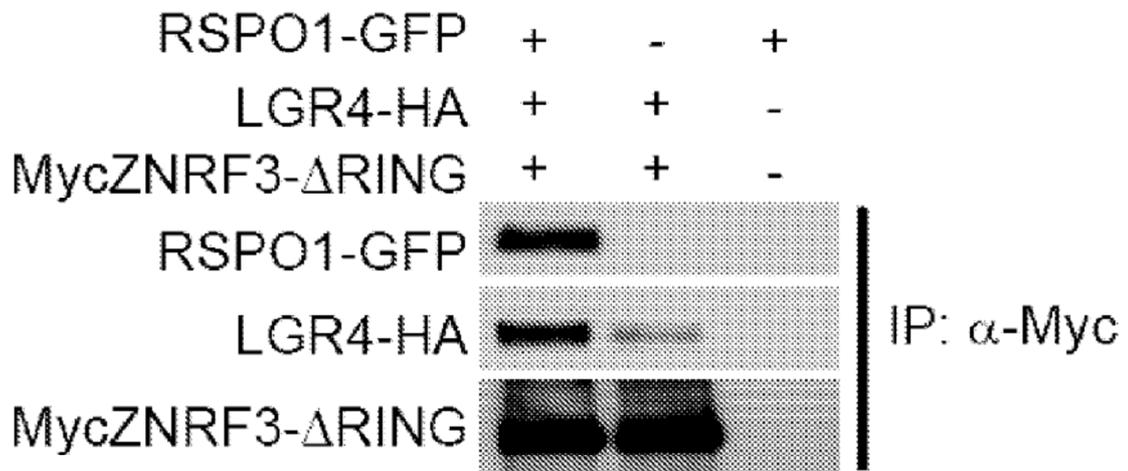


FIG. 9

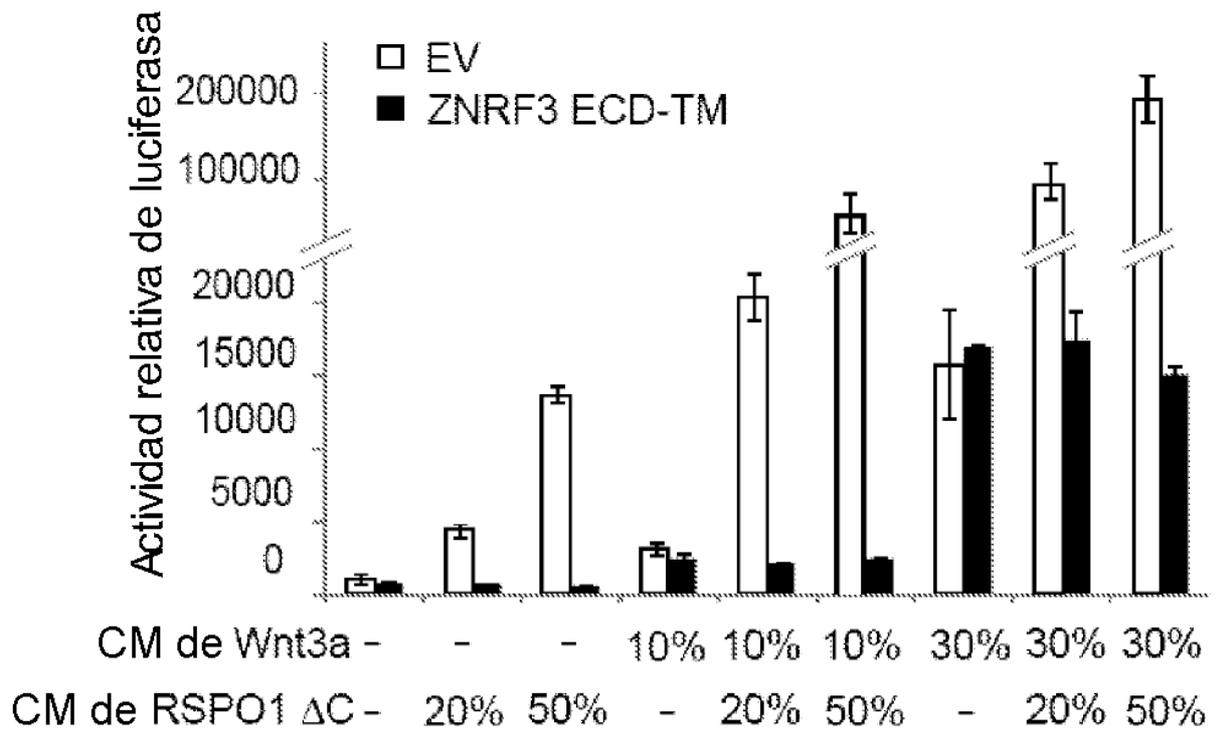


FIG. 10

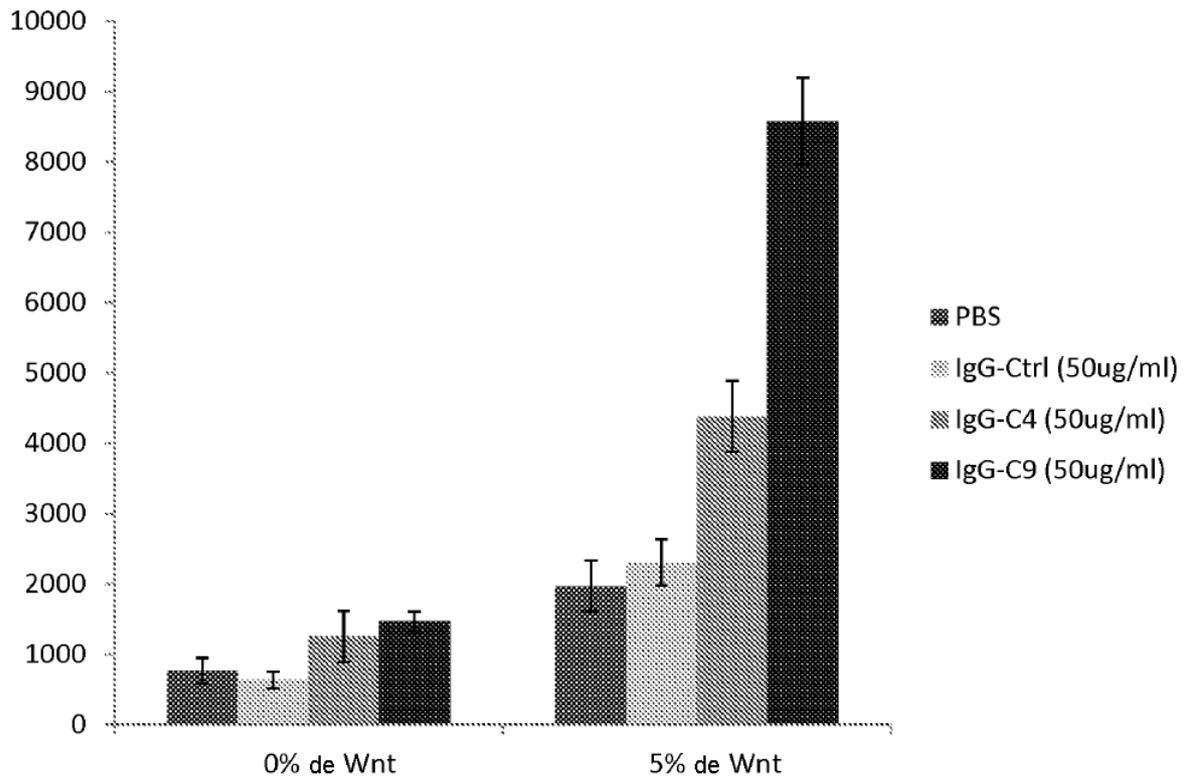


FIG. 11