



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 334 092**

② Número de solicitud: 200802023

⑤ Int. Cl.:  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**A61P 35/04** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **02.07.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **04.03.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**04.03.2010**

⑰ Solicitante/s:  
**PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.**  
**c/ Etxesakan, 28 - Oficina 5 - Planta Baja**  
**31180 Cizur Mayor, Navarra, ES**

⑱ Inventor/es: **Qian, Cheng;**  
**Hu, Jie;**  
**Dong, Aiwen;**  
**Fernández Ruiz, Verónica y**  
**Prieto Valtueña, Jesús**

⑳ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑳ Título: **Agentes antiangiogénicos.**

㉑ Resumen:

Agentes antiangiogénicos.

La invención se refiere a composiciones terapéuticas y kits que comprenden (i) al menos, dos antagonistas de Wnt diferentes o dos polinucleótidos comprendiendo cada uno de ellos una secuencia de nucleótidos que codifica un antagonista de Wnt diferente (o vectores o células conteniendo dichos polinucleótidos), o (ii) un primer antagonista de Wnt y un polinucleótido que codifica un segundo antagonista de Wnt. Asimismo, la invención también se relaciona con el uso de dichas composiciones y kits para el tratamiento del cáncer y, más específicamente, para el tratamiento de enfermedades asociadas con una angiogénesis no deseada.

ES 2 334 092 A1

## DESCRIPCIÓN

Agentes antiangiogénicos.

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se refiere a composiciones terapéuticas que comprenden antagonistas de Wnt, además de su uso para el tratamiento del cáncer y, más específicamente para el tratamiento de enfermedades asociadas con una angiogénesis no deseada.

10

**Antecedentes**

Actualmente, los tratamientos comunes para el cáncer, tales como quimioterapia, cirugía, radioterapia y terapia celular, tienen limitaciones con respecto a su eficiencia y toxicidad. Hasta ahora, estas soluciones han dado lugar a diferentes niveles de éxito dependiendo del tipo de cáncer, salud del paciente, fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico, etc.

15

Las proteínas Wnt se han agrupado en dos clases (canónicas y no canónicas) basándose en su actividad en líneas celulares o ensayos *in vivo*. La ruta canónica regula la determinación del destino celular y la formación del eje principal, la ruta no canónica regula los movimientos celulares y la determinación del destino celular. La  $\beta$ -catenina es un componente crucial aguas abajo de la ruta de señalización de Wnt. Cuando participa la señalización de Wnt, las proteínas adenomatosis poliposis coli (APC) y Axin ya no se unen a  $\beta$ -catenina, con la consiguiente estabilización de  $\beta$ -catenina y translocación al núcleo en el que se asocia con la familia del factor de células T (TCF) de los factores de transcripción. Este complejo del factor de transcripción transactiva un huésped de genes diana que domina procesos relevantes para el cáncer que incluyen *MYC* y *ciclina D1*. Los inhibidores de Wnt también pueden dividirse en dos clases, la clase sFRP y la clase Dickkopf (DKK). Los miembros de la clase sFRP, que incluye la familia sFRP, Wif1 y Cerberus, se unen directamente a proteínas Wnt, alterándose así su capacidad para unirse al complejo del receptor de Wnt; los miembros de la clase Dickkopf, que comprenden ciertas proteínas de la familia Dickkopf, inhiben la señalización de Wnt uniéndose al componente de LRP del complejo del receptor de Wnt. Por tanto, en teoría, aquellos antagonistas de la clase sFRP inhibirán tanto rutas canónicas como no canónicas, mientras que aquellos de la clase Dickkopf inhiben específicamente la ruta canónica. El aumento de expresión de los ligandos de Wnt y sus receptores (frizzled o LRP5/6), la pérdida de su inhibidor (tal como sFPR, Wif o DKK), la inactivación del sistema de destrucción y mutaciones de  $\beta$ -catenina llevarán a la activación anómala de la señalización de Wnt en carcinoma hepatocelular (CHC). La activación anómala de la ruta de Wnt como resultado del aumento de la formación del complejo Wnt-Fzd puede ser el acontecimiento más precoz en CHC. De esta forma, el uso de antagonistas de proteína Wnt puede tener un efecto en la inhibición del crecimiento de células tumorales.

20

25

30

35

Hay varios documentos en el estado de la técnica que describen procedimientos para tratar cáncer usando el antagonista de Wnt. Por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO05112988 describe un procedimiento para inhibir la proliferación de una célula cancerosa que subexpresa Wif1 o para inducir la apoptosis de dichas células cancerosas o para inhibir que Wnt señalice las células cancerosas. Lin y *col.* (Hum Gene Ther, 2007, vol. 18: 379-386) describen que la señalización de Wnt se activa en células de carcinoma nasofaríngeo y que el bloqueo de los miembros de la ruta de Wnt tales como Wnt y el reestablecimiento de la expresión de Wif1 son dianas potenciales para el tratamiento anticanceroso.

40

45

Además, pruebas recientes sugieren que los antagonistas de Wnt también pueden tener una función inhibidora en la angiogénesis. Esto abre la posibilidad de usar antagonistas de Wnt tanto como agentes anticancerígenos mejorados debido a que pueden inhibir simultáneamente la proliferación de células cancerosas y la neovascularización de tejidos tumorales como para el tratamiento de enfermedades asociadas con angiogénesis no deseada.

50

La solicitud de patente internacional WO2007115376 describe el uso de sFRP-4 y variantes funcionales de la misma como agentes antiangiogénicos, además de procedimientos para tratar y seleccionar procedimientos usando dicha sFRP-4 y variantes funcionales de la misma.

55

Ezan y *col.* (Cardiovascular Res, 2004, vol. 63: 731-738) describen la capacidad de sFRP1 (llamada Frz) para retrasar la fase G1 y entrar en la fase S de cultivos de células endoteliales de vena umbilical humana y de células de músculo liso. Además, este documento también describe la capacidad de adenovirus que codifican sFRP1 para inhibir *in vivo* la revascularización en un modelo experimental de angiogénesis de isquemia.

60

Klein y *col.* (Hepatology, 2008, vol. 47: 1018-1031) describen la capacidad de sFRP1 para inhibir la proliferación de células endoteliales hepáticas no sinusoidales (HSEC) y de sFRP1 y Wif1 para inhibir la formación de tubos *in vitro* de HSEC sobre Matrigel.

65

La solicitud de patente internacional WO2007030658 describe composiciones (que comprenden agentes que son combinaciones de un componente estimulante de la ruta de Wnt y un componente represor de la ruta de Tie2) y procedimientos para tratar sujetos con trastornos caracterizados por crecimiento anómalo de células endoteliales vasculares.

Por consiguiente, los inhibidores de Wnt naturales pueden usarse directamente en la terapia del cáncer y enfermedades asociadas con angiogénesis no deseada. Sin embargo, la administración de antagonistas de Wnt recombinantes usando vectores virales lleva a niveles de expresión muy bajos ya que las proteínas se eliminan rápidamente del cuerpo. Esto da como resultado que la administración deba llevarse a cabo regularmente.

5

Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de más composiciones antiangiogénicas basadas en antagonistas de Wnt que tienen actividad mejorada.

### Breve descripción de la invención

10

En un primer aspecto, la invención se refiere a una composición o kit que comprende:

- a) al menos dos antagonistas de Wnt diferentes,
- 15 b) al menos dos polinucleótidos comprendiendo cada uno una secuencia de nucleótidos que codifica un antagonista de Wnt diferente;
- c) un primer antagonista de Wnt y un polinucleótido que codifica un segundo antagonista de Wnt;
- 20 d) al menos dos vectores comprendiendo cada uno un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antagonista de Wnt diferente o
- e) una célula que comprende los polinucleótidos como se definen en (b) o los vectores como se definen en (d).

25 En otros aspectos la invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos dos antagonistas de Wnt diferentes, a un vector que comprende dicho polinucleótido y a una célula huésped que comprende dicho polinucleótido o dicho vector.

30 En otro aspecto la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención o una célula de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 En otros aspectos la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención o una célula de la invención para uso como medicamento o para el tratamiento de enfermedades asociadas con una angiogénesis no deseada o cáncer, preferentemente, carcinoma hepatocelular (CHC).

### Breve descripción de las figuras

40 La figura 1A es un diagrama esquemático de proteínas de fusión sFRP1-Fc y Wif1-Fc. El extremo carboxi de sFRP1 o Wif1 está unido mediante un conector de cinco aminoácidos a los extremos amino de los dominios de Fc de IgG1. Se indican las regiones Hinge (H) y CH2, CH3 de los dominios de IgG1. Las proteínas de fusión son dimericas debido a enlaces disulfuro (S=S) que se forman entre residuos de cisteína localizados en la región Hinge de IgG1. La figura 1B es un análisis de SDS-PAGE de proteínas de fusión sFRP1-Fc y Wif1-Fc purificadas. Carril 1, patrones de peso molecular; carril 2, sFRP1-Fc reducida; carril 3, Wif1-Fc reducida; carril 4, sFRP1-Fc no reducida; carril 5, Wif1-Fc no reducida. La figura 1C es una transferencia de Western que confirma que los pesos moleculares de estos dos tipos de proteína eran aproximadamente 80 kD; carril 1, sFRP1-Fc reducida; carril 2, Wif1-Fc no reducida; carril 3, sFRP1-Fc no reducida; carril 4, WIF1-Fc no reducida.

50 La figura 2 muestra el resultado de un ensayo de efecto citopático realizado usando diferentes líneas de células cancerosas (PLC/PRF/5, Huh7, HepG2, HeLa, A549) y una línea celular de fibroblastos humanos normales (BJ) infectada con Ad-SFRP1-Fc y Ad-WIF1-Fc, por separado o en combinación, en una gran multiplicidad de infecciones. A MOI 5, el crecimiento de células Huh7 y HepG2 se inhibió tanto por Ad-WIF1-Fc como Ad-SFRP1-Fc. El tratamiento combinado de estos tipos de células con Ad-SFRP1-Fc y Ad-WIF1-Fc dio como resultado un efecto antiproliferativo sinérgico en Huh7, PLC/PRF/5 y HepG2. No se observó efecto inhibitor en células BJ y en células Hep3B, HeLa o A549.

55 La figura 3 es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de MMT realizado con diferentes líneas de células cancerosas (Huh7, PLC/PRF/5, HepG2 y Hep3B,) y en fibroblastos humanos normales (BJ). Según tinción con violeta cristal, los resultados del ensayo con MTT realizado a MOI 10 indicaron que las dos proteínas de fusión pueden inhibir el crecimiento de células PLC, Huh7 y HepG2. El efecto es más evidente a partir del tercer día de tratamiento y se observa al menos hasta el sexto día. La inhibición en la tasa de crecimiento fue del 10% en 3 días a aproximadamente el 50% en 6 días, mostrándose así que los dos tipos de proteínas de fusión tienen una función sinérgica en la inhibición del crecimiento celular. BJ: línea celular de fibroblastos humanos normales.

65 Las figuras 4A y 4B son diagramas de barras que muestran la capacidad de las diferentes líneas celulares (Huh7, HepG2, Hep3B y PLC) para segregar las proteínas de fusión de la invención (WIF1-Fc y SFRP1-Fc) después de infectarse con adenovirus recombinante. Los sobrenadantes de diferentes cultivos de líneas celulares infectados con dos tipos de adenovirus (Ad-Wif1-Fc o Ad-sFRP1-Fc) a MOI 10 se recogieron en el tercer día después de la infección.

## ES 2 334 092 A1

La cantidad de proteínas de fusión en los sobrenadantes se determinó con ELISA. La concentración de las proteínas de fusión fue superior a 400 ng/ml hasta 900 ng/ml en diferentes líneas celulares.

5 La figura 5A muestra el efecto de las diferentes proteínas de fusión de la invención en la proliferación celular como se determina mediante el ensayo de ELISA de BrdU. Dichas gráficas muestran que el crecimiento de las células Huh7 y HepG2 podría inhibirse mediante las dos proteínas de fusión diferentes y que el uso combinado de estas dos proteínas tuvo efecto sinérgico. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre grupos tratados con 1  $\mu\text{g/ml}$  y 10  $\mu\text{g/ml}$ . En células PLC, WIF1-Fc y SFRP1-Fc no tuvo efecto cuando se usaron solas, pero hubo efecto cuando se usaron en combinación. Hep3B y Hela no pudieron ser inhibidas por las proteínas de fusión. La figura 5B muestra el efecto de las diferentes proteínas de fusión de la invención en la señalización de Wnt como se mide usando la relación Top/Fop determinada usando indicadores de Wnt TOP y FOP flash. La señalización de Wnt determinada usando los indicadores TOP-flash y FOP-flash disminuyó enormemente en células Huh7, HepG2 y Hep3B tratadas con la proteína de fusión, pero no en células PLC y Hela.

15 La figura 6 es un diagrama de barras que muestra los resultados de un ensayo de apoptosis celular como se detectan mediante la determinación de actividades de caspasa 3 y caspasa 7. Ambas enzimas se activaron mediante WIF1-Fc o SFRP1-Fc en Huh7 y HepG2. La activación de caspasas aumentó tres veces en células Huh7 y dos veces en células HepG2. Las proteínas de fusión usadas solas no pudieron inducir apoptosis de células PLC, pero el uso combinado de ellas pudo activar caspasas. Este efecto podría controlarse mediante el inhibidor de caspasas Pan (Z-VAD-FMK). \* en comparación con el grupo de control de solución salina o Fc de IgG1  $P < 0,01$ , # en comparación con el grupo que usó Wif1-Fc o sFRP1-Fc solos  $P < 0,01$ .

25 La figura 7 muestra cuatro diagramas de barras que muestran los niveles de expresión de E2F1, Axin2, c-myc y ciclina D en células tratadas con las diferentes proteínas de fusión, la combinación de las mismas y solución salina o Fc de IgG1 como indicador. Los resultados mostraron que E2F1, ciclina D y c-myc se regularon significativamente por disminución en células infectadas con adenovirus, pero no se observó regulación significativa por disminución del gen de Axin2. Estos resultados sugieren que Axin2 se activó por otra señal diferente de la señalización de Wnt.

30 La figura 8A y 8B son gráficas que muestran la concentración de Wif1-Fc y rhWif1 *in vivo* (panel superior) y la concentración de sFRP1-Fc y rhFRP1 *in vivo* (panel inferior) en animales a los que se les administraron los adenovirus recombinantes Ad-Wif1-Fc ( $\diamond$ ) y Ad-sFRP1-Fc ( $\blacklozenge$ ) y con el Wif1-Fc recombinante humano ( $\bullet$ ), Wif1 ( $\square$ ), sFRP1-Fc ( $\blacktriangle$ ) y sFRP1 ( $\circ$ ). Los resultados muestran que la administración de proteínas recombinantes y Ad-Wif1-Fc da como resultado un aumento en la concentración en suero de las proteínas recombinantes aunque con diferentes cinéticas. Por tanto, cuando a los animales se les inyectó Ad-Wif1-Fc, la proteína de fusión recombinante alcanzó niveles máximos en suero a las 10 h después de la inyección, siendo indetectable a las 14 h después de la inyección. A diferencia, la administración de Wif1-Fc llevó a niveles máximos en suero a las 6 h después de la inyección, siendo indetectable a las 12 h y la administración de rhWif1 llevó a la aparición de niveles máximos en suero a las 2 h después de la inyección, siendo indetectable a las 6 h. En los ratones a los que se les administraron los diferentes compuestos de sFRP1 el resultado mostró que la inyección de Ad-sFRP1-Fc llevó a niveles máximos en suero de sFRP1-Fc a los 6 d después de la inyección, siendo la proteína indetectable a las 3 semanas después de la inyección. A diferencia, la administración de sFRP1-Fc dio como resultado niveles máximos en suero a las 24 h, siendo indetectable a los 6 d después de la inyección. Similarmente, la administración de rhFRP1 (sin Fc) llevó a niveles máximos en suero a los 30 min, siendo indetectable a las 24 después de la inyección.

45 La figura 9 es un diagrama de barras que muestra la toxicidad en el hígado producida por diferentes proteínas recombinantes como se determina midiendo los niveles en suero de alanina transaminasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST). Los niveles de AST y ALT fueron inferiores a 550 unidades/l, que se consideraron en el intervalo normal.

50 La figura 10 es una gráfica que muestra la reducción del crecimiento tumoral en respuesta a los diferentes adenovirus recombinantes. El tamaño del tumor se controló durante 4 semanas revelando que el crecimiento tumoral podía detenerse en aquellos animales que habían recibido Ad-sFRP1-Fc y Ad-Wif1-Fc. El tamaño del tumor se redujo en gran parte en ratones a los que se les administraron los dos adenovirus (Ad-sFRP1-Fc y Ad-Wif1-Fc). Sin embargo, no se observó reducción del crecimiento tumoral en los grupos de control de Ad-GFP o solución salina. Sin embargo, después de 2 semanas los tumores reanudaron el crecimiento.

55 La figura 11 es una gráfica que muestra la supervivencia en porcentaje como una función del tiempo en un modelo de cáncer de hígado ortotópico. La mortalidad inicial en los grupos tratados con solución salina y Ad-GFP se observó, respectivamente, en el día 41 día y en el día 43, mientras que la mortalidad inicial en los grupos de Ad-sFRP1-Fc y Ad-Wif1-Fc fue en el día 50 y 52, respectivamente, y para el grupo combinado usando Ad-Wif1-Fc y Ad-sFRP1-Fc la primera mortalidad fue en el día 58. Las medianas de supervivencias fueron 51 y 51,5 días para los grupos de solución salina y Ad-GFP, respectivamente, en comparación con una mediana de supervivencia de 60,5 y 59,5 días en ratones tratados, respectivamente, con Ad-Wif1-Fc o Ad-sFRP1-Fc. En ratones tratados con la combinación de adenovirus la mediana de supervivencia fue 70 días.

65 La figura 12 es una foto que está constituida por cuatro imágenes que muestran el resultado del ensayo de Tunel. El número de células apoptóticas fue aproximadamente el 10% de células tratadas con el grupo Ad-WIF1-Fc o Ad-SFRP1-Fc. En las muestras tratadas con la combinación de adenovirus, el número de células apoptóticas aumentó al 22%, mientras que en el grupo tratado con Ad-GFP las células apoptóticas fueron el 1,5%.

La figura 13 es una foto que muestra una transferencia de Western de muestras de proteínas aisladas de tumores tratados con solución salina, Ad-GFP, Ad-Wif1-Fc, Ad-sFRP1-Fc y la combinación de Ad-Wif1-Fc y Ad-sFRP1-Fc y se investigaron con anticuerpos específicos para Wif-1, sFRP,  $\beta$ -catenina, GAPDH, pre-caspasa 3 y caspasa 3 activa. La transferencia de Western mostró niveles de expresión de Wif1-Fc o sFRP1-Fc en tejido tumoral infectado con adenovirus (Ad-Wif1-Fc o Ad-sFRP1-Fc correspondientemente). La  $\beta$ -catenina disminuyó en tumores tratados y la caspasa 3 se activó mediante Wif1-Fc o sFRP1-Fc. Las dos proteínas de fusión mostraron efecto sinérgico.

La figura 14 muestra la densidad de microvasos en el tumor por medio de inmunohistoquímica (figura 14A) o de análisis cuantitativo (figura 14B). En el grupo de control de Ad-GFP, el microvaso profundizó en el centro del tumor. Sin embargo, en grupos tratados con Ad-SFRP1-Fc o Ad-WIF1-Fc la densidad de vasos disminuyó enormemente. En el grupo de combinación, el microvaso sólo pudo localizarse alrededor del borde del tumor. El análisis cuantitativo demostró una reducción del 30,1%, 44,7% y 50,8% de la densidad de microvasos intratumorales en animales tratados, respectivamente, con Ad-WIF1-Fc, Ad-SFRP1-Fc o la combinación cuando se comparó con animales de control que recibieron Ad-GFP, respectivamente. \* en comparación con el grupo tratado con PBS y Ad-GFP  $P < 0,01$ , # en comparación con el grupo de Ad-Wif1-Fc y Ad-sFRP1-Fc  $P < 0,01$ .

La figura 15 muestra dos diagramas de barras que muestran los niveles de expresión de VEGF y SDF-1 en homogeneizados de tejidos tumorales (figuras 15A y 15B respectivamente). Los niveles de VEGF y SDF-1 disminuyeron en tumores tratados con Wif1-Fc y sFRP1-Fc en comparación con tumores tratados con PBS y Ad-GFP. Además, Wif1-Fc tuvo un efecto mayor en la disminución de los niveles de expresión de VEGF y SDF-1 que sFRP1-Fc en la inhibición de angiogénesis y cuando se usaron juntos tuvieron una función sinérgica.

La figura 16 muestra dos diagramas de barras que muestran, respectivamente, la formación de tubos (figura 16A) y la migración celular (figura 16B) de células HMVEC y EPC en respuesta al tratamiento con Fc de IgG1, WIF1-Fc, sFRP1-Fc y la combinación de WIF1-Fc y sFRP1-Fc. La formación de tubos de HMVEC disminuyó el 30% a 10  $\mu\text{g/ml}$  de las diferentes proteínas de fusión. La formación de tubos de EPC disminuyó aproximadamente el 50% a 10  $\mu\text{g/ml}$  de las diferentes proteínas de fusión. Se encontraron los mismos resultados en el experimento de migración.

La figura 17 muestra dos diagramas que muestran el efecto de Wif1 y sFRP1 en la prevención de la diferenciación de células EPC primarias respecto a células EPC maduras (A y C) y en la inducción de apoptosis de EPC inmaduras (B y D). Los resultados muestran que 48 horas después de la adición de proteínas Wif1 y sFRP1, el número de células EPC disminuyó aproximadamente el 50%. Además, tanto Wif1-Fc como sFRP1-Fc pueden inducir apoptosis de EPC. Sin embargo, no se observó función sinérgica cuando las dos proteínas de fusión se usaron en combinación.

### Descripción detallada de la invención

Los inventores de la presente invención han encontrado que la administración combinada de al menos dos antagonistas de una proteína Wnt (antagonistas de Wnt) induce una mayor apoptosis celular en células tumorales que la administración de cada antagonista solo. Además, los inventores también han encontrado que la administración combinada de dos antagonistas de Wnt da como resultado una mayor inhibición de la angiogénesis que el uso de cada uno de ellos individualmente. Estos resultados permiten el uso de la combinación de antagonistas de Wnt para el tratamiento del cáncer y de enfermedades asociadas con una angiogénesis no deseada.

Por tanto, en un primer aspecto la invención se refiere a una composición o kit que comprende:

- a) al menos dos antagonistas de Wnt diferentes,
- b) al menos dos polinucleótidos comprendiendo cada uno una secuencia de nucleótidos que codifica un antagonista de Wnt diferente,
- c) un primer antagonista de Wnt y un polinucleótido que codifica un segundo antagonista de Wnt;
- d) al menos dos vectores comprendiendo cada uno un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antagonista de Wnt diferente o
- e) una célula que comprende los polinucleótidos como se definen en (b) o los vectores como se definen en (d).

En el contexto de la presente invención, “un antagonista de Wnt” se entiende como cualquier compuesto que puede inhibir o suprimir la señalización mediada por una proteína Wnt. Una “proteína Wnt” o “Wnt” es un activador de la ruta de señalización de Wnt que puede unirse a un receptor de Frizzled con el fin de activar la señalización de Wnt. Ejemplos específicos de proteínas Wnt incluyen Wnt-1, Wnt-2, Wnt-2B (Wnt-13), Wnt-3, Wnt3a, Wnt-4, Wnt-5A, Wnt-5B, Wnt-6, Wnt-7A, Wnt-7B, Wnt-8A, Wnt-8B, Wnt-9A (Wnt-14), Wnt-9B (Wnt-15), Wnt-10A, Wnt-10B, Wnt-11, Wnt-16, etc.

Los antagonistas de Wnt adecuados para su uso en la presente invención comprenden tanto los antagonistas de la clase sFRP y los antagonistas de la clase Dickkopf (DKK). Los miembros de la clase sFRP, que incluye la familia

sFRP, Wif1 y Cerberus, se unen directamente a Wnt, alterándose así su capacidad para unirse al complejo del receptor de Wnt; los miembros de la clase Dickkopf, que comprende ciertas proteínas de la familia Dickkopf, inhiben la señalización de Wnt uniéndose al componente de LRP del complejo del receptor de Wnt.

- 5 Por tanto, en una realización particular, el antagonista de Wnt se selecciona del grupo de:
- a. un polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt y
  - 10 b. una proteína de fusión que comprende un primer resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt y un segundo resto de polipéptido.

15 En el contexto de la presente invención, “un polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt” o un “resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt” se entienden como un polipéptido que puede inhibir o suprimir la señalización de Wnt, es decir, que puede prevenir la transducción de señales provocadas por la interacción entre proteína Wnt y su receptor. Por tanto, en una realización particular, el polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt es un antagonista de Wnt de la clase sFRP que, en una realización más particular, es una proteína relacionada con frizzled soluble (sFRP) o una variante funcionalmente equivalente de la misma, o un factor 1 inhibidor de Wnt (Wif1) o una variante funcionalmente equivalente del mismo. Por “proteína relacionada con frizzled soluble (sFRP)” se entiende, en el contexto de la presente invención, los antagonistas descritos en la solicitud de patente internacional WO2008031009, que se incorpora a este documento como referencia, y que incluye, sin limitación, antagonistas tales como Frz8, Frz5, Frz1, Frz2, Frz3, Frz4, Frz6, Frz7, Frz9, Frz10, sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4, sFRP5, etc.

20 Un experto en la materia reconocerá que la presente invención no sólo se refiere a las secuencias de aminoácidos específicas de sFRP o Wif1, sino también a variantes de las mismas, específicamente a variantes funcionalmente equivalentes de las mismas tales como fragmentos, análogos y/o derivados. Por tanto, una variante de una secuencia de aminoácidos específicos conserva preferentemente al menos una función o actividad biológica de la secuencia de aminoácidos específicos, preferentemente la capacidad para inhibir o suprimir la señalización de Wnt.

25 En la presente invención, “variantes funcionalmente equivalentes” se entiende como cualquier polipéptido cuya secuencia puede obtenerse por inserción, sustitución o eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia original de la proteína [la orientación referente a qué cambios de aminoácidos son probables que sean fenotípicamente silenciosos puede encontrarse en Bowie, J. U., y col., (Science 1990, vol. 247:1306-1310)] y que conserva al menos parcialmente la capacidad para inhibir o suprimir la señalización celular de Wnt determinada, por ejemplo, mediante detección de la inhibición de la expresión de genes, conocidos por ser activados en respuesta a la señalización de Wnt (por ejemplo E2F1, ciclina D y C-myc) usando cualquier técnica habitual tal como RT-PCR. Si estos genes están significativamente regulados negativamente en células tratadas con las variantes candidatas, esto significa que la variante candidata probada ha antagonizado la señalización de Wnt y, por tanto, es una variante útil para usar en el contexto de la presente invención. Por otra parte, los ensayos de detección de indicadores TOP-flash y FOP-flash también pueden usarse adicionalmente para probar la inhibición de la señal de Wnt por las variantes que van a probarse. El plásmido indicador TOP-flash lleva un gen indicador de luciferasa bajo el control de una región sensible a factor de células T (TCF) activable por Wnt. El plásmido indicador FOP-flash lleva un gen indicador de luciferasa bajo el control de una región sensible a TCF mutado inactivo. En células con señalización de Wnt activa, el aumento de la expresión de luciferasa puede detectarse después de la transfección con plásmido indicador TOP-flash, pero no puede detectarse el aumento de la expresión de luciferasa después de la transfección con plásmido indicador FOP-flash. (Shin y col. Int. J. Cancer 2007;121:1028-1035).

30 Una variante funcionalmente equivalente puede ser: (i) una en la que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado) y tal residuo de aminoácido sustituido puede ser o puede no ser uno codificado por el código genético, o (ii) una en la que uno o más de los residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, o (iii) una en la que aminoácidos adicionales se fusionan a la secuencia de aminoácidos de sFRP o Wif1, etc. Tales fragmentos, derivados y análogos se consideran que están dentro del alcance de variantes funcionalmente equivalentes para los fines de la presente invención.

35 Los fragmentos según la presente invención puede ser aquellos que comprenden una secuencia de aminoácidos de sFRP o Wif1, pero carecen de una serie continua de residuos (es decir, una región, parte o porción continua) que incluye el extremo amino, o una serie continua de residuos que incluye el extremo carboxilo o, como en mutantes de doble truncamiento, deleción de dos series continuas de residuos, una que incluye el extremo amino y una que incluye el extremo carboxilo. De nuevo, estos mutantes de truncamiento conservan preferentemente al menos una actividad biológica del polipéptido completo. Los fragmentos o porciones de la secuencia de aminoácidos de sFRP o Wif1 pueden emplearse para producir el polipéptido correspondiente de longitud completa mediante síntesis de péptidos; por tanto, los fragmentos pueden emplearse como productos intermedios para producir los polipéptidos de longitud completa.

40 Las variantes según la invención tienen preferentemente una identidad de secuencias con dicha secuencia de aminoácidos de sFRP o Wif1 de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. El grado de identidad entre las variantes y el antagonista de la proteína

Wnt se determina usando algoritmos y procedimientos informáticos que son ampliamente conocidos para los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP [BLAST Manual, Altschul, S., y *col.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., y *col.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

5

Los expertos en la materia entienden que las mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica sFRP o Wif1 que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan su estructura global o su funcionalidad.

10

Según la presente invención, los antagonistas de Wnt también pueden ser una proteína de fusión que comprende un primer resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt y un segundo resto de polipéptido, preferentemente, un resto de polipéptido que confiere una propiedad ventajosa. En el contexto de la presente invención, una “proteína de fusión” se refiere a un polipéptido que tiene al menos dos porciones covalentemente unidas juntas en el que cada una de las porciones se deriva de diferentes proteínas.

15

En el contexto de la presente invención, “un polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt” y “un resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt” tienen el mismo significado, es decir, un polipéptido que puede inhibir o suprimir la señalización de Wnt previniendo normalmente la transducción de la señal provocada por la interacción entre la proteína Wnt y su receptor. Por tanto, en una realización particular, el resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt es un antagonista de Wnt de la clase sFRP que, en una realización más particular, es una proteína relacionada con frizzled soluble (sFRP) o una variante funcionalmente equivalente de la misma, o un factor I inhibidor de Wnt (Wif1) o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

20

Moléculas o polipéptidos que pueden fusionarse al primer resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt son, por ejemplo, moléculas que facilitan la extracción y purificación de la proteína de fusión, tales como marcas (tags) de polihistidina (His-tags) (por ejemplo H6 y H10, etc.) u otras marcas para uso en sistemas IMAC, por ejemplo, columnas de afinidad de Ni<sup>2+</sup>, etc., fusiones de GST, fusiones de MBP, marcas de estreptavidina, la secuencia diana de biotilación de BSP de la enzima bacteriana BIRA y epítopos marca dirigidos por anticuerpos (por ejemplo marcas c-myc, marcas FLAG, entre otras). Como observará un experto en la materia, dicho péptido marca puede usarse para purificación, inspección, selección y/o visualización de la proteína de fusión de la invención. En una realización particular de la invención, dicha marca es una marca de detección y/o una marca de purificación. Además, también son marcas adecuadas restos fluorescentes, radiactivos o enzimáticos, además de la molécula que potencia la estabilidad en condiciones de ensayo tales como la unión de ADN o dominios de activación transcripcional del gen GAL4 y similares.

35

En una realización particular, el segundo resto de polipéptido de la proteína de fusión de la invención es un polipéptido que alarga la vida media en suero del resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt. Ejemplos de polipéptidos que alargan la vida media de una proteína en suero comprenden un componente de Fc derivado de una inmunoglobulina tal como IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, etc. En una realización más particular, el segundo resto de polipéptido es un fragmento Fc, preferentemente, un fragmento Fc de inmunoglobulina, más preferentemente un fragmento Fc de IgG.

40

El primer resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt puede conectarse a otros compuestos mediante procedimientos muy conocidos que incluyen espaciadores (linkers) bifuncionales, formación de un polipéptido de fusión y formación de complejos de biotina/estreptavidina o biotina/avidina mediante unión de o biotina o estreptavidina/avidina al segundo resto de polipéptido o la molécula complementaria. Dependiendo de la naturaleza de los grupos reactivos en el primer polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt y en el otro compuesto, un espaciador puede formarse permitiendo simultáneamente o secuencialmente que los grupos reactivos reaccionen entre sí. Por ejemplo, el agente seleccionado como diana puede prepararse con un grupo sulfhidrilo en, por ejemplo, el extremo carboxilo, que entonces se acopla a un agente de derivatización para formar una molécula portadora. A continuación, la molécula portadora se une mediante su grupo sulfhidrilo al péptido. Por otra parte, el enlace puede formarse permitiendo que los grupos reactivos de ambas moléculas (el primer resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt y el compuesto o segundo resto de polipéptido) formen un enlace, preferentemente covalente, usando químicas de acoplamiento conocidas para aquellos expertos en la materia. Pueden usarse numerosos procedimientos reconocidos en la técnica para formar un enlace covalente. Véase, por ejemplo, March, J., *Advanced Organic Chemistry*, 4ª ed., Nueva York, N.Y., Wiley and Sons, 1985, pág. 326-1120. Los expertos en la materia conocen muchos otros espaciadores posibles.

55

Preferentemente, los dos restos de la proteína de fusión pueden conectarse directamente mediante un enlace peptídico sencillo o mediante un espaciador peptídico que contiene uno o más residuos de aminoácidos. Generalmente, las dos porciones y el espaciador estarán en el marco de lectura el uno con el otro y se producen usando técnicas recombinantes. Por tanto, en una realización particular, el primer resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt y el segundo resto de polipéptido se conectan mediante un enlace peptídico sencillo o mediante un espaciador peptídico. Ejemplos ilustrativos no limitantes de espaciadores que van a usarse en el contexto de la presente invención son espaciadores peptídicos con una longitud de 2 o más aminoácidos seleccionados del grupo que está constituido por glicina, serina, alanina y treonina. En una realización preferida de la invención, dicho espaciador flexible es un conector de poli-glicina. Ejemplos posibles de espaciadores flexibles/secuencias espaciadoras incluyen SGGTSGSTSGTGST (SEQ ID N°: 27), AGSSTGSSTGPGSTT (SEQ ID N°: 28), GGSGGAP (SEQ ID N°: 29) (Muller, K. M., Arndt, K. M. y

60

65

## ES 2 334 092 A1

Alber, T., Meth. Enzymology, 2000, 328:261-281), GGGVEGGG (SEQ ID N°: 30) o GSGGS (SEQ ID N°:31). Ejemplos preferidos de péptidos espaciadores o conectores incluyen aquellos que se han usado para conectar proteínas sin perjudicar sustancialmente la función de las proteínas conectadas o al menos sin perjudicar sustancialmente la función de una de las proteínas conectadas. Más preferentemente, los conectores o espaciadores se han usado para conectar proteínas que comprenden estructuras de bobina enrollada.

El efecto de la región espaciadora es proporcionar espacio entre el primer resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt y el segundo polipéptido de la invención. Preferentemente, el espaciador es de naturaleza polipeptídica. El péptido espaciador comprende preferentemente al menos dos aminoácidos, tales como al menos tres aminoácidos, por ejemplo al menos cinco aminoácidos, tales como al menos diez aminoácidos, por ejemplo al menos 15 aminoácidos, tales como al menos 20 aminoácidos, por ejemplo al menos 30 aminoácidos, tales como al menos 40 aminoácidos, por ejemplo al menos 50 aminoácidos, tales como al menos 60 aminoácidos, por ejemplo al menos 70 aminoácidos, tales como al menos 80 aminoácidos, tales como al menos 90 aminoácidos, tales como aproximadamente 100 aminoácidos.

Si se desea es posible incluir un sitio de escisión proteolítico entre las porciones de la proteína de fusión para permitir la separación de secuencias de proteínas de fusión. En el caso de que la proteína de fusión presente actividad reducida, el espaciador entre los agentes puede seleccionarse para que sea suficientemente lábil (por ejemplo, para la escisión enzimática mediante una enzima presente en el tejido diana) de manera que se escinda fácilmente, liberándose así las moléculas libres de péptidos.

Por otra parte, la composición o kit de la invención puede comprender al menos dos polinucleótidos comprendiendo cada uno una secuencia de nucleótidos que codifica un antagonista de Wnt diferente, preferentemente dicha secuencia de nucleótidos codifica (i) un polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt o (ii) una proteína de fusión que comprende un primer resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt y un segundo resto de polipéptido. Previamente se han definido la naturaleza y las características del primer y segundo resto de polipéptido. Los expertos en la materia entienden que, si se requiere un espaciador entre los dos restos de polipéptidos de la proteína de fusión, es necesario introducir la secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho espaciador en el mismo marco de lectura abierto que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el primer y segundo resto de polipéptido. Adicionalmente, el polinucleótido puede comprender otros elementos comúnmente usados por el experto tales como policonectores, genes de selección, potenciadores, secuencias reguladoras, etc.

Adicionalmente, la composición o kit de la invención puede comprender al menos dos vectores comprendiendo cada uno un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antagonista de Wnt diferente. De nuevo, previamente se han explicado todas las características y tipos del antagonista de Wnt y polinucleótidos que codifican el mismo.

Vectores adecuados para alojar los polinucleótidos que forman las composiciones y kits de la invención incluyen un plásmido o un vector que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra o no se integra en el genoma de dicha célula. Dicho vector puede obtenerse mediante procedimientos convencionales conocidos por expertos en la materia y pueden encontrarse en, por ejemplo, Sambrook y *col.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, tercera edición, 2001.

Sin embargo, en el ámbito de la presente invención, el vector de la invención es preferentemente un vector viral o no viral adecuado para uso en terapia génica; a modo de una ilustración no limitante, dichos vectores pueden ser vectores virales basados en retrovirus, adenovirus, alfavirus, etc., o en el caso de vectores no virales los vectores pueden ser complejos de ADN-liposoma, ADN-polímero, ADN-polímero-liposoma, etc. [véase "Nonviral Vectors for Gene Therapy", editado por Huang, Hung y Wagner, Academic Press (1999)]. Dichos vectores virales y no virales que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un antagonista de Wnt pueden administrarse directamente al cuerpo humano o animal mediante procedimientos convencionales.

Los vectores virales pueden ser, por ejemplo, un alfavirus, tal como virus de Semliki Forest, Sindbis y encefalitis equina venezolana (EEV); un adenovirus de alta capacidad; un adenovirus condicionalmente replicativo o un virus adenoasociado. En una realización preferida, el/los polinucleótido/s según la invención está/están comprendido/s en un vector, preferentemente en un vector adenoviral.

Los vectores de la presente invención pueden contener secuencias reguladoras de la expresión precediendo al polinucleótido que están operativamente unidas a dicho polinucleótido, es decir, dicho polinucleótido está dentro del marco de lectura correcto para su expresión bajo el control de dichas secuencias reguladoras. Las secuencias reguladoras útiles para la presente invención pueden ser secuencias promotoras nucleares o, alternativamente, secuencias potenciadoras y/u otras secuencias reguladoras que aumentan la expresión de la secuencia de nucleótidos. El promotor puede ser constitutivo o inducible. Si se desea la expresión constante de la secuencia de nucleótidos, entonces se usa un promotor constitutivo. Ejemplos de promotores constitutivos muy conocidos incluyen el promotor inmediato temprano de citomegalovirus (CMV), el promotor del virus del sarcoma de Rous y similares. Varios otros ejemplos de promotores constitutivos son muy conocidos en la técnica y pueden usarse para implementar la invención. Si se desea la expresión controlada de la secuencia de nucleótidos, entonces debe usarse un promotor inducible. En un estado no inducido, el promotor inducible puede ser "silencioso". "Silencioso" se entiende que significa que en ausencia de un inductor se detecta poca o ninguna expresión de la secuencia de nucleótidos; sin embargo, en presencia de un induc-

tor se produce la expresión de la secuencia de nucleótidos. El nivel de expresión puede controlarse frecuentemente variando la concentración del inductor. Controlando la expresión, por ejemplo, variando la concentración del inductor de forma que un promotor inducible se estimule más fuertemente o débilmente, puede afectarse la concentración del producto transcrito de la secuencia de nucleótidos. En el caso de que la secuencia de nucleótidos codifique un gen, la cantidad de proteína sintetizada puede controlarse. Por tanto, es posible variar la concentración del producto terapéutico. Ejemplos de promotores inducibles muy conocidos son: un promotor sensible a andrógeno o estrógeno, un promotor sensible a doxiciclina, un promotor de metalotioneína o un promotor que responde a ecdisona. Otros diversos ejemplos son muy conocidos en la técnica y pueden usarse para implementar la invención. Además de promotores constitutivos e inducibles (que normalmente trabajan en una gran variedad de tipos de células o tejidos) pueden usarse promotores específicos para tejidos para conseguir la expresión específica de la secuencia de nucleótidos en células o tejidos. Ejemplos muy conocidos de promotores específicos para tejidos incluyen promotores específicos para hígado como los promotores de albúmina, alfa-1 antitripsina o hemopexina (Kramer y col., (2003), *Molecular Therapy* 7:375-385), varios promotores específicos para músculo que incluyen: promotor de  $\alpha$ -actina esquelética, promotor de actina cardíaca, promotor de troponina C esquelética, promotor de troponina C cardíaca de baja contracción y el promotor/potenciador de creatina-cinasa o promotores específicos para tumores como promotor de  $\alpha$ -fetoproteína para carcinoma hepatocelular humano o promotor de antígeno específico para próstata para cáncer de próstata. Hay varios promotores específicos para músculo que son muy conocidos en la técnica y pueden usarse para implementar la invención (para un revisión de promotores específicos para músculo véase Miller y col., (1993) *Bioessays* 15: 191-196).

Los vectores de la invención pueden usarse alternativamente para transformar, transfectar o infectar células, preferentemente células de mamífero que incluyen células humanas, por ejemplo, *ex vivo*, y, posteriormente implantarlas al cuerpo humano o animal para obtener el efecto terapéutico deseado. Para su administración al sujeto, dichas células se formularán en un medio adecuado que no afecta adversamente su viabilidad. Asimismo, como entenderán los expertos en la materia, dicho vector puede contener, entre otros, sitios de clonación múltiple, secuencias reguladoras de la expresión, orígenes de replicación adecuados para la célula huésped en la que va a introducirse el vector, marcadores de selección, etc.

La composición o kit según la presente invención puede comprender una célula que comprende (i) un polinucleótido como se define en la parte (b) del primer aspecto de la invención o (ii) un vector como se define en la parte (c) del primer aspecto de la invención. Ambos, el polinucleótido y el vector, pueden mostrar características que se han explicado previamente.

Células adecuadas para alojar el antagonista de Wnt según la presente invención pueden ser una célula eucariota o procariota. En la presente invención puede usarse prácticamente cualquier célula huésped que pueda ser transformada por un polinucleótido de la invención, o que puede ser transformada, transfectada o infectada por un vector recombinante de la invención, por ejemplo células animales (por ejemplo células de mamífero, células de pájaro, células de insecto, etc.), levaduras, etc. Las células de la invención pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales conocidos por expertos en la materia [Sambrook y col., 1989, mencionado anteriormente].

La composición que comprende al menos dos antagonistas de Wnt diferentes puede proporcionarse como una combinación de polipéptidos o una combinación de polinucleótidos como se describe anteriormente. Sin embargo, también es posible proporcionar un único polinucleótido que comprenda secuencias que codifican dos antagonistas de Wnt diferentes. Por tanto, en otro aspecto la invención se refiere a un polinucleótido, denominado en lo sucesivo polinucleótido de la invención, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos dos antagonistas de Wnt diferentes.

El experto entiende que todas las realizaciones particulares previamente descritas para la composición o el kit de la invención con respecto a las características de los antagonistas de Wnt pueden aplicarse al polinucleótido de la invención.

Por tanto, en una realización particular, el polinucleótido de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos dos antagonistas de Wnt diferentes, en la que cada uno de los antagonistas de Wnt se selecciona del grupo de:

- a. un polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt y
- b. una proteína de fusión que comprende un primer resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt y un segundo resto de polipéptido.

En otra realización particular del polinucleótido de la invención, el segundo resto de polipéptido es un polipéptido que alarga la vida media en suero del primer resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt.

En todavía otra realización particular, el segundo resto de polipéptido es un fragmento Fc, preferentemente un fragmento Fc de inmunoglobulina, más preferentemente un fragmento Fc de IgG.

En otra realización particular, el primer y el segundo resto de polipéptido están conectados mediante un enlace peptídico sencillo o mediante un espaciador peptídico.

En otra realización particular, el polipéptido que tiene actividad antagonista o el resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt son antagonistas de Wnt de la clase sFRP, preferentemente una proteína relacionada con frizzled soluble (sFRP) o una variante funcionalmente equivalente de la misma, o un factor 1 inhibidor de Wnt (Wif1) o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

Como entiende el experto, el polinucleótido de la invención puede introducirse en un vector o en una célula. Por tanto, en otro aspecto la invención se refiere a un vector que comprende el polinucleótido de la invención y, en otro aspecto adicional, a una célula que comprende el polinucleótido de la invención o el vector que comprende dicho polinucleótido.

Según la presente invención, la administración combinada de al menos dos antagonistas de proteína Wnt induce sorprendentemente una mayor apoptosis celular en células tumorales que la administración de un único antagonista, logrando la inhibición tumoral. Esto puede ser útil para el tratamiento de múltiples enfermedades en las que se desea la inhibición de la angiogénesis o suspensión del crecimiento tumoral. Por tanto, en otro aspecto la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición según la invención, del polinucleótido de la invención o del vector o la célula que comprende dicho polinucleótido junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones de la invención que comprenden dos o más componentes pueden formularse para su uso separado simultáneo o sucesivo.

Para uso en medicina, los antagonistas de Wnt pueden estar en forma de un profármaco, sal, solvato o clatrato, bien en forma aislada o en combinación con agentes activos adicionales. Los antagonistas de Wnt según la presente invención pueden formularse junto con un excipiente que es aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas. La composición farmacéutica de la invención puede formularse en una forma de dosificación farmacéutica sólida (por ejemplo, comprimidos, cápsulas, comprimidos recubiertos de azúcar, gránulos, supositorios, sólidos estériles cristalinos o amorfos que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas, etc.), líquida (por ejemplo, disoluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, ungüentos, etc.) o semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en el estado de la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse mediante procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

En la presente invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende como la cantidad de los antagonistas de Wnt que es suficiente para producir un retraso en el crecimiento tumoral o la inhibición del mismo, o para inducir un aumento de la respuesta inmunitaria antitumoral, o para producir un retraso o inhibición de una angiogénesis no deseada.

La pauta de dosificación será determinada por el médico y los factores clínicos. Como es muy conocido en medicina, las dosificaciones dependen de muchos factores que incluyen las características físicas del paciente (edad, estatura, sexo), el procedimiento de administración usado, la gravedad de la enfermedad, el compuesto particular usado y las propiedades farmacocinéticas del individuo.

Si los componentes de la composición o kit de la invención, es decir, los antagonistas de Wnt, están incluidos en un vector viral, la cantidad del vector en la composición o kit de la invención puede variar entre  $10^5$  y  $10^{13}$  partículas virales por dosis dependiendo del vector viral usado. Adicionalmente, dicho vector puede administrarse entre 1 y 10 veces, también dependiendo del vector viral usado. Por otra parte, si el vector es un vector no viral, por ejemplo, un plásmido, la cantidad del vector en la composición o kit de la invención puede variar entre 100 ng y 5 mg por dosis.

La composición o kit de la invención puede contener una cantidad de agentes antitumorales que puede variar dentro de un amplio intervalo, pero siempre en cantidades terapéuticamente eficaces. La cantidad de agentes antitumorales oscila entre 0,1 y 2.000 mg, preferentemente en el intervalo de 0,5 a 500 mg e incluso más preferentemente entre 1 y 200 mg. Dosis adecuadas de las composiciones pueden oscilar entre 0,01 y 100 mg/kg de peso corporal, preferentemente entre 0,1 a 50 mg/kg de peso corporal, más preferentemente entre 0,5 y 20 mg/kg de peso corporal. La composición puede administrarse un número variable de veces al día, particularmente de 1 a 4 dosis al día.

La composición de la invención o los componentes del kit de la invención pueden administrarse mediante diferentes procedimientos, por ejemplo intravenosamente, intraperitonealmente, subcutáneamente, intramuscularmente, tópicamente, intradérmicamente, oralmente, intranasalmente o intrabronquialmente, y pueden administrarse localmente o sistémicamente o directamente al sitio diana. Una revisión de los diferentes procedimientos de administración de principios activos, de los excipientes que van a usarse y de los procedimientos para prepararlos puede encontrarse en Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, EE.UU. (2000). Los antagonistas de Wnt pueden administrarse preferentemente mediante vía sistémica, dicha vía sistémica o localizada comprende vía intraperitoneal, intravenosa, oral, intratumoral o intrahepática o en cualquier localización que rodea al tumor.

En la presente invención, una “vía localizada” se entiende como la administración local de la composición de la invención o los componentes del kit de la invención a un sitio específico del cuerpo humano o animal.

5 Como se explica previamente, los hallazgos descritos en la presente invención son útiles para el tratamiento de múltiples enfermedades en las que se desea inhibir la angiogénesis o suspender el crecimiento tumoral. Por tanto, en otro aspecto la invención se refiere a la composición o kit de la invención, a un polinucleótido como se define en la presente invención y al vector y células que comprenden dicho polinucleótido para uso como medicamento.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición o kit como se define en este documento, al polinucleótido de la invención y al vector y células que comprenden dicho polinucleótido para el tratamiento del cáncer, preferentemente carcinoma hepatocelular (CHC), o enfermedades asociadas con una angiogénesis no deseada.

15 En el contexto de la invención, “tratamiento del cáncer” se entiende como la administración combinada de al menos dos antagonistas de Wnt para prevenir o retrasar la aparición de síntomas, complicaciones o indicaciones bioquímicas del cáncer o tumor, para aliviar sus síntomas o para detener o inhibir su desarrollo y progresión tal como, por ejemplo, la aparición de metástasis. El tratamiento puede ser un tratamiento profiláctico para retrasar la aparición de la enfermedad o para prevenir la manifestación de sus síntomas clínicos o subclínicos o un tratamiento terapéutico para eliminar o aliviar los síntomas después de la manifestación de la enfermedad o en relación con su tratamiento quirúrgico o con radioterapia.

20 El cáncer que va a tratarse en el contexto de la presente invención puede ser cualquier tipo de cáncer o tumor. Estos tumores o cáncer incluyen, y no se limitan a, cánceres hematológicos (por ejemplo leucemias o linfomas), tumores neurológicos (por ejemplo astrocitomas o glioblastomas), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, tumores gastrointestinales (por ejemplo cáncer de estómago, páncreas o colon), cáncer de hígado (por ejemplo carcinoma hepatocelular), cáncer de células renales, tumores genitourinarios (por ejemplo cáncer de ovario, cáncer vaginal, cáncer de cuello de útero, cáncer de vejiga, cáncer de testículo, cáncer de próstata), tumores óseos y tumores vasculares. Por tanto, en una realización particular, la enfermedad del cáncer que va a tratarse o prevenirse es carcinoma hepatocelular.

30 Por otra parte, la composición o kit según la invención, el polinucleótido de la invención y el vector o células que comprenden dicho polinucleótido también son útiles para el tratamiento de enfermedades asociadas con una angiogénesis no deseada. En el contexto de la presente invención, “enfermedades asociadas con una angiogénesis no deseada” o “trastorno relacionado con la angiogénesis” piensa en cualquier trastorno, enfermedad o estado del desarrollo que implica crecimiento atípico, extensión, retención, desarrollo, progresión, aumento o persistencia de un vaso sanguíneo tal como, pero no se limita a, un vaso sanguíneo capilar en el que la mayoría de las células en dicho vaso sanguíneo son células endoteliales vasculares. Los trastornos relacionados con la angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, angiomas, angiomas capilares, hemangioma, angioma capilar, angioma simple, angioma cavernoso, angioma en cereza, angioma senil, angioma serpiginoso, angioma aracniforme, angioma telangiectásico, angioma venoso racemoso, angiomalacia, angiomatosis, angiomegalia, angiomioma, angiomiomasarcoma, angiomiomeuroma, angiosarcoma, angioescotoma, angiopatía, angiotelectasia, angiotitis, vasculitis, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schönlein, poliangitis microscópica, hemangioma, vasculitis por hipersensibilidad, eritema nodoso, fístulas arteriovenosas, respuesta a lesión, respuesta irritante, trastornos angiogénicos oculares, respuesta a hipoxia, tumor vascular y trastornos hiperproliferativos tales como, pero no se limitan a, tumores vascularizados, cánceres y neoplasias.

45 En la presente invención, un “kit” se entiende como un producto que contiene los diferentes principios activos o compuestos de la invención (es decir, el antagonista de Wnt) que forman la composición envasada de manera que permite su transporte, almacenamiento y su administración simultánea o sucesiva. Por tanto, los kits de la invención pueden contener una o más suspensiones, comprimidos, cápsulas, inhaladores, jeringuillas, parches y similares que contienen los principios activos de la invención y que pueden prepararse en una dosis única o como dosis múltiples. El kit puede contener adicionalmente un vehículo adecuado para resuspender las composiciones de la invención tales como medios acuosos tales como solución salina, disolución de Ringer, disolución de Ringer lactada, dextrosa y cloruro sódico, medios solubles en agua tales como alcohol, polietilenglicol, propiltilenglicol y vehículos insolubles en agua tales como aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato de bencilo. Otro componente que puede estar presente en el kit es un envase que permite mantener las formulaciones de la invención dentro de límites determinados. Materiales adecuados para preparar tales envases incluyen vidrio, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, sobres y similares.

60 El kit de la invención puede contener adicionalmente instrucciones para la administración simultánea, sucesiva o separada de las diferentes formulaciones farmacéuticas presentes en el kit. Por tanto, en una realización particular, el kit de la invención comprende además instrucciones para la administración simultánea, sucesiva o separada de los diferentes componentes. Dichas instrucciones pueden encontrarse en forma de material impreso o en forma de un soporte electrónico que puede almacenar las instrucciones de forma que puedan ser leídas por un sujeto, tal como medios de almacenamiento electrónico (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Los medios pueden contener adicionalmente o alternativamente páginas web de internet que proporcionan dichas instrucciones.

## ES 2 334 092 A1

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento del cáncer, preferentemente carcinoma hepatocelular (CHC), y enfermedades asociadas con una angiogénesis no deseada que comprende administrar dos antagonistas de la proteína Wnt o variantes funcionalmente equivalentes de dichos antagonistas junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El siguiente ejemplo se proporciona como simplemente ilustrativo y no debe interpretarse como limitante del alcance de la invención.

### 10 Ejemplo

#### 1. *Materiales y procedimientos*

##### *Líneas celulares y animales*

Las líneas celulares humanas 293 (riñón embrionario que contiene la región E1A de Ad5), HepG2, PLC/PRF/5, Huh7, Hep3B (líneas celulares de hepatoma humano), A549 (carcinoma de pulmón humano), Hela (carcinoma de cuello de útero humano) y BJ (fibroblasto normal humano) se obtuvieron de la colección americana de cultivos tipo (Rockville, MD, EE.UU.). Las células 293, PLC/PRF/5 y Hela se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (SBF), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y 100 mg/ml de estreptomina. HepG2, crecido en RPMI 1640 complementado con SBF al 10%. Los cultivos primarios de HMVEC se obtuvieron de Cascade Biologics Inc. (Portland, Oregon, EE.UU.) y se cultivaron en medio 131, complementado con complemento del crecimiento microvascular (Cascade Biologics). Entre el cuarto y el séptimo paso se usaron HMVEC. Se compraron ratones desnudos atómicos y ratones C57/BL6, 4 a 6 semanas de edad, de Harlan (Barcelona, España). Los animales se mantuvieron en condiciones habituales sin patógenos y recibieron cuidados según los criterios explicados resumidamente en "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" de la Academia Nacional de Ciencias. Los experimentos se realizaron según la comisión local de animales. Se tomaron EPC (células progenitoras endoteliales primarias de ratón) de la médula ósea de ratones C57/BL6 y se cultivaron en EMB2 (Innogenetics), más SBF al 5%, 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico de ratón (EGF, R&D Systems), 20 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF, R&D Systems), 20 ng/ml de factor de crecimiento endotelial vascular de ratón (VEGF, R&D Systems), 50 ng/ml de factor de crecimiento similar a la insulina de ratón (IGF, R&D Systems, Mineápolis, MN, EE.UU.) y 1 µg/ml de hidrocortisona y antibióticos (Clonetics).

##### *Construcción de virus y protocolo de infección con virus y purificación de la proteína de fusión*

Se clonaron ADNc de Wif1, sFRP1 y Fc de IgG humanos en pBluescript usando sitios de restricción SpeI/BamHI con el fin de obtener pBluescript-Wif1Fc y pBluescript-sFRP1Fc. Los insertos se suprimieron de los plásmidos de Bluescript y se insertaron en pAdTrack-CMV usando NotI y XhoI con el fin de obtener los plásmidos pAdTrack-CMV-Wif1-Fc y pAdTrack-CMV-sFRP1-Fc. Se añadió una secuencia consenso de Kozak a la secuencia con el fin de aumentar la expresión de proteínas. El plásmido correcto se linealizó mediante PmeI y se cotransformó con pAdeasy-1 en células BJ5183 usando electroporación. Los plásmidos recombinantes resultantes se transfectaron en 293 células con lipofectamina 2000 para producir el adenovirus de primera generación. Los virus se propagaron en 293 células y se purificaron mediante obtención de bandas de centrifugación en cloruro de cesio mediante procedimientos habituales. Los títulos de adenovirus se determinaron mediante inmunoensayo con anticuerpo anti-E1 en 293 células. Se reunieron aproximadamente 300 ml de medios acondicionados para cada proteína de fusión y se purificaron mediante columna de proteína A Hi-Trap (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ, EE.UU.) según el protocolo del kit. Las muestras de proteína se prepararon en tampón de muestra de SDS-PAGE con (reducción de) o sin (reducción de) la adición de DTT 1 mM, se sometieron a electroforesis en geles de Tris-glicina al 10%-poliacrilamida y se tiñeron con azul de Coomassie (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EE.UU.). Las transferencias de Western se llevaron a cabo usando anticuerpos policlonales de cabra anti-Wif1 o sFRP1 humana (R&D Systems, Inc., Mineápolis, MN, EE.UU.) y anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, EE.UU.).

##### *Ensayo de citotoxicidad*

Se infectaron líneas celulares tumorales (PLC, Huh7, Hep3B, HepG2, HT29, Hela, A549) y la línea celular normal (BJ) con Ad-GFP, Ad-sFRP1-Fc o Ad-Wif1-Fc y combinaciones de las mismas en una gran multiplicidad de infecciones (MOI). Después de 7 días, las células se expusieron a violeta cristal al 2% en metanol al 20% durante 15 minutos y se lavaron. Los resultados se documentaron como fotografías.

##### *Ensayo de viabilidad celular*

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se trataron con diversos adenovirus recombinantes a MOI 5. En el momento indicado, el medio se eliminó y a cada pocillo se añadió medio nuevo que contenía 0,5 mg/ml de MTT

## ES 2 334 092 A1

(bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio) (Sigma, St Louis, MO). Las células se incubaron a 37°C durante 4 horas y luego se añadió a cada pocillo un volumen igual de disolución de solubilización (HCl 0,01 N en SDS al 10%) y se mezcló perfectamente. La absorbancia de las placas se leyó en un Bio-Rad Multiscan a 570 nm. En el tercer día, los sobrenadantes de cada línea celular se recogieron respectivamente para determinar la cantidad de niveles de sFRP1-Fc o Wif1-Fc mediante ELISA.

### *Ensayo de proliferación*

Las líneas celulares tumorales se sembraron en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos con medio de cultivo y se incubaron con diferentes concentraciones de Wif1-Fc, sFRP1-Fc o las combinaciones de las mismas. Como control se usó Fc de IgG1 humana. Las células se cultivaron durante 24 horas y luego las células se marcaron con BrdU durante otras 6 horas. El ensayo con BrdU se realizó según el protocolo (CHEMICON, CA, EE.UU.).

### *Ensayo del indicador*

Se sembraron  $5 \times 10^4$  células en placas de 24 pocillos y se transfectaron mediante lipofectamina LTX (Invitrogen Corporation, CA, EE.UU.) con combinaciones apropiadas de cada plásmido por triplicado. Para el indicador de luciferasa se usaron los vectores TOP FLASH y FOP FLASH (Millipore/Upstate). Se mezcló un vector indicador de control de luciferasa de Renilla (Promega, Woods Hollow, MI, EE.UU.) como patrón interno para la eficiencia de la transfección. La actividad de luciferasa se midió con un kit Dual-Luciferase (Promega, Madison, WI, EE.UU.).

### *Análisis de apoptosis celular*

Se sembraron  $1 \times 10^4$  células (Huh7, PLC, HepG2) en 96 pocillos y se incubaron con  $1 \mu\text{g/ml}$  de proteína Wif1-Fc o sFRP1-Fc purificada o la combinación de las mismas durante 2 días usando PBS y  $1 \mu\text{g/ml}$  de Fc de IgG1 como control. La apoptosis se evaluó mediante análisis de la activación de caspasa 3 y caspasa 7 usando la secuencia tetrapéptido del sustrato DEVD del kit de ensayo Caspase Glo 3/7 (Promega, Madison, WI, EE.UU.) según la instrucción del fabricante. Para inhibir la activación en cascada se usó un inhibidor general de caspasas Z-VAD-fmk (Sigma, Saint Louis, Missouri, EE.UU.).

### *Análisis de la expresión de genes diana de Wnt en niveles de ARNm y proteína*

Se purificó ARN total de células usando un reactivo Trizol (Gibco/BRL). El ADNc de la primera cadena se sintetizó usando  $2 \mu\text{g}$  de ARN y transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV) (Promega). Entonces se llevaron a cabo las reacciones de PCR usando el ADNc. Para RT-PCR cuantitativa se empleó SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems) y GAPDH se coamplificó como un control endógeno para normalizar la cantidad del ARN de muestra añadido a la reacción. Los cebadores usados se enumeran en la tabla 1.

(Tabla pasa a página siguiente)

# ES 2 334 092 A1

TABLA 1

*Cebadores para PCR en tiempo real*

Gen	Cebador	SEQ ID N°	Referencia
Wnt1	(F) CACGACCTCGTCTACTTCGAG	1	(Qiang y col., 2003)
	(R) ACAGACACTCGTGAGTACGA	2	
Wnt5a	(F) ACACCTCTTTCCAAACAGGCC	3	(Ching-wen C. y col., 2003)
	(R) GGATTGTTAAACTCAACTCTC	4	
Wnt10b	(F) GAATGCGAATCCACAACAACAG	5	(Ching-wen C. y col., 2003)
	(R) TTGCGGTTGTGGGTATCAATGAA	6	
Fzd1	(F) GTGAGCCGACCAAGGTGTAT	7	Diseño de los inventores
	(R) AGCCGGACAAGAAGATGATG	8	
Fzd2	(F) GTCCTCAAGGTGCCATCCTA	9	Diseño de los inventores
	(R) CAGCCCGACAGAAAATGAT	10	
Fzd4	(F) CAGTCAAGAGACGCTGTGAAC	11	Diseño de los inventores
	(R) CGCTCAGGGTAGGAAAACCTA	12	
Fzd6	(F) CCCACTTATTGATACCTTACC	13	Diseño de los inventores
	(R) ATGTCTGAGAAAGTACTGT	14	
Fzd7	(F) TTTGGATGAAAAGATTTTCAGGC	15	(Kirikoshi y col., 2001)
	(R) GACCACTGCTTGACAAGCACAC	16	
Wif1	(F) CCGAAATGGAGGCTTT	17	Diseño de los inventores
	(R) TGTTGAGCAGTTTGC	18	
E2F1	(F) ATGTTTTCTGTGCCCTGAG	19	Diseño de los inventores
	(R) ATCTGTGGTGAGGGATGAGG	20	
Ciclina D	(F) GCCACGTCTCCACACATCAG	21	Diseño de los inventores
	(R) TCTTGGCAGCAGGATAGTCCTT	22	
C-myc	(F) TACCCTCTCAACGACAGCAG	23	Diseño de los inventores
	(R) TCTTGACATTCTCCTCGGTG	24	
GAPDH	(F) CCAAGGTCATCCATGACAAC	25	Diseño de los inventores
	(R) TGTCATACCAGGAAATGAGC	26	

### *Experimentos farmacocinéticos y de eficacia en ratones desnudos sanos*

Grupos de seis ratones recibieron una única inyección intravenosa (vena lateral de la cola) de hr-Wif1, hr-sFRP1 recombinante (R&D Systems, Mineápolis, MN, EE.UU.), Wif1-Fc, sFRP1-Fc, Ad-Wif1-Fc o Ad-sFRP1-Fc, cada uno a una dosis de 0,1  $\mu\text{g}/10\text{ g}$  (proteína) o  $3 \times 10^9$  ufp (adenovirus). Las muestras de sangre (20  $\mu\text{l}$ ) se recogieron del plexo retroorbitario de ratones en tubos recubiertos con EDTA. La muestra de sangre se centrifugó y el plasma se congeló a -80°C. Las muestras de sangre se sacaron a 0,30 horas, 2 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas después de la inyección. Los niveles en plasma de las proteínas de prueba se cuantificaron usando ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA) (anticuerpo de Wif1 y anticuerpo de sFRP1, R&D Systems, Mineápolis, MN, EE.UU.). Los valores de ELISA se ajustaron basándose en curvas patrón preparadas para cada proteína de prueba. Los niveles de alanina

## ES 2 334 092 A1

aminotransferasa (ALT) se determinaron usando un analizador automático Hitachi 911 de Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania).

### 5 *Estudios en tumores de xenoinjerto en ratones desnudos*

#### *Efecto antitumoral*

Se inyectaron  $5 \times 10^6$  células de Huh7 en la ijada derecha de ratones desnudos Balb/c macho y se estableció el modelo de xenoinjertos de tumores. Cada grupo comprendió seis animales y el crecimiento tumoral se controló y se midió semanalmente. El volumen tumoral (V) se calculó usando la fórmula  $V \text{ (mm}^3\text{)} = \text{longitud} \times \text{ancho}^2 / 2$ . Cuando los tumores tuvieron 100-150 mm<sup>3</sup> de tamaño, los ratones se aleatorizaron en cinco grupos y se les administró intratumoralmente  $1 \times 10^9$  ufp de virus recombinantes suspendidos en 50 ml de PBS o 50 ml de PBS solo. A los 7 días después de la terapia, los tumores se recogieron para análisis histopatológico y de marcación de extremos cortados por dUTP-biotina mediada por TdT (TUNEL).

Se indujo un modelo de cáncer de hígado *in situ* mediante inyección de  $5 \times 10^6$  células cancerosas de Huh7 en el lóbulo izquierdo del hígado de ratones desnudos atímicos resuspendidas en 50  $\mu$ l de solución salina. Se observó un único nódulo tumoral (aproximadamente 3 mm de diámetro) en hígados 7 días después de la inoculación de las células malignas. Los ratones se aleatorizaron en cinco grupos y luego recibieron Ad-sFRP1-Fc o/y Ad-Wif1-Fc ( $1 \times 10^9$  ufp por animal) mediante inyección intravenosa, Ad-GFP o solución salina como controles. Los ratones se anestesiaron cada semana y se sometieron a laparotomía para evaluar la progresión de la enfermedad. El tamaño del tumor se midió en 2 diámetros perpendiculares usando un calibrador. La supervivencia se comprobó diariamente y se mataron los animales si estaban moribundos.

Los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) se determinaron cada 7 días usando un analizador automático Hitachi 911 de Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania). El hígado se documentó como fotografías y los tumores se recogieron para estudios histopatológicos.

#### *Inmunohistoquímica*

Para detectar las células apoptóticas en especímenes tumorales se usó el kit de detección *in situ* de apoptosis celular (CHEMICON, CA, EE.UU.). Las secciones del tumor se desparafinaron en xileno y se rehidrataron mediante concentraciones decrecientes de etanol. Después de la incubación con 20 mg/ml de proteinasa K y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3%, las secciones se lavaron con PBS y se incubaron con tampón de equilibrio. Se añadió biotina-11-dUTP y TdT en una cámara humidificada a 37°C durante 60 minutos y las células se incubaron con avidina-peroxidasa de rábano picante a 37°C durante 60 minutos y luego se coloraron con DAB. Se usó azul de metileno como contraindicación. Además, se usó CD31 como marcador para ensayar la perfusión de vasos.

#### *Transferencia de Western*

Los tejidos tumorales aislados de cada grupo de ratones se homogeneizaron en tampón A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, sacarosa 0,32 M, PMSF 0,1 mM) durante 20 minutos en hielo. Entonces las muestras se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos para recoger un sedimento nuclear bruto. El sobrenadante se centrifugó a 1.200 g durante 10 minutos para dar un sedimento enriquecido en mitocondrias que contenía mitocondrias y microsomas. Este sobrenadante se centrifugó adicionalmente a 100.000 g durante 60 minutos para dar un sedimento microsómico y una fracción citosólica. Todos los sedimentos se disolvieron en tampón A que contenía SDS al 1%. Cantidades iguales de proteína se sometieron a SDS al 12%-PAGE y se transfirieron sobre una membrana de PVDF (Millipore). La membrana se bloqueó con 5% de leche desnatada, se incubó con los diferentes anticuerpos primarios seguido por incubación con un anticuerpo secundario conjugado con HRP. Las proteínas se visualizaron con un sistema de detección ECL.

#### *Ensayo de ELISA de VEGF y SDF-1*

Se suprimieron los tejidos tumorales y los lisados celulares se recogieron, se centrifugaron a 800 g durante 10 minutos y se pasaron a través de un filtro de 0,22  $\mu$ m. Se realizó ELISA usando un kit de VEGF humano (R&D, Mineápolis, MN) y un kit Quantikine de SDF-1 humano (R&D, Mineápolis, MN) según el protocolo del fabricante. Cada condición de ensayo se midió por triplicado.

#### *Efecto de Wif1-Fc y sFRP1-Fc en células endoteliales*

#### *Ensayo de formación de tubos*

Se recubrió una placa de 48 pocillos con 150  $\mu$ l de Matrigel (Becton-Dickinson). Las HMVEC o EPC se incubaron previamente durante 6 horas con 100  $\mu$ l de disoluciones que contenían diferente concentración de las proteínas de

## ES 2 334 092 A1

fusión. Las muestras que contenían 10.000 células de HMVEC o 100.000 de EPC/50  $\mu$ l se repartieron a cada pocillo y se incubaron con diferente concentración de las proteínas de fusión en M131 que contenía complemento de crecimiento de baja concentración de suero (LSGS) al 10% se añadió a cada pocillo, las células se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 4-6 horas. Cada pocillo se fotografió a un aumento final de 200x aumento. La formación de tubos se cuantificó contando el número de ramas conectoras entre dos células endoteliales diferenciadas.

### *Ensayo de migración*

Se recubrieron insertos (poros de 8  $\mu$ m; Costar) para placas de cultivo de 24 pocillos con 100  $\mu$ g/ml de colágeno tipo I de cola de rata (Becton-Dickinson, Bedford, MA). Las HMVEC en el paso 4-6 se resuspendieron en medio 131 que contenía BSA al 1% (Sigma) y 25.000 células se sembraron en 50  $\mu$ l en la cámara superior. La cámara inferior se llenó con medio 131 que contenía BSA al 1%. Las HMVEC se incubaron previamente con CM durante 30 minutos antes de añadirse VEGF165 humano (PeproTech, Londres, Inglaterra) a una concentración final de 5 ng/ml a las cámaras inferiores. Estas cámaras se incubaron durante 4-6 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> para permitir que las células migraran a través de las membranas recubiertas con colágeno. La membrana se fijó con formalina al 10% y las células no migradas se rasparon de la superficie superior de la membrana con hisopos de algodón. Después de un aclarado con solución salina tamponada con fosfato, la membrana se tiñó con violeta cristal. Para determinar el número de células migradas en cada pocillo se contaron de cinco a ocho campos representativos con el microscopio a 100x de aumento.

### *Clasificación de células activadas por fluorescencia*

Las células se recogieron y se lavaron y se determinó el número total de células. Entonces, las células se resuspendieron hasta aproximadamente  $1-5 \times 10^7$  células/ml en PBS helado, SBF al 10%. A continuación se añadió a cada tubo 100  $\mu$ l de suspensión celular y 0,1-10  $\mu$ g/ml del anticuerpo primario. Entonces, los tubos se incubaron durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células se lavaron 3 veces mediante centrifugación a 400 g durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS helado. El anticuerpo secundario fluorescentemente marcado se diluyó en BSA al 3%/PBS a la dilución óptima y las células se resuspendieron en esta disolución, que se incubó durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, las células se lavaron 3 veces mediante centrifugación a 400 g durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS helado. Las células se analizaron en el citómetro de flujo tan pronto como fue posible.

### *Análisis estadístico*

Los datos notificados en esta invención representan las medias de tres experimentos independientes y las barras muestran la desviación estándar. Se usó ANOVA para calcular la significancia estadística de los resultados experimentales. El nivel significativo se fijó en  $P < 0,05$ .

## II. Resultados

### *Ad-SFRP1-Fc y Ad-WIF1-Fc inhiben la proliferación celular e inducen apoptosis celular in vitro*

Se construyeron proteínas de fusión que comprendían WIF1 o SFRP1 humana unida mediante un enlace flexible de 5 aminoácidos (GlySerGlyGlySer) a los extremos N de los dominios Fc de IgG1 humana (figura 1). La identidad de los constructos se confirmó mediante secuenciación. Los genes de SFRP1-Fc y WIF1-Fc humanas se clonaron en el vector adenoviral seleccionado como diana. A continuación se probó si la proteína de fusión codificada podría ser segregada al medio. ELISA mostró un valor máximo de  $282,9 \pm 69,7$  ng/ml a las 48 horas en los medios de cultivo de células HEK293 transducidas con adenovirus. Las proteínas se purificaron mediante columna de proteína A Hi-Trap. Cada monómero tuvo una masa molecular calculada de 53,72 kDa (sFRP1-Fc), 60,06 kDa (Wif1-Fc), como resultado de glicosilación, el monómero recombinante migra como una proteína de aproximadamente 80 kDa en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. La transferencia de Western usando anticuerpo específico confirmó que el peso molecular de estos dos tipos de proteína era aproximadamente 80 kDa.

Se infectaron varias líneas de células cancerosas humanas (Huh7, PLC/PRF/5, Hep3B, HepG2, Hela, A549), una línea celular de fibroblastos humanos normales (BJ) y células endoteliales humanas primarias HMVEC con Ad-SFRP1-Fc y Ad-WIF1-Fc, por separado o en combinación. Como control se usó Ad-GFP. El ensayo del efecto citopático (CPE) se realizó y los resultados se muestran en la figura 2. Las sensibilidades citotóxicas fueron diferentes para diferentes líneas de células cancerosas dependiendo de si se usó Ad-SFRP1-Fc o Ad-WIF1-Fc. Sin embargo, el tratamiento de combinación con Ad-SFRP1-Fc y Ad-WIF1-Fc presentó efecto antiproliferativo sinérgico en Huh7, PLC/PRF/5 y HepG2. No se observó efecto inhibitorio en células BJ, HMVEC y en células Hep3B, Hela o A549. Debido a que HMVEC eran células primarias, la eficacia de la infección por adenovirus fue muy baja dando como resultado que no pudiera observarse CPE a MOI 1.000 (datos no mostrados). El CPE de Ad-sFRP1-Fc y Ad-Wif1-Fc y su combinación en las líneas de células cancerosas en estudio también se evaluó mediante ensayo con MTT (figura 3). A MOI 5, los análisis diarios de viabilidad celular demostraron inhibición significativa de la proliferación en células Huh7,

PLC/PRF/5 y HepG2 tratadas con diferentes adenovirus en comparación con células tratadas con Ad-GFP. Sin embargo, el efecto inhibitorio en la proliferación de células tumorales fue mayor y más pronunciado en células cancerosas tratadas tanto con Ad-sFRP1-Fc como con Ad-Wif1-Fc que con cualquiera de ellos solo. El CPE fue dependiente de la dosificación y el tiempo. Las células infectadas con Ad-GFP mostraron menor citotoxicidad demostrando que la proteína de fusión segregada tenía un efecto en la viabilidad celular. Los resultados del ensayo ELISA mostraron que todas las líneas de células cancerosas podían infectarse con Ad-Wif1-Fc o Ad-sFRP1-Fc. Sin embargo, el nivel de proteína de fusión era diferente entre las líneas celulares (figura 4).

También se midió la proliferación celular en células que se habían puesto en contacto durante 24 horas con diferente concentración de proteínas de fusión (figura 5). Los resultados mostraron que diferentes líneas celulares de CHC siguieron la misma tendencia cuando se incubaron con proteínas de fusión que cuando se infectaron con adenovirus. Sin embargo, no hubo diferencia estadística entre el grupo de 1  $\mu\text{g/ml}$  y 10  $\mu\text{g/ml}$ . Para HMVEC, su crecimiento podría inhibirse con sFRP1-Fc y Wif1-Fc solo o en combinación y los grupos de 10  $\mu\text{g/ml}$  tuvieron mayor efecto.

Para determinar el mecanismo responsable de los efectos inhibitorios de proteínas de fusión (sFRP1-Fc y Wif1-Fc) se estudió la activación de caspasas. Para este fin se incubaron células Huh7, HepG2 y PLC con Wif1-Fc, sFRP1-Fc o la combinación de las mismas usando Fc de IgG o solución salina. La función de las caspasas se estudió incluyendo el inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK en el medio de cultivo. Como se muestra en la figura 6, el tratamiento de las células con Wif1-Fc o sFRP1-Fc dio como resultado un aumento en la apoptosis. El tratamiento de las células con la combinación de Wif1-Fc y sFRP1-Fc dio como resultado una respuesta apoptótica más espectacular, mientras que las células tratadas con Fc de IgG o solución salina sola dieron como resultado menor apoptosis de células tumorales. Sin embargo, la apoptosis se inhibió casi completamente cuando los ensayos se llevaron a cabo en presencia del inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK. Estos resultados sugieren que el uso combinado de sFRP1-Fc y Wif1-Fc puede inducir la activación en cascada de caspasas en un modo sinérgico (figura 6).

Para investigar si las proteínas de fusión de la invención habían antagonizado la señalización de Wnt se usó PCR en tiempo real para probar los niveles de expresión de genes que son activados en respuesta a señalización de Wnt. Los resultados mostraron que E2F1, Axin2, C-myc se regularon significativamente por disminución en células tratadas con 1  $\mu\text{g/ml}$  de las proteínas de fusión. Sin embargo, no se observó regulación significativa por disminución de la expresión del gen de ciclina D. Estos resultados sugieren que ciclina D se activó por otras señales en estas células (figura 7). Se usaron ensayos de detección del indicador TOP flash y FOP flash para probar adicionalmente la inhibición de la señal de Wnt mediante estos dos tipos de proteínas de fusión. El resultado se muestra en la figura 5. En las células Huh7 y HepG2 que muestran una disminución de la proliferación, el valor de la relación TOP/FOP también mostró una notable disminución.

#### *Actividad farmacéutica de Ad-sFRP1-Fc y Ad-Wif1-Fc y sus proteínas de fusión in vivo*

Como se muestra en la figura 8 (panel superior), la administración de los adenovirus recombinantes Ad-Wif1-Fc dio como resultado un lento aumento de los niveles en suero de Wif1-Fc, alcanzando el mayor nivel 10 horas después de la inyección y siendo indetectable a las 16 h después de la inyección. La administración de las proteínas recombinantes Wif1-Fc y Wif-1 llevó a una aparición más rápida de las proteínas recombinantes en suero, además de a una desaparición más rápida (Wif1 fue indetectable a las 7 h después de la inyección y Wif1-Fc fue indetectable a las 12 h después de la inyección).

Se obtuvieron resultados similares con Ad-sFRP1-Fc y las sfrp1-Fc y rhFRP1 recombinantes. Cuando las proteínas recombinantes se administraron como tales, rhFRP1 se detectó 30 minutos después de la inyección, alcanzando niveles máximos 1 h después de la inyección y siendo indetectable 1 d después de la inyección, mientras que sfrp1-Fc fue detectable a los 30 min después de la inyección, alcanzó un máximo a las 24 h después de la inyección y fue indetectable 7 d después de la inyección. Cuando se usaron los adenovirus recombinantes, los niveles de expresión máximos se observaron 5 d después de la inyección y la proteína recombinante fue indetectable 1 mes después de la inyección.

Los niveles en suero de alanina transaminasa y aspartato transaminasa estuvieron dentro del intervalo de referencia 30 días después de la transducción y los estudios histopatológicos no mostraron lesiones obvias en el hígado (figura 9). Además, el peso corporal, el aspecto macroscópico y el comportamiento no proporcionaron signos de toxicidad sistémica.

#### *Supresión del crecimiento tumoral subcutáneo*

Se empleó el modelo subcutáneo (véase Materiales y procedimientos) para analizar el potencial terapéutico de Ad-SFRP1-Fc y Ad-WIF1-Fc. El control del volumen del tumor durante 4 semanas reveló una reducción sustancial del crecimiento durante dos semanas en los tumores inyectados con Ad-SFRP1-Fc o Ad-WIF1-Fc (figura 10), pero no en los grupos de control con Ad-GFP o solución salina. Después de 2 semanas el volumen del tumor aumentó en los grupos de Ad-sFRP1-Fc y Ad-Wif1-Fc. La prueba que respalda la aparición de apoptosis en la célula tumoral se proporciona mediante ensayos de marcación de extremos cortados mediada por nucleotidil transferasa terminal (TdT) que demuestran niveles significativamente mayores de muerte celular apoptótica en los tumores transducidos por Ad-

sFRP1-Fc y Ad-Wif1-Fc (figura 13). Los estudios de inmunohistoquímica y transferencia de Western confirmaron la expresión de las proteínas de fusión 7 días después de la inyección intratumoral de Ad-SFRP1-Fc y Ad-WIF1-Fc, pero no en los tumores inyectados con solución salina (figura 12). Además, la densidad de microvasos se determinó en los tumores mediante inmunohistoquímica usando anticuerpos específicos anti-CD31 como marcador para células endoteliales. Hubo reducciones significativas en la densidad de microvasos en los animales tratados con Ad-sFRP1-Fc y Ad-Wif1-Fc en comparación con los grupos de control de Ad-GFP (figura 14). El análisis cuantitativo demostró una reducción del 29,3%, 33,5% y 42,8% en la densidad de microvasos intratumorales en animales tratados con Ad-WIF1-Fc, Ad-SFRP1-Fc y la combinación de las mismas en comparación con animales de control que recibieron Ad-GFP respectivamente. También se detectó la disminución del nivel de expresión de VEGF y SDF-1 en tejidos tumorales (figura 15).

*El uso individual o combinado de Ad-Wif1-Fc y Ad-sFRP1-Fc mejora la tasa de supervivencia de ratones con cáncer de hígado ortotópico*

El modelo de cáncer de hígado ortotópico mostró una mortalidad inicial en el día 41 en el grupo tratado con solución salina y en el día 42 en el grupo tratado con Ad-GFP. Sin embargo, la primera mortalidad en el grupo Ad-SFRP1-Fc y Ad-WIF1-Fc fue en el día 50 y 52, respectivamente. En el grupo tratado con la combinación de Ad-Wif1-Fc y Ad-sFRP1-Fc, la primera mortalidad fue en el día 58. Las medianas de supervivencias fueron 51 y 51,5 días para los grupos de solución salina y Ad-GFP, respectivamente, en comparación con una mediana de supervivencia de 60,5 y 59,5 días para los ratones tratados con Ad-Wif1-Fc y Ad-sFRP1-Fc. En ratones tratados con la combinación de dos virus la mediana de supervivencia fue 70 días (figura 11).

Con el fin de determinar si las proteínas de fusión tenían una función en la angiogénesis se determinó la viabilidad celular de HMVEC en presencia de las diferentes proteínas de fusión. También se determinó el efecto de las proteínas de fusión en la viabilidad y diferenciación de EPC de ratón ya que se usaron ratones desnudos atímicos para desarrollar el modelo tumoral. Se observó que a 10  $\mu\text{g/ml}$  de proteínas de fusión la formación y migración de tubos de HMVEC disminuyeron el 30% y la formación y migración de tubos de EPC disminuyeron aproximadamente el 50% (figura 16). Las proteínas de fusión también pudieron inhibir la diferenciación de células EPC en células endoteliales maduras e inducir la apoptosis de células endoteliales (figura 17). Los resultados confirmaron que las proteínas de fusión de la invención podían inhibir angiogénesis.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

- 5
- a) al menos dos antagonistas de Wnt diferentes,
  - b) al menos dos polinucleótidos comprendiendo cada uno una secuencia de nucleótidos que codifica un antagonista de Wnt diferente;
  - 10 c) un primer antagonista de Wnt y un polinucleótido que codifica un segundo antagonista de Wnt;
  - d) al menos dos vectores comprendiendo cada uno un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antagonista de Wnt diferente o
  - 15 e) una célula que comprende los polinucleótidos como se definen en (b) o los vectores como se definen en (d).

en donde el antagonista de Wnt se selecciona del grupo de:

- 20
- a) un polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt y
  - b) una proteína de fusión que comprende un primer resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt y un segundo resto de polipéptido,

25 en donde el antagonista de Wnt es una proteína relacionada con frizzled soluble (sFRP) o una variante funcionalmente equivalente de la misma que presenta una identidad de secuencia de al menos un 90% o un factor 1 inhibidor de Wnt (Wif1) o una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta una identidad de secuencia de al menos 90%.

30 2. Composición según la reivindicación 1, en la que el segundo resto de polipéptido es un fragmento Fc, preferentemente un fragmento Fc de inmunoglobulina, más preferentemente un fragmento Fc de IgG.

35 3. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el primer y el segundo resto de polipéptido de al menos una de las proteínas de fusión están conectados mediante un enlace peptídico sencillo o mediante un espaciador peptídico.

4. Un kit que comprende:

- 40
- a) al menos dos antagonistas de Wnt diferentes,
  - b) al menos dos polinucleótidos comprendiendo cada uno una secuencia de nucleótidos que codifica un antagonista de Wnt diferente;
  - 45 c) un primer antagonista de Wnt y un polinucleótido que codifica un segundo antagonista de Wnt;
  - d) al menos dos vectores comprendiendo cada uno un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antagonista de Wnt diferente o
  - 50 e) una célula que comprende los polinucleótidos como se definen en (b) o los vectores como se definen en (d).

en donde el antagonista de Wnt se selecciona del grupo de:

- 55
- a) un polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt y
  - b) una proteína de fusión que comprende un primer resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt y un segundo resto de polipéptido.

60 en donde el antagonista de Wnt es una proteína relacionada con frizzled soluble (sFRP) o una variante funcionalmente equivalente de la misma que presenta una identidad de secuencia de al menos un 90% o un factor 1 inhibidor de Wnt (Wif1) o una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta una identidad de secuencia de al menos 90%.

65 5. Kit según la reivindicación 4, en la que el segundo resto de polipéptido es un fragmento Fc, preferentemente un fragmento Fc de inmunoglobulina, más preferentemente un fragmento Fc de IgG.

## ES 2 334 092 A1

6. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, en la que el primer y el segundo resto de polipéptido de al menos una de las proteínas de fusión están conectados mediante un enlace peptídico sencillo o mediante un espaciador peptídico.

5 7. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos dos antagonistas de Wnt diferentes en el que cada uno de los antagonistas se selecciona del grupo de:

a) un polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt y

10 b) una proteína de fusión que comprende un primer resto de polipéptido que tiene actividad antagonista de Wnt y un segundo resto de polipéptido y

15 en donde el antagonista de Wnt es una proteína relacionada con frizzled soluble (sFRP) o una variante funcionalmente equivalente de la misma que presenta una identidad de secuencia de al menos un 90% o un factor 1 inhibidor de Wnt (Wif1) o una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta una identidad de secuencia de al menos 90%.

20 8. Un polinucleótido según la reivindicación 7 en el que el segundo resto de polipéptido es un fragmento Fc, preferentemente un fragmento Fc de inmunoglobulina, más preferentemente un fragmento Fc de IgG.

9. Un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 8, en el que el primer y el segundo resto de polipéptido están conectados mediante un enlace peptídico sencillo o mediante un espaciador peptídico.

25 10. Un vector que comprende un polinucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.

11. Una célula que comprende un polinucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 o un vector como se define en la reivindicación 10.

30 12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, un vector como se define en la reivindicación 10 o una célula como se define en la reivindicación 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 13. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, un vector como se define en la reivindicación 10 o una célula como se define en la reivindicación 11 para uso como medicamento.

40 14. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, un vector como se define en la reivindicación 10 o una célula como se define en la reivindicación 11 para el tratamiento de enfermedades asociadas con una angiogénesis no deseada o cáncer, preferentemente carcinoma hepatocelular (CHC).

45 15. Una composición según las reivindicaciones 12 a 14 o un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que los al menos dos componentes de las composiciones o del kit van a administrarse simultáneamente, por separado o secuencialmente.

50

55

60

65

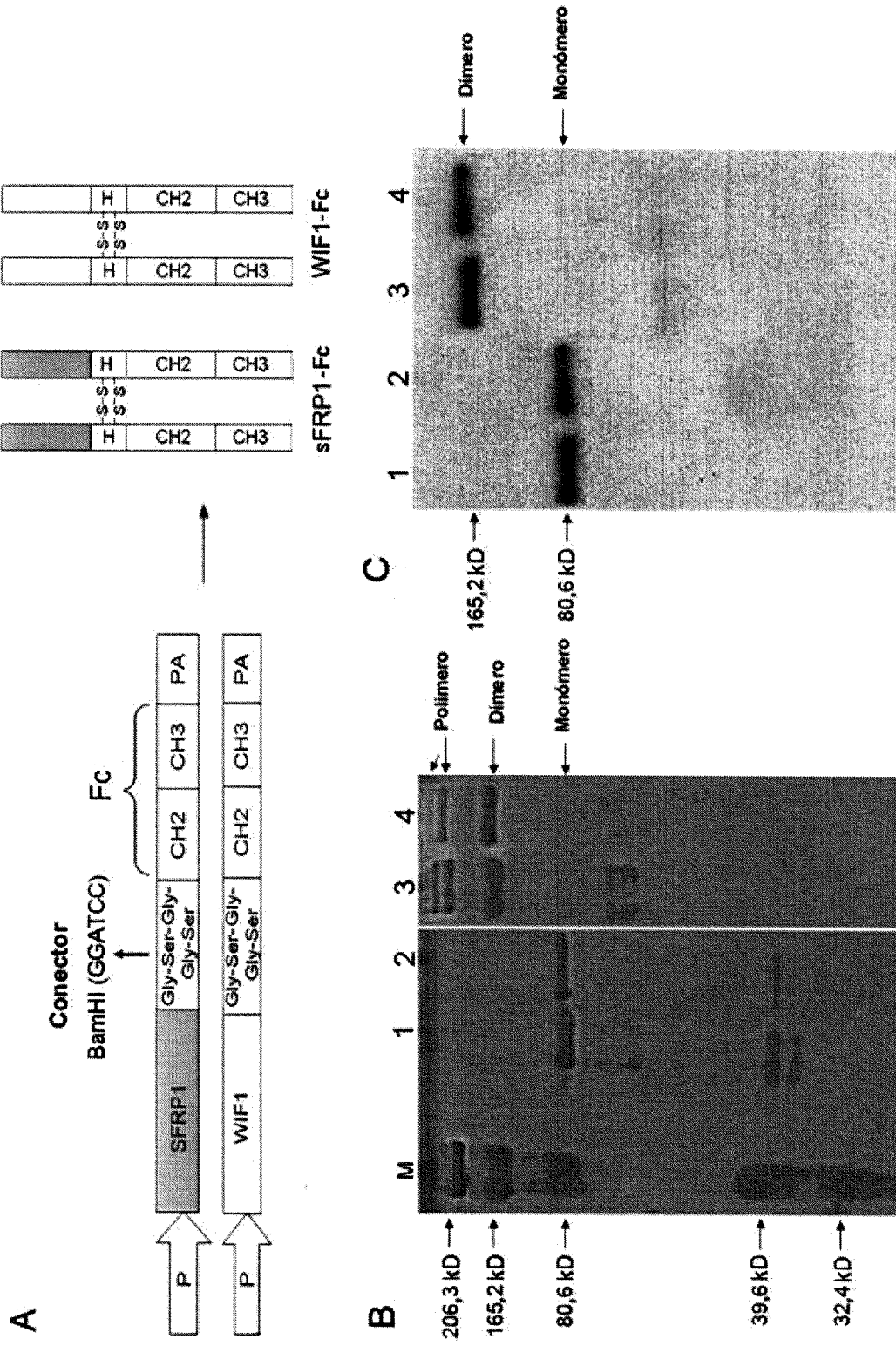


FIGURA 1

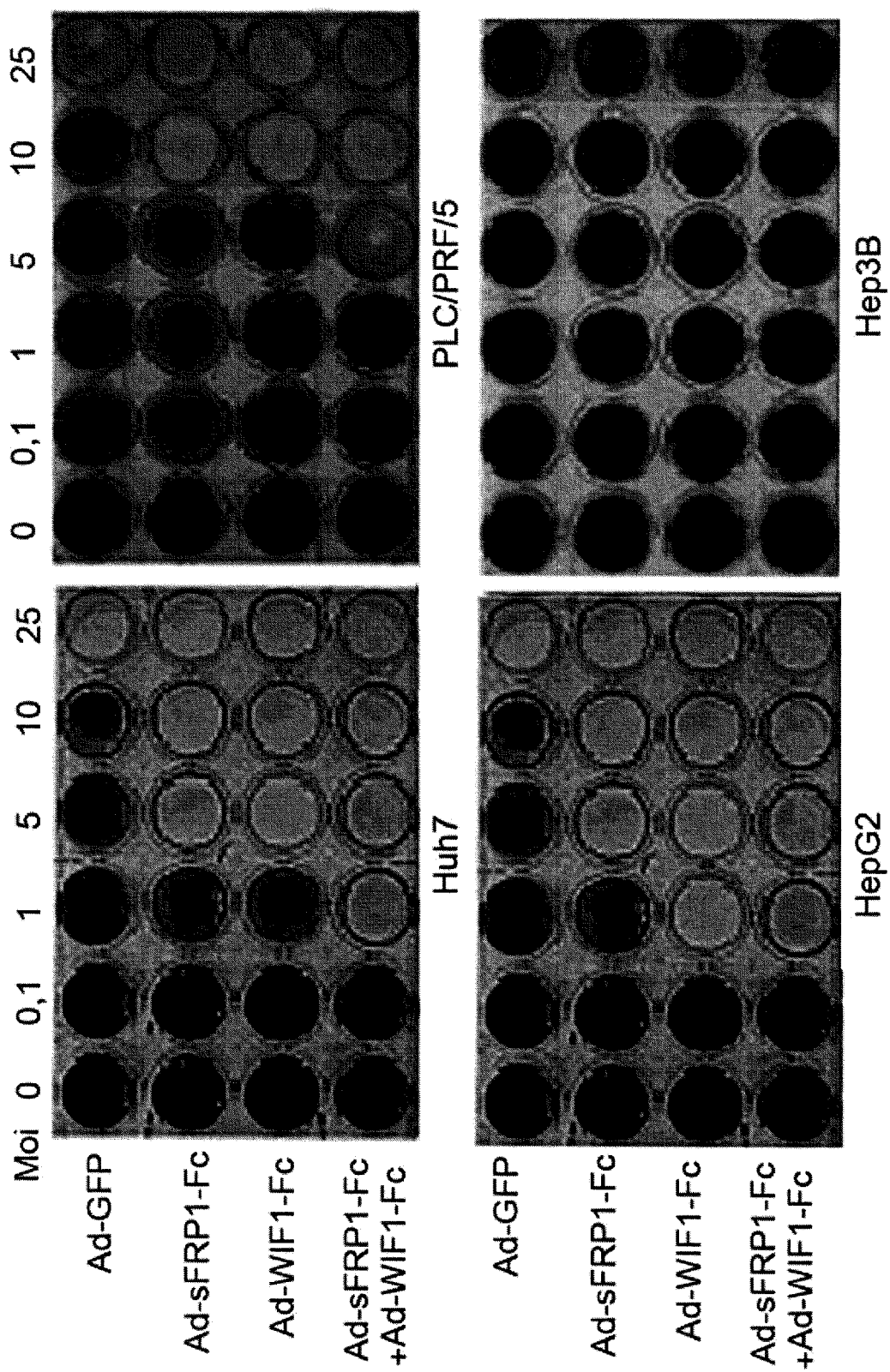
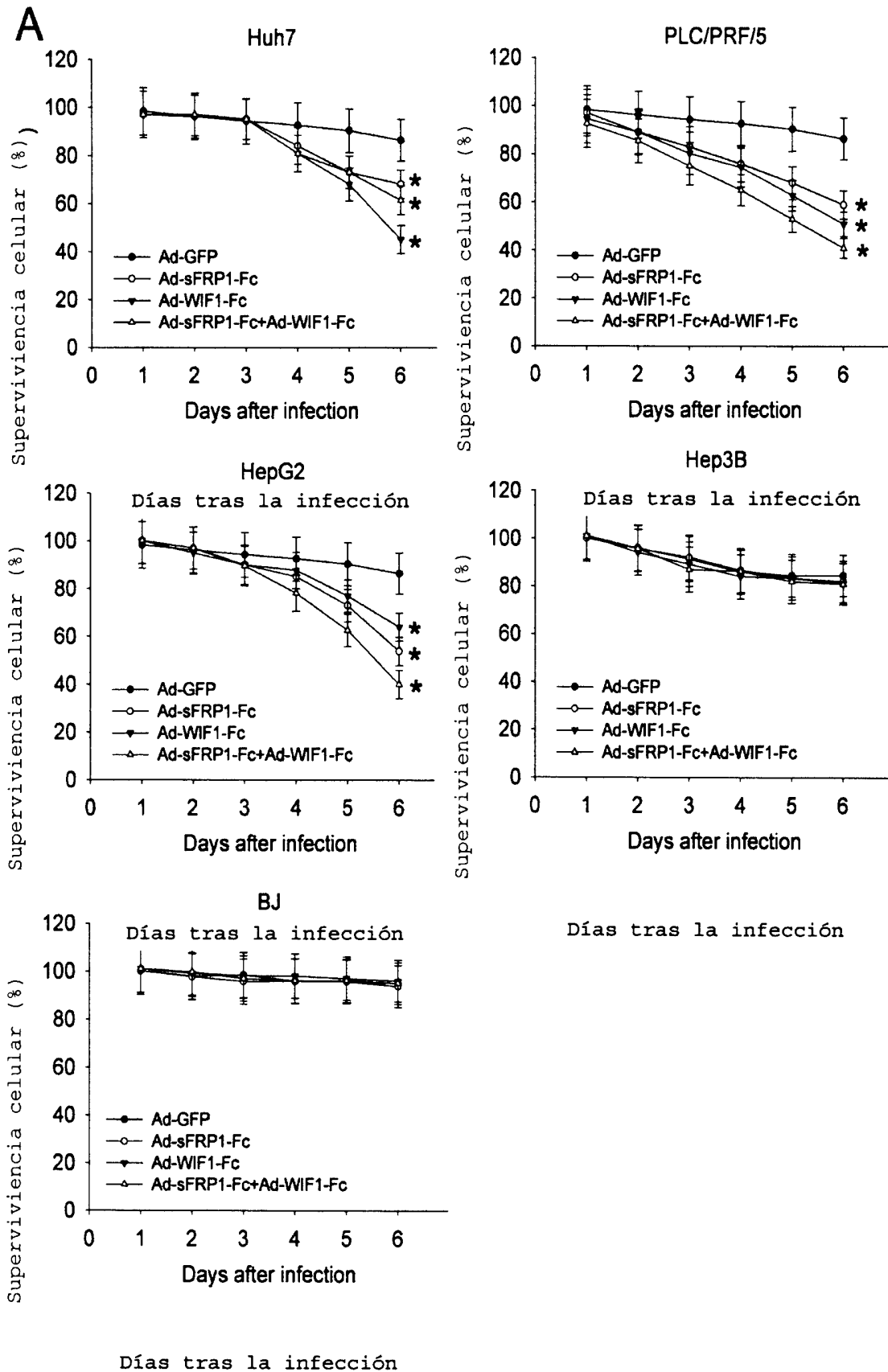
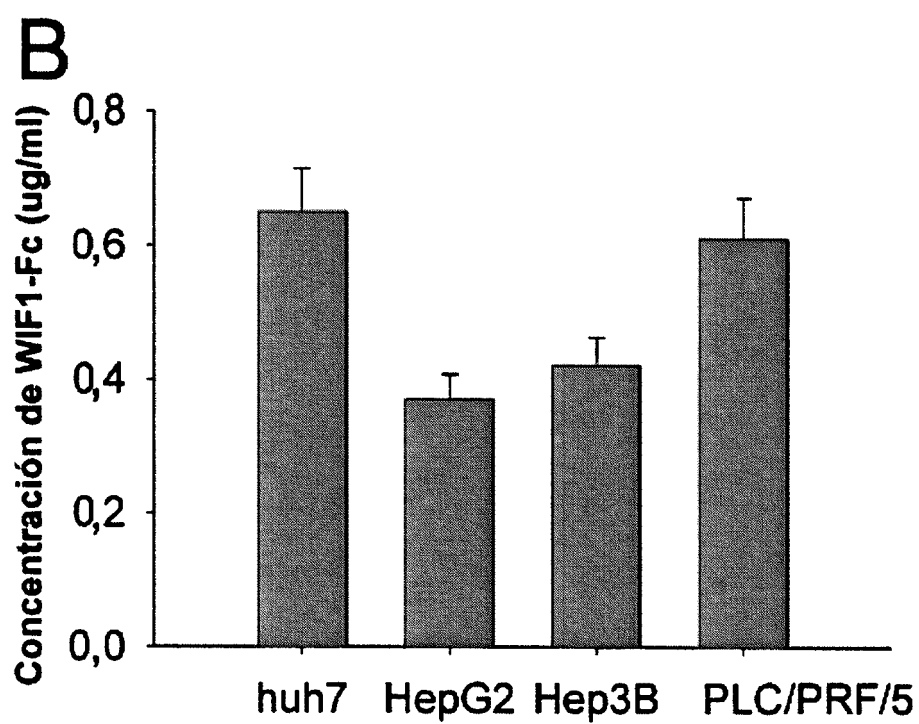
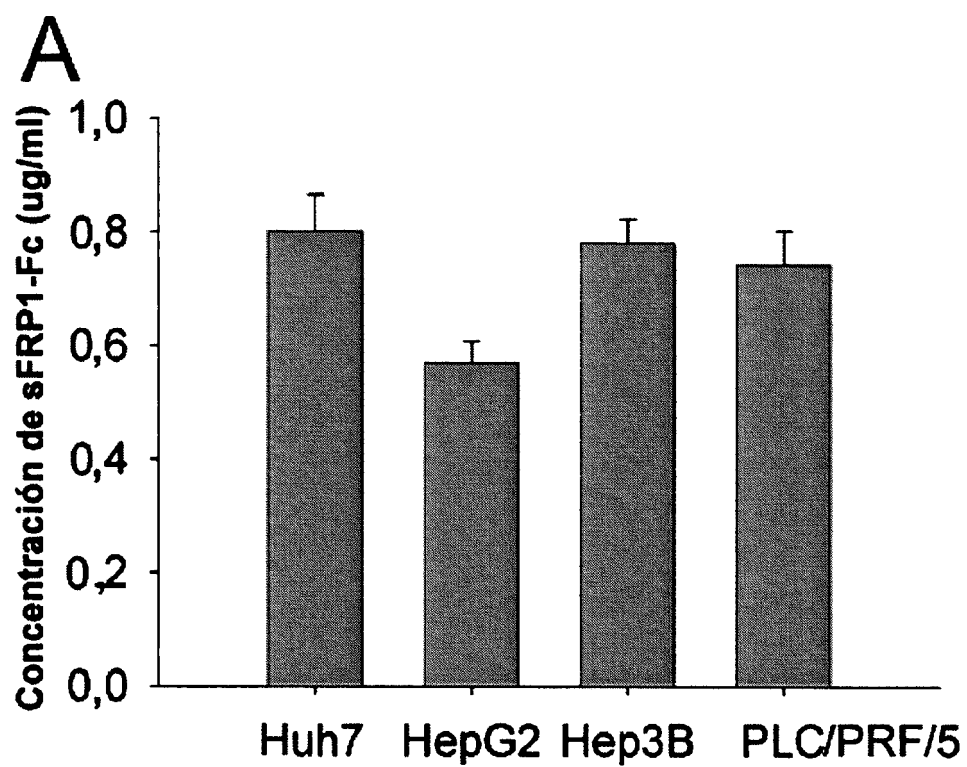


FIGURA 2

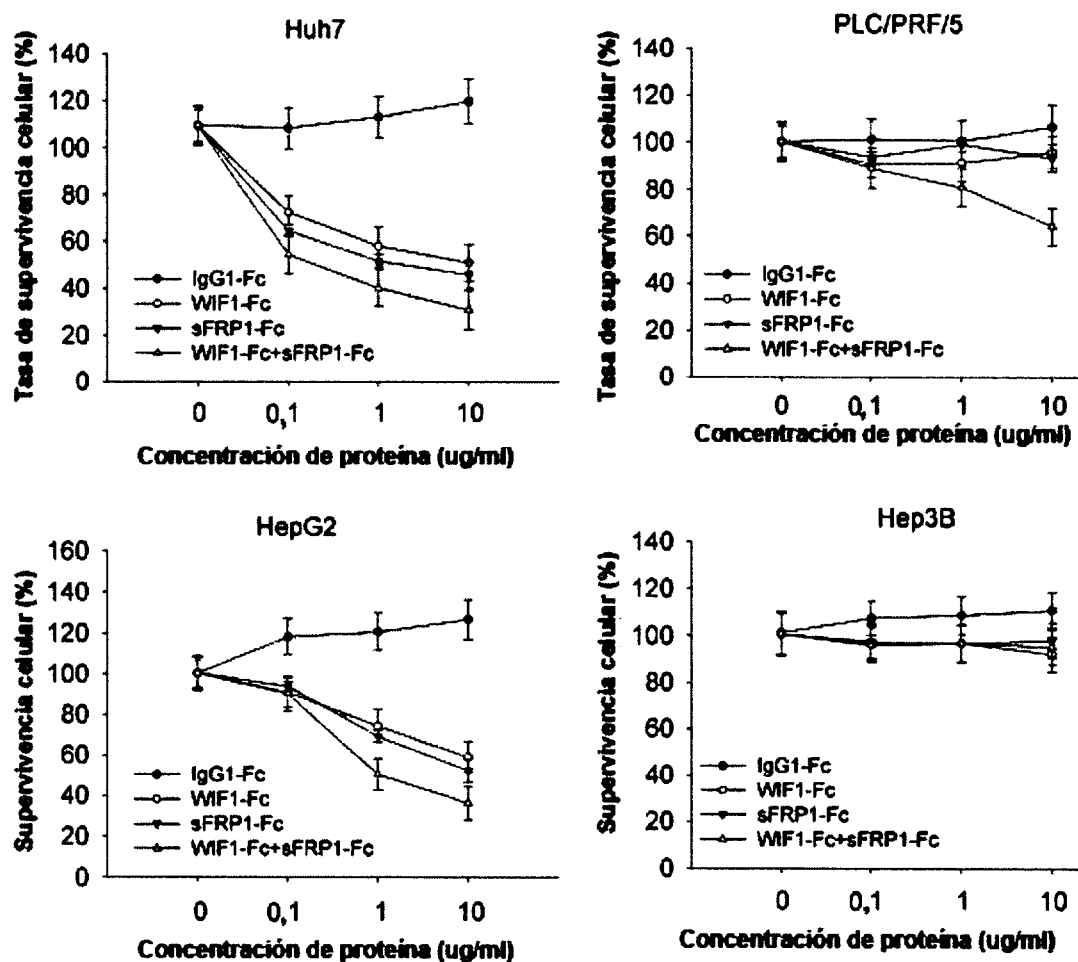


**FIGURA 3**



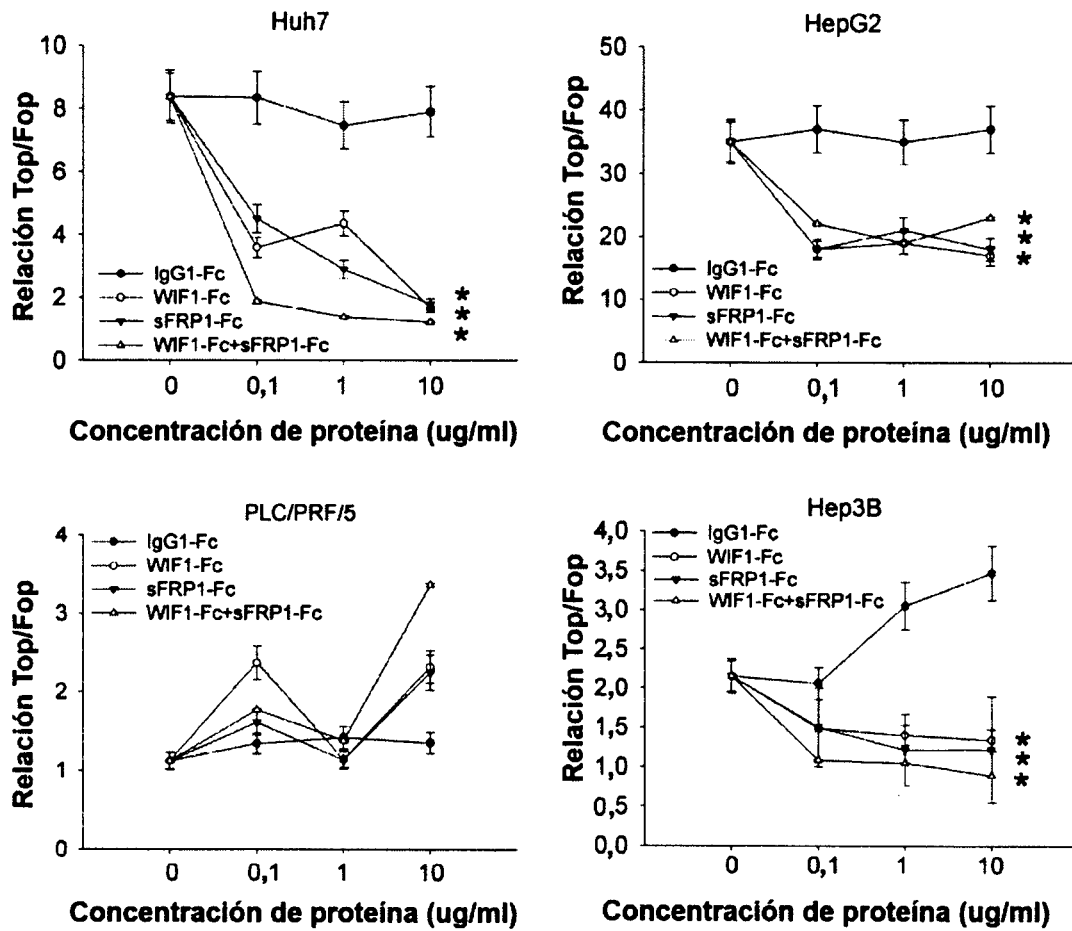
**FIGURA 4**

**A**



**FIGURA 5A**

**B**



**FIGURA 5B**

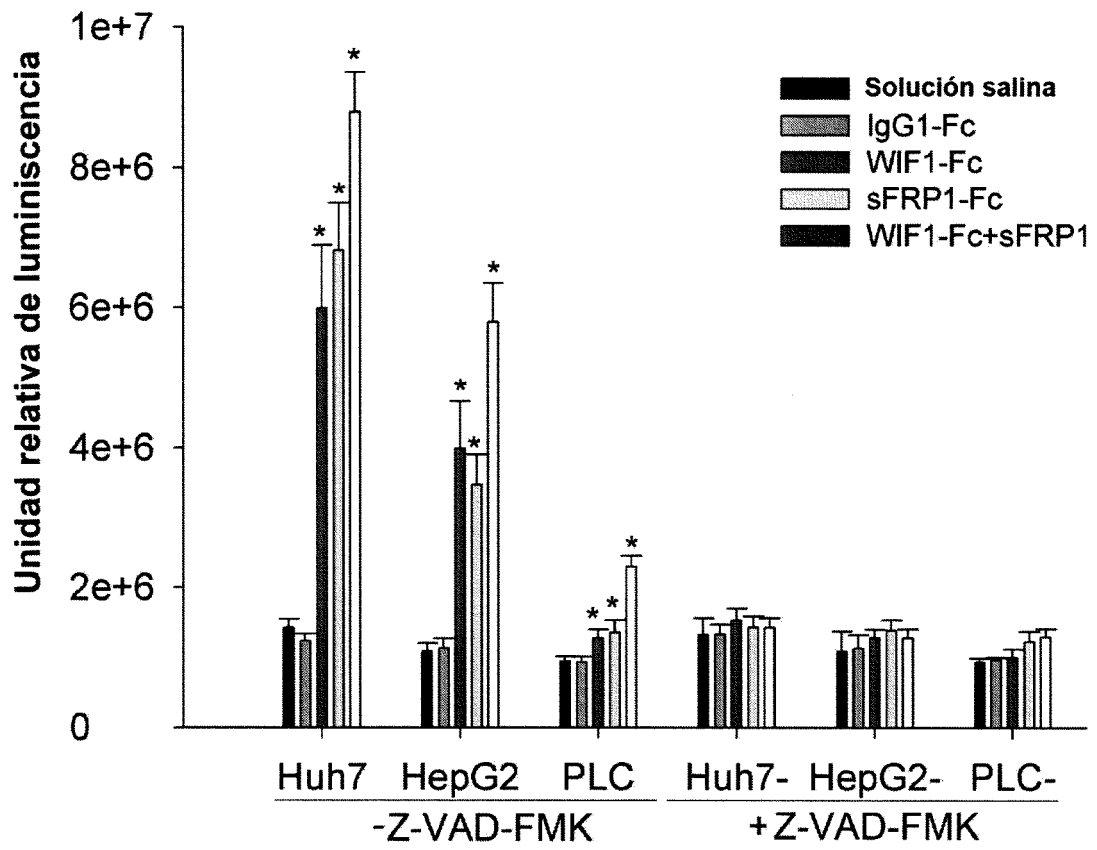


FIGURA 6

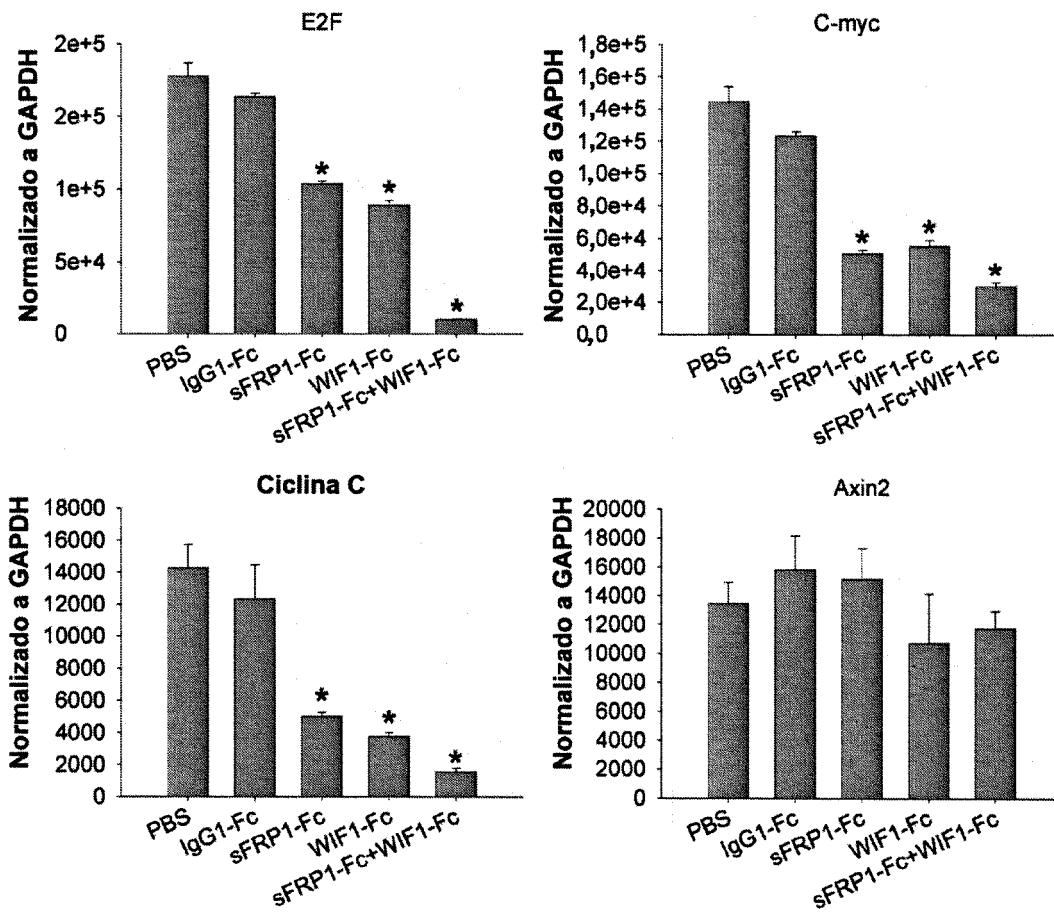
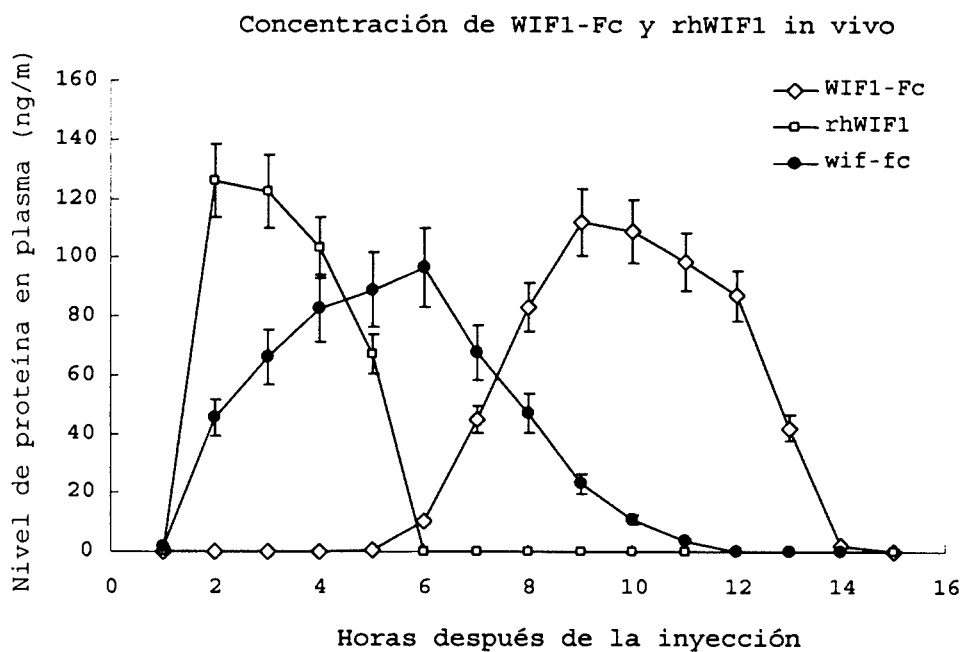
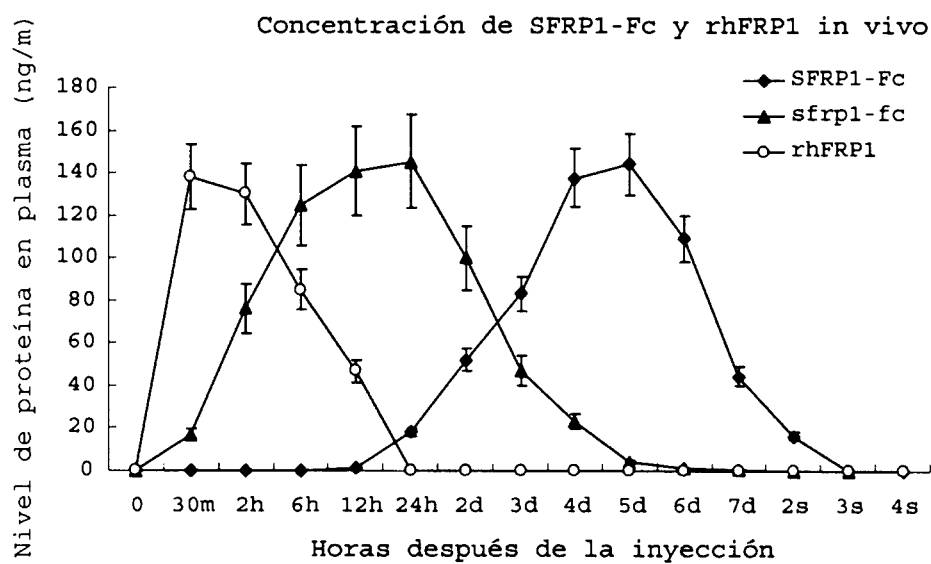


FIGURA 7

A



B



**FIGURA 8**

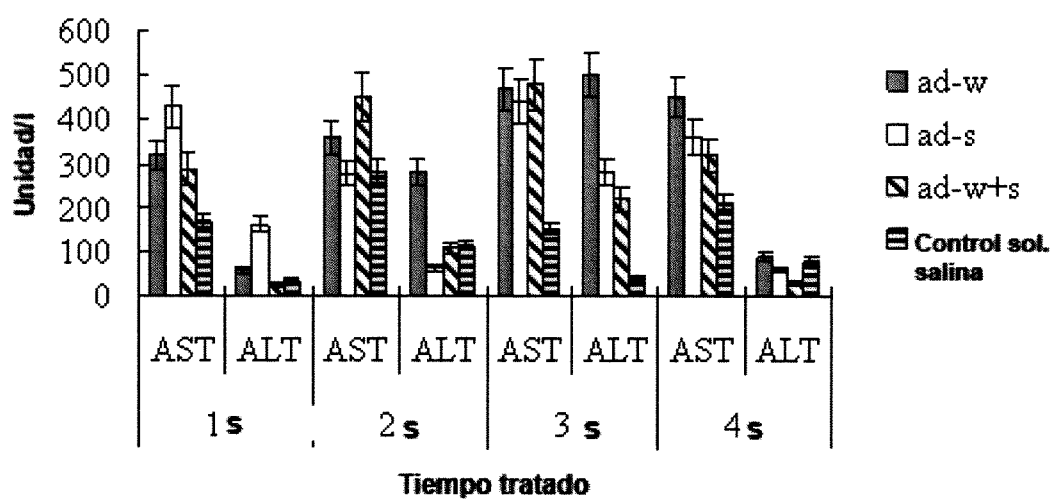


FIGURA 9

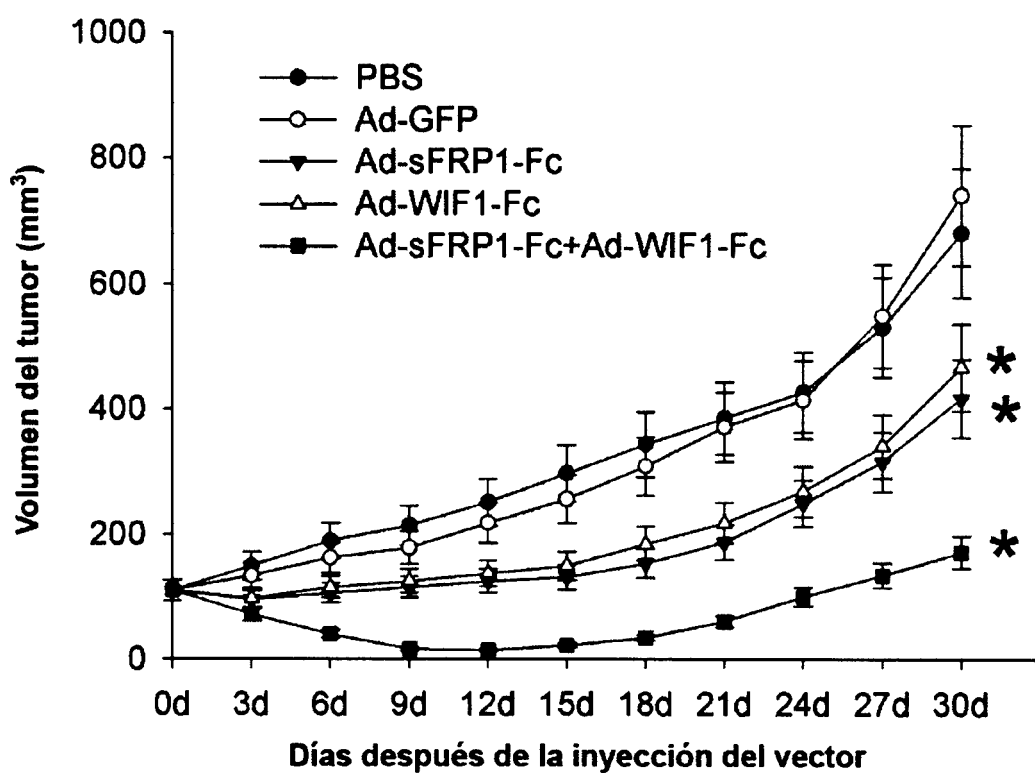


FIGURA 10

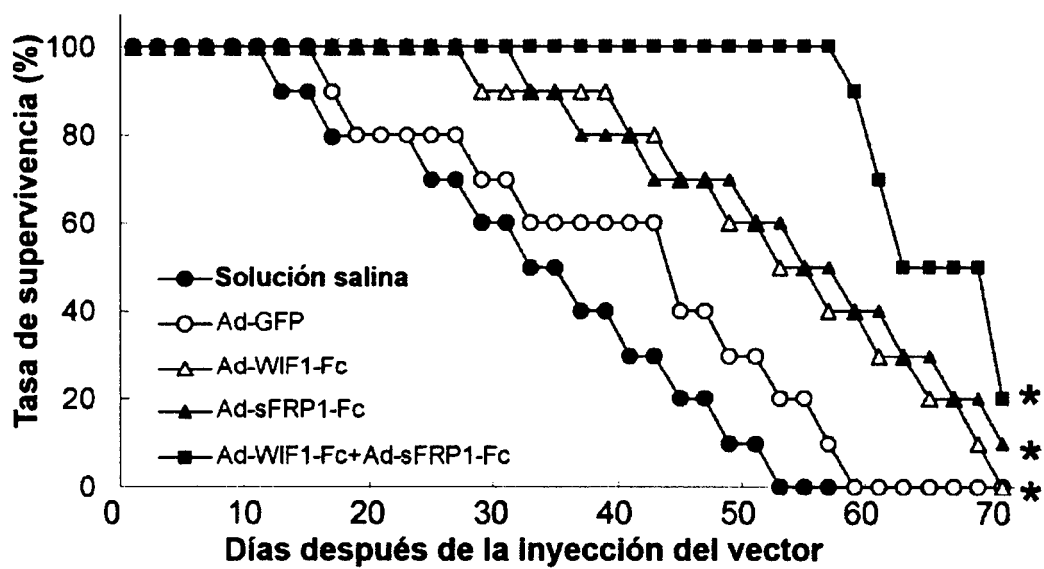


FIGURA 11

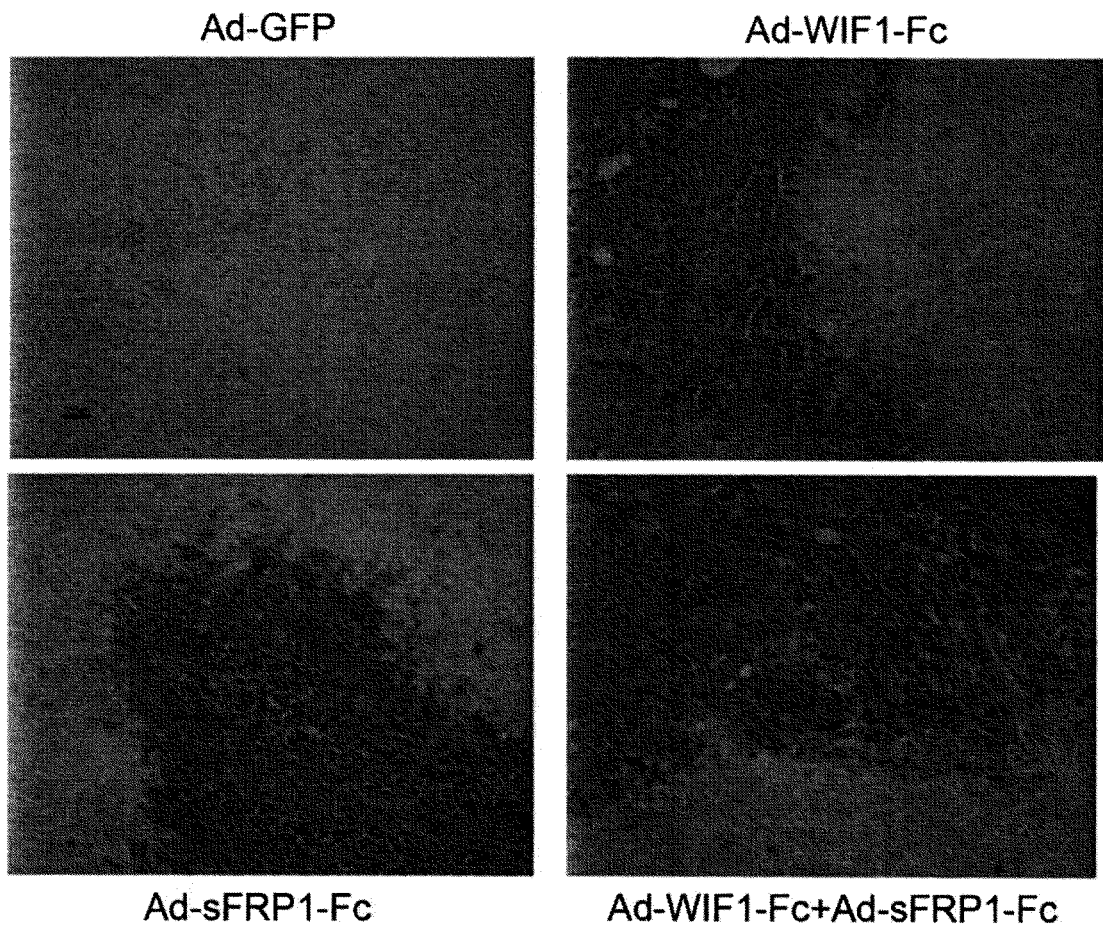


FIGURA 12

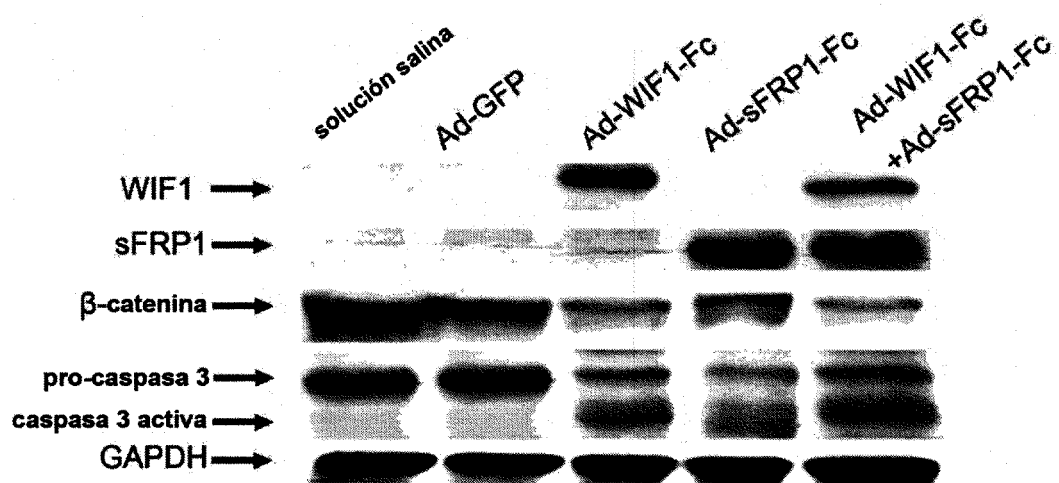


FIGURA 13

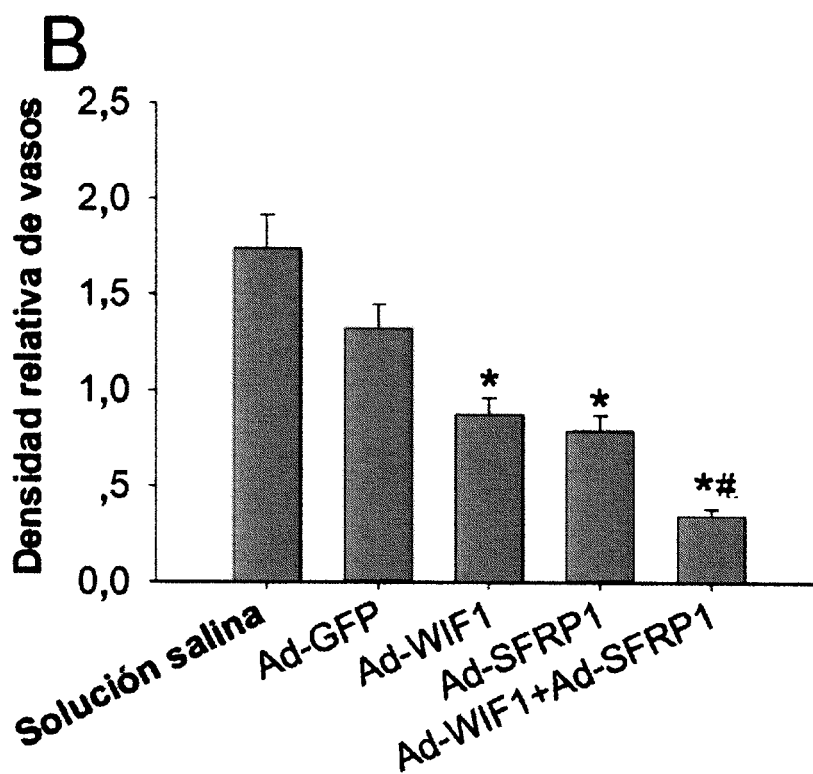
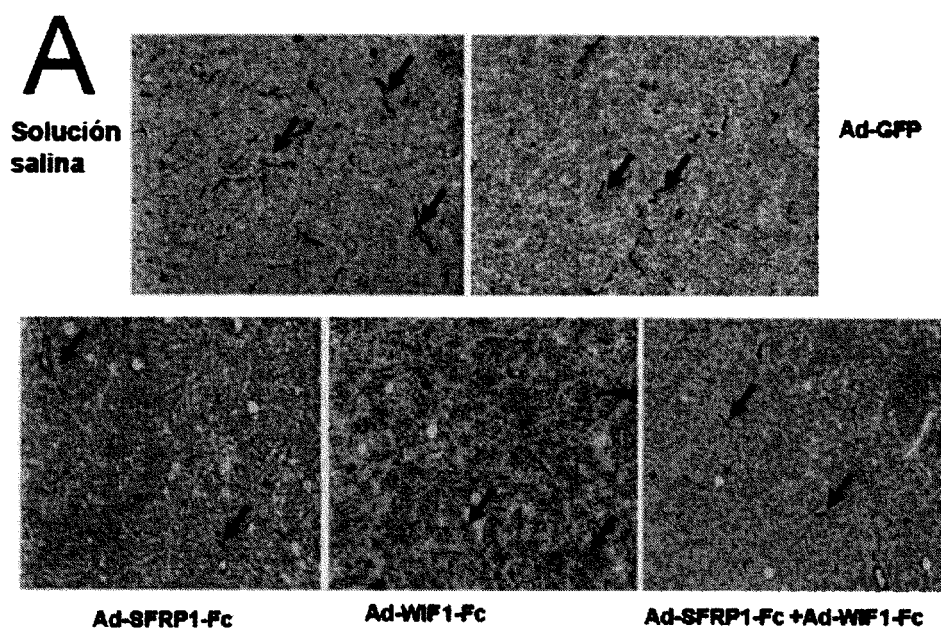


FIGURA 14

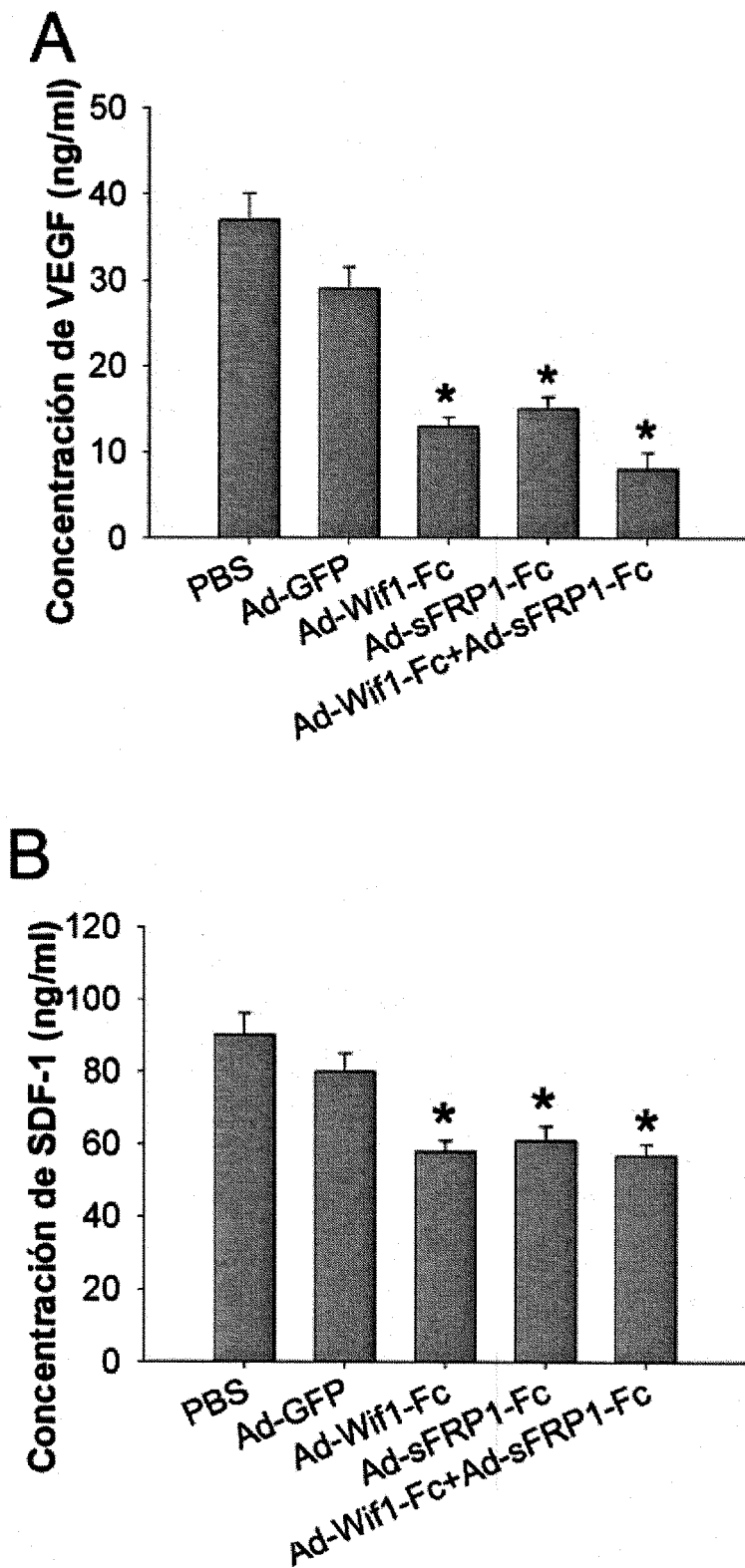


FIGURA 15

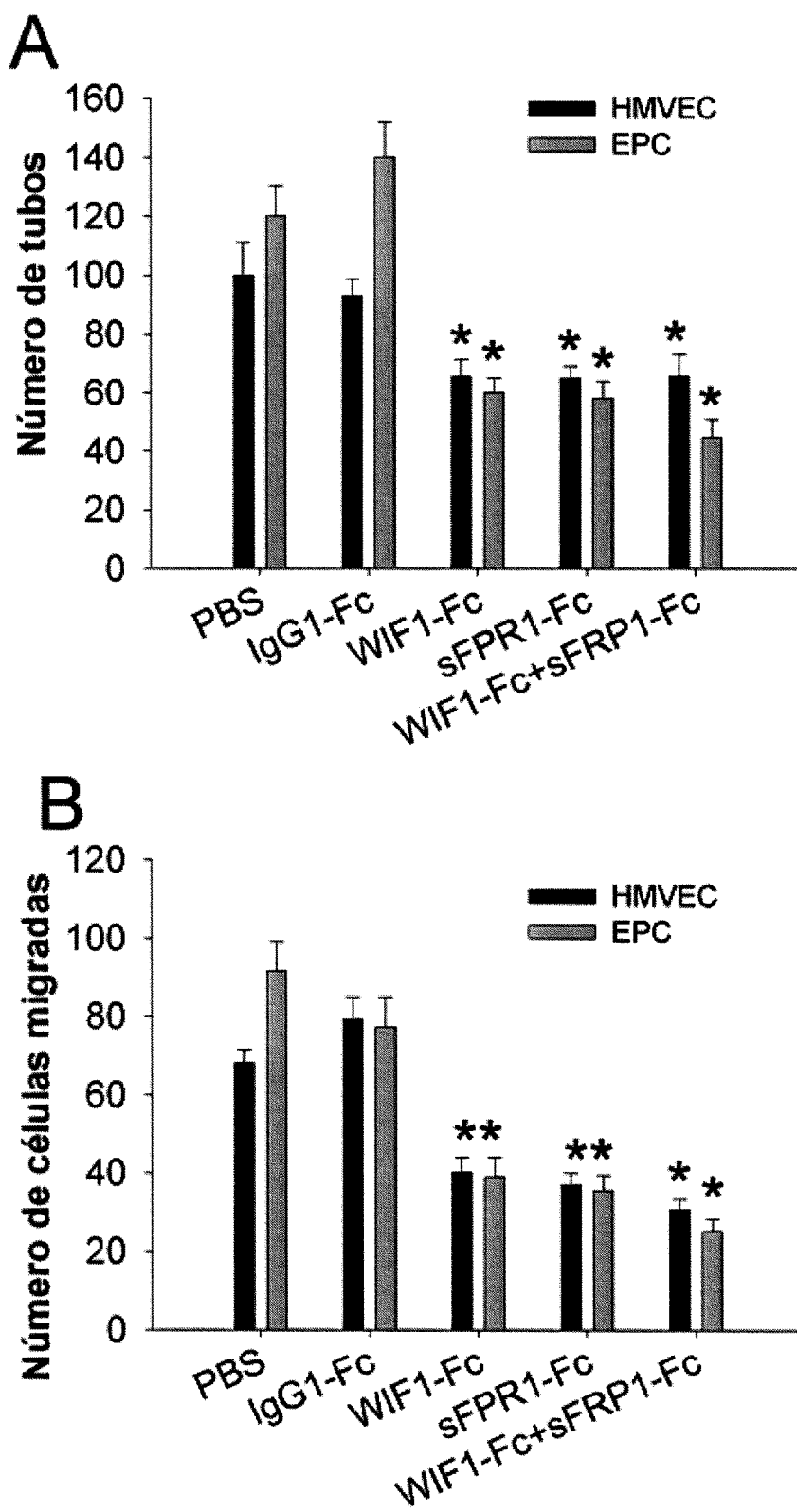


FIGURA 16

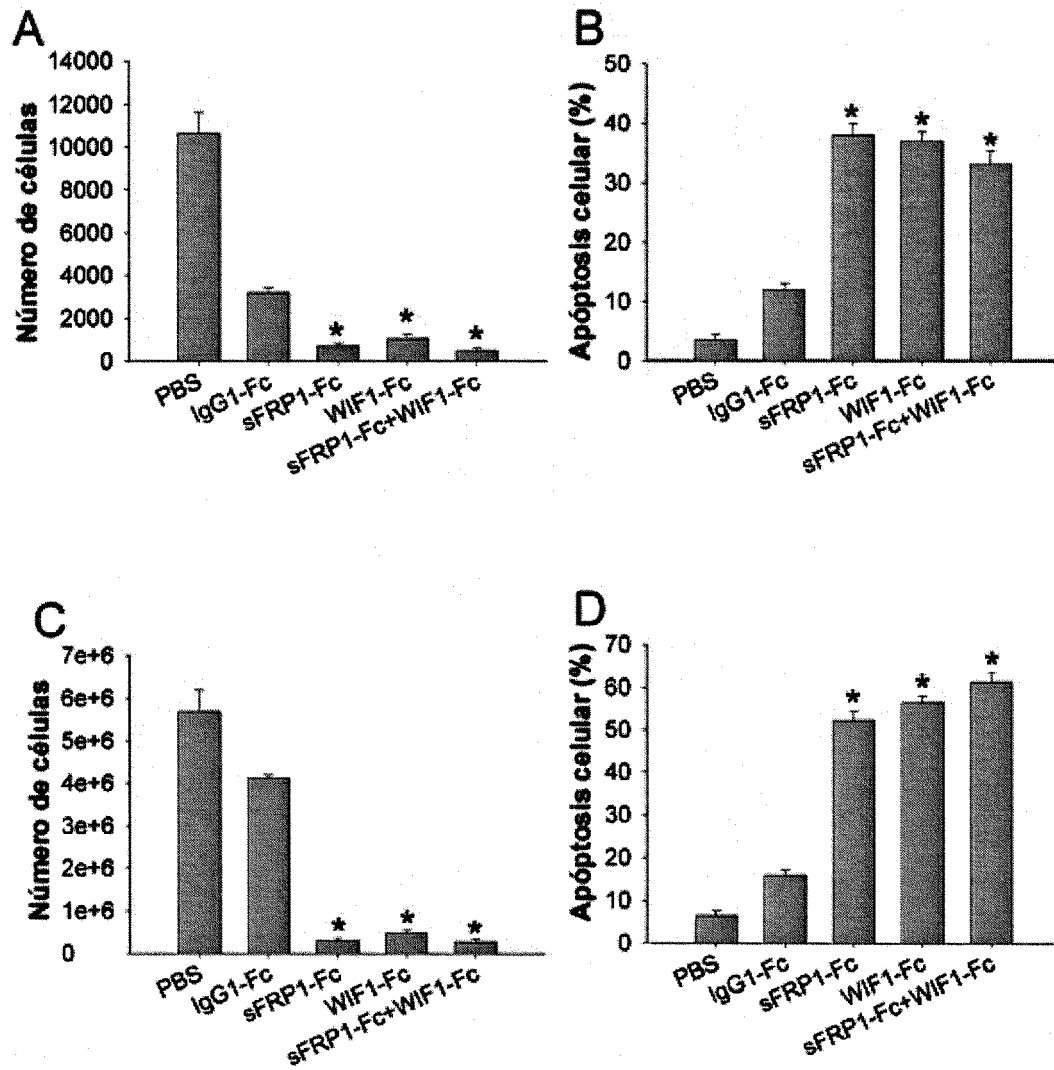


FIGURA 17

# ES 2 334 092 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA S.L.

5 <120> AGENTES ANTIANGIOGÉNICOS

<130> P3765ES

10 <160> 30

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador directo para amplificar el gen de Wnt1

25 <400> 1

cacgacctcg tctacttcga g 21

30

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador inverso para amplificar el gen de Wnt1

40

<400> 2

acagacactc gtgcagtagc a 21

45

<210> 3

<211> 21

50 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

55 <223> Cebador directo para amplificar el gen de Wnt5a

<400> 3

60 acacctcttt ccaaacaggc c 21

<210> 4

<211> 21

65 <212> ADN

<213> Artificial





## ES 2 334 092 A1

<400> 12

cgctcagggg aggaaaacct a 21

5

<210> 13  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> Cebador directo para amplificar el gen de Fzd6

15

<400> 13

cccacttatt gataccttac c 21

20

<210> 14  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

25

<220>  
<223> Cebador inverso para amplificar el gen de Fzd6

30

<400> 14

atgtctgaga aaggtactgt 20

35

<210> 15  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial

40

<220>  
<223> Cebador directo para amplificar el gen de Fzd7

45

<400> 15

50

tttggatgaa aagatttcag gc 22

55

<210> 16  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial

60

<220>  
<223> Cebador inverso para amplificar el gen de Fzd7

65

## ES 2 334 092 A1

<400> 16

5 gaccactgct tgacaagcac ac 22

<210> 17  
<211> 16  
10 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
15 <223> Cebador directo para amplificar el gen de Wif1

<400> 17

20 ccgaaatgga ggcttt 16

<210> 18  
<211> 16  
25 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
30 <223> Cebador inverso para amplificar el gen de Wif1

<400> 18

35 tggttgagca gtttgc 16

<210> 19  
40 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Cebador directo para amplificar el gen de E2F1

<400> 19

50 atgttttcct gtgccctgag 20

55 <210> 20  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

60 <220>  
<223> Cebador inverso para amplificar el gen de E2F1

65

## ES 2 334 092 A1

<400> 20  
5 atctgtggtg agggatgagg 20  
<210> 21  
<211> 20  
10 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
15 <223> Cebador directo para amplificar el gen de ciclina D  
<400> 21  
20 gccacgtctc cacacatcag 20  
<210> 22  
25 <211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
30 <223> Cebador inverso para amplificar el gen de ciclina D  
<400> 22  
35 tcttggcagc aggatagtcc tt 22  
<210> 23  
40 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
45 <220>  
<223> Cebador directo para amplificar el gen de C-myc  
50 <400> 23  
taccctctca acgacagcag 20  
55 <210> 24  
<211> 20  
<212> ADN  
60 <213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador inverso para amplificar el gen de C-myc  
65

# ES 2 334 092 A1

<400> 24

5 tcttgacatt ctccctcgggtg 20

<210> 25

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador directo para amplificar el gen de GAPDH

<400> 25

20 ccaaggtcat ccatgacaac 20

<210> 26

<211> 20

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Cebador inverso para amplificar el gen de GAPDH

<400> 26

35 tgtcatacca ggaaatgagc 20

<210> 27

40 <211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

45 <223> Espaciador peptídico

<400> 27

50 Ser Gly Gly Thr Ser Gly Ser Thr Ser Gly Thr Gly Ser Thr  
1 5 10

<210> 28

<211> 15

60 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

65 <223> Espaciador peptídico

# ES 2 334 092 A1

<400> 28

5 Ala Gly Ser Ser Thr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Gly Ser Thr Thr  
1 5 10 15

<210> 29

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Espaciador peptídico

<400> 29

20 Gly Gly Ser Gly Gly Ala Pro  
1 5

25 <210> 30

<211> 8

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Espaciador peptídico

35 <400> 30

40 Gly Gly Gly Val Glu Gly Gly Gly  
1 5

<210> 31

45 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

50 <220>

<223> Espaciador peptídico

<400> 31

55 Gly Ser Gly Gly Ser  
1 5

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 334 092

② Nº de solicitud: 200802023

③ Fecha de presentación de la solicitud: **02.07.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 2006055635 A2 (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF NEW YORK UNIVERSITY) 26.05.2006, página 3, líneas 11-18; página 7, líneas 7-17; página 9, línea 10 - página 10, línea 22; página 24, línea 3 - página 25, línea 8; reivindicaciones 1-6.	1-15
Y	WO 2005112988 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 01.12.2005, página 3, párrafo 0011; página 9, párrafo 0048 - página 11, párrafo 0057; reivindicaciones 1,2,28,29.	1,12-15
Y	WO 2008031009 A2 (GENENTECH, INC) 13.03.2008, página 3, línea 31 - página 6, línea 4; página 37, línea 24 - página 40, línea 22; reivindicaciones 1-3,6,9,12,19-22,44-50.	1-15
A	WO 2007115376 A1 (THE UNIVERSITY OF WESTERN AUSTRALIA) 18.10.2007, página 3, párrafo 0014 - página 4, párrafo 0021; reivindicaciones 1-9.	1-15

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

18.02.2010

**Examinador**

Mª D. García Grávalos

**Página**

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K 38/17** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**A61P 35/04** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C12N, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

## OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 200802023

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.02.2010

### Declaración

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-15	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

### Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2006055635 A2	26-05-2006
D02	WO 2005112988 A2	01-12-2005
D03	WO 2008031009 A2	13-03-2008
D04	WO 2007115376 A1	18-10-2007

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto técnico de la presente solicitud es una composición que contiene al menos dos antagonistas de Wnt diferentes, definidos como la proteína sFRP1 y el factor de inhibición Wif1. Pueden ser proteínas, péptidos y/o polinucleótidos, a su vez incluidos en un vector o en una célula huésped. Uno de dichos antagonistas puede ser una proteína de fusión, compuesta por un resto de polipéptido antagonista de Wnt y un segundo resto polipeptídico, preferentemente un fragmento Fc de IgG; ambos conectados mediante un enlace simple o un espaciador peptídico (reivindicaciones 1-11). La invención, se refiere también al uso de dicha composición para elaborar una composición farmacéutica, en la que ambos componentes pueden administrarse simultáneamente, por separado o secuencialmente, para uso como medicamento para tratamiento de enfermedades asociadas a angiogénesis o cáncer, preferentemente carcinoma hepatocelular (reivindicaciones 12-15)

El documento D01 divulga composiciones y métodos para tratamiento de cáncer. Especialmente divulga un método para inhibir el crecimiento de una célula tumoral, poniendo en contacto dicha célula con un compuesto que interfiere con la ruta de señalización Wnt, que puede ser un antagonista de Wnt, un antagonista de un receptor de Wnt, o una combinación de ambos. Dicho antagonista de Wnt, puede ser una proteína sFRP y el antagonista del receptor de Wnt, puede ser un polipéptido relacionado con las proteínas Dickkopf-1 (ver página 3, líneas 11-18; página 7, líneas 7-17; página 9, línea 10 - página 10, línea 22; página 24, línea 3 - página 25, línea 8; reivindicaciones 1-6)

El documento D02 divulga composición que contiene el factor Wif1, inhibidor de Wnt, para su uso en un método de inhibición de células cancerígenas y para elaboración de una composición farmacéutica para tratamiento de cáncer (ver página 3, párrafo 0011; página 9, párrafo 0048 -página 11, párrafo 0057; reivindicaciones 1, 2, 28 y 29)

El documento D03 divulga un antagonista de Wnt que contiene un dominio polipeptídico, derivado de una proteína de tipo sFRP o Ror, y otro dominio Fc, relacionado con una inmunoglobulina. Se refiere también a su uso para elaborar composiciones farmacéuticas para diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con alteraciones de la vía de señalización Wnt, incluyendo cáncer (ver página 3, línea 31 - página 6, línea 4; página 37, línea 24 - página 40, línea 22; reivindicaciones 1-3, 6, 9, 12, 19-22, 44-50)

El documento D04 divulga el uso de la proteína sFRP4 en procesos de angiogénesis y en la elaboración de un medicamento y/o composición farmacéutica para prevenir o tratar procesos o enfermedades relacionadas con la angiogénesis (ver página 3, párrafo 0014 - página 4, párrafo 0021; reivindicaciones 1-9)

Hoja adicional

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)

1.1. REIVINDICACIONES 1-15

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa una composición para tratamiento de cáncer que contiene un antagonista de Wnt, que puede ser sFRP1, un antagonista de un receptor de Wnt, o una combinación de ambos. Sin embargo, en este documento no se hace ninguna referencia a que uno de los antagonistas sea el factor de inhibición Wif1.

Según lo expuesto en el documento D01, las reivindicaciones 1-15 cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

2.1. REIVINDICACIONES 1-15

La diferencia entre el documento D01 y el objeto técnico de las reivindicaciones de la presente solicitud, radica en que la composición farmacéutica anticipada en este documento no contiene el factor de inhibición Wif1. Este factor, se encuentra recogido en el documento D02, que divulga composición farmacéutica para tratamiento de cáncer que contiene el factor Wif1, inhibidor de Wnt.

A la vista de los documentos D01 y D02, se considera que sería obvio para un experto en la materia hacer una composición farmacéutica que incluyera un antagonista de Wnt como la proteína sFRP1, y sustituir el antagonista del receptor por otra proteína relacionada y con efecto anticancerígeno como es Wif1.

Por otra parte, el documento D03 anticipa un antagonista de Wnt con un dominio polipeptídico, derivado de una proteína de tipo sFRP y un dominio Fc de IgG; así como su uso para elaborar composiciones farmacéuticas para tratamiento del cáncer. Aunque el documento D01 no incluye ninguna proteína de fusión, a la vista de los documentos D01 y D03 sería obvio para un experto en la materia añadir a uno de los péptidos antagonistas de Wnt, un dominio peptídico como un fragmento Fc de IgG.

En consecuencia, según lo expuesto en los documentos D01-D03, la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-15, carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)

El documento D04, se refiere al estado de la técnica y no se considera relevante en relación con el objeto de la invención.