

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 694 018**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2008 E 15178099 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 3009148**

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

(30) Prioridad:

02.07.2007 US 947611 P

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

17.12.2018

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

GURNEY, AUSTIN

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 694 018 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para el tratamiento y el diagnóstico del cáncer

5 **Antecedentes de la invención**

Campo de la invención

10 La presente divulgación se refiere al campo de la oncología y proporciona composiciones y métodos que son novedosos para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. En particular, la divulgación proporciona los medios y los métodos para caracterizar, estudiar, diagnosticar, proporcionar un pronóstico y tratar cánceres que comprenden células madre de cáncer de tumor sólido.

15 **Antecedentes de la técnica**

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

25 El cáncer de mama es el cáncer más habitual en mujeres, con una estimación del 12 % de las mujeres en situación de riesgo de desarrollar la enfermedad durante su vida. Aunque los índices de mortalidad han disminuido debido a la detección precoz y a mejoras de los tratamientos, el cáncer de mama continúa siendo una causa principal de muerte en las mujeres de mediada edad. Además, el cáncer de mama metastásico sigue siendo una enfermedad incurable. En la presentación, la mayoría de los pacientes con cáncer de mama metastásico tiene solo de uno a dos sistemas orgánicos afectados, pero a medida que avanza la enfermedad, normalmente comienzan a implicarse múltiples sitios. Los sitios de implicación metastásica más habituales son las recurrencias locorregionales en la piel y en los 30 tejidos blandos de la pared torácica, así como en las axilas y en las áreas supraclaviculares. El sitio más habitual de la metástasis distante es el hueso (30 - 40 % de metástasis distante), seguido de los pulmones y el hígado. Y aunque solo aproximadamente el 1-5 % de las mujeres con cáncer de mama recién diagnosticado, tienen metástasis distante en el momento del diagnóstico, aproximadamente el 50 % de los pacientes con enfermedad local reincidente a la larga con metástasis a los cinco años. En la actualidad, la supervivencia media de la manifestación de la 35 metástasis distante es de aproximadamente tres años.

40 Los métodos actuales para el diagnóstico y estadificación del cáncer de mama incluyen el sistema de tumor-nódulo-metástasis (TNM) que se basa en el tamaño del tumor, en la presencia del tumor en los nódulos linfáticos y en la presencia de metástasis distante como se describe en el American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. Philadelphia, Pa.: Lippincott-Raven Publishers, 5^a ed., 1997, págs. 171-180, y en Harris, J R: "Staging of breast carcinoma" in Harris, J. R., Hellman, S., Henderson, I. C., Kinne D. W. (eds.): Breast Diseases. Philadelphia, Lippincott, 1991. Estos parámetros se usan para proporcionar un diagnóstico y seleccionar una terapia apropiada. El aspecto morfológico del tumor también puede evaluarse, pero dado que los tumores con similar aspecto histopatológico pueden presentar una variabilidad clínica significativa, esta estrategia tiene serias 45 limitaciones. Finalmente, se han usado ensayos para marcadores de superficie celular para separar determinados tipos de tumores en subclases. Por ejemplo, un factor que se considera en el pronóstico y en el tratamiento del cáncer de mama es la presencia del receptor de estrógenos (RE) ya que normalmente los cánceres de mama positivos al RE, en comparación con los tumores negativos al RE, responden más fácilmente a terapias hormonales, tales como inhibidores de tamoxifeno o aromatasa. Incluso aunque estos análisis sean útiles, solo son parcialmente 50 predictivos del comportamiento clínico de los tumores de mama, y en los cánceres de mama se presenta una gran diversidad fenotípica que no detectan ni tratan las herramientas de diagnóstico y las terapias actuales.

55 En países desarrollados el cáncer de próstata es el cáncer más habitual en hombres, representando un valor estimado de un 33 % de todos los nuevos casos de cáncer en los Estados Unidos, y es la segunda causa más frecuente de muerte (Jemal *et al.*, 2003, CA Cancer J. Clin. 53: 5-26). Desde que se introdujo el análisis de sangre del antígeno protáctico específico (APE), la detección precoz del cáncer de próstata ha mejorado drásticamente los índices de supervivencia, y el índice de supervivencia de cinco años para pacientes con cánceres de próstata en estadio local y regional en el momento del diagnóstico, casi alcanza el 100 %. Incluso más de la mitad de los pacientes desarrollará eventualmente enfermedad metastásica o localmente avanzada (Muthuramalingam *et al.*, 2004, Clin. Oncol. 16: 505-16).

60 Actualmente, la prostatectomía radical y la radioterapia proporcionan tratamientos curativos para la mayoría de los tumores de próstata localizados. Sin embargo, las opciones terapéuticas están muy limitadas en casos avanzados. Para la enfermedad metastásica, la ablación androgénica con la hormona liberadora de hormona luteinizante (HLHH) agonista, sola o en combinación con anti-andrógenos, es el tratamiento de referencia. Aún a pesar del bloqueo de andrógenos máximo, la enfermedad casi siempre progresó desarrollando en gran parte enfermedad

independiente de andrógenos. Hasta ahora, no hay ningún tratamiento uniformemente aceptado para el cáncer de próstata hormono-refractario y normalmente se utiliza en regímenes quimioterapéuticos (Muthuramalingam *et al.*, 2004, Clin. Oncol. 16: 505-16; Trojan *et al.*, 2005, Anticancer Res. 25: 551-61).

5 El cáncer de pulmón es el cáncer más común en todo el mundo y es el tercer cáncer más habitualmente diagnosticado en los Estados Unidos y, con mucho, la causa más frecuente de muerte por cáncer (Spiro *et al.*, 2002, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166: 1166-96; Jemal *et al.*, 2003, CA Cancer J. Clin. 53: 5-26). Se piensa que el tabaquismo es responsable del 87 % estimado de todos los cánceres de pulmón por lo que es la enfermedad preventible más mortal. El cáncer de pulmón se divide en dos tipos principales, que representan más del 90 % de todos los cánceres de pulmón: cáncer pulmonar microcítico (CPM) y cáncer pulmonar no microcítico (CPNM). El CPM representa el 15-20 % de los casos y se caracteriza por su origen en general en las vías respiratorias centrales y por su composición histológica de láminas de pequeñas células con poco citoplasma. El CPM es más agresivo que el CPNM, desarrollándose rápidamente y metastatizando de manera temprana y frecuente. El CPNM representa el 80-85 % de todas las clases y en función de la histología se divide adicionalmente en tres subtipos principales: 10 adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide) y carcinoma indiferenciado de células grandes.

15 Normalmente el cáncer de pulmón se presenta tarde en su curso, y por tanto, después del diagnóstico, tiene una supervivencia media de tan solo 6-12 meses y un índice de supervivencia global de 5 años de tan solo el 5-10 %. 20 Aunque la cirugía ofrece la mejor oportunidad de cura, tan solo una mínima parte de los pacientes con cáncer de pulmón reúne los requisitos, dependiendo la mayoría de ellos de la quimioterapia y de la radioterapia. A pesar de los intentos realizados para manipular la duración y la intensidad de la dosis de estas terapias, los índices de supervivencia han aumentado poco en los últimos 15 años (Spiro *et al.*, 2002, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166: 1166-96).

25 El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más habitual y la cuarta causa más frecuente de muerte por cáncer en todo el mundo (Weitz *et al.*, 2005, Lancet 365: 153-65). Aproximadamente el 5-10 % de todos los cánceres colorrectales son hereditarios siendo una de las formas principales la poliposis adenomatosa familiar (PAF), una enfermedad dominante autosómica en la que aproximadamente el 80 % de los individuos afectados contienen una mutación en 30 la línea germinal en el gen de la poliposis cólica adenomatosa (PCA). El carcinoma colorrectal tiene tendencia a invadir localmente por crecimiento circunferencial y en cualquier parte por diseminación linfática, hematogena, transperitoneal y perineural. El sitio más habitual de implicación extralinfática es el hígado, siendo los pulmones los órganos extra-abdominales más frecuentemente afectados. Otros sitios de diseminación hematogena incluyen los huesos, riñones, glándulas adrenales y cerebro.

35 El sistema de estadificación actual del cáncer colorrectal se basa en el grado de penetración tumoral a través de la pared intestinal y en la presencia o en la ausencia de implicación nodular. Este sistema de estadificación se define mediante las tres clasificaciones principales de Duke: enfermedad de Duke A, confinada a las capas submucosas del colon o del recto; enfermedad de Duke B con tumores que invaden a través de la *propria muscularis* y que 40 pueden penetrar la pared del colon o del recto; y enfermedad de Duke C que incluye cualquier grado de invasión de la pared intestinal con metástasis de los nódulos linfáticos regionales. Aunque la resección quirúrgica es sumamente eficaz para los cánceres colorrectales de estadio temprano, proporcionando índices de curación del 95 % en pacientes con enfermedad de Duke A, el índice se reduce al 75 % en pacientes con enfermedad de Duke B y la 45 presencia de ganglios linfáticos positivos en la enfermedad de Duke C predice una probabilidad de recurrencia del 60 % al cabo de cinco años. El tratamiento de los pacientes con enfermedad de Duke C con un ciclo de quimioterapia postquirúrgico, reduce el índice de recurrencia al 40-50 % y actualmente es la norma terapéutica para estos pacientes.

50 Los carcinomas epiteliales de cabeza y cuello se originan en las superficies mucosas en la zona de cabeza y cuello y normalmente son, en origen, células escamosas. Esta categoría incluye tumores de los senos paranasales, la cavidad oral y la nasofaringe, orofaringe, hipofaringe y laringe.

55 El número anual de nuevos casos de cánceres de cabeza y cuello en los Estados Unidos es de aproximadamente 40.000 casos por año, representando aproximadamente el 5 por ciento de las neoplasias en adultos. Los cánceres de cabeza y cuello son más habituales en algunos otros países, y la frecuencia a nivel mundial probablemente supera el medio millón de casos anuales. En Norteamérica y en Europa normalmente los tumores se originan en la cavidad oral, orofaringe o laringe, mientras que el cáncer nasofaríngeo es más habitual en los países mediterráneos y en el Extremo Oriente.

60 Los modos de terapia tradicionales (radioterapia, quimioterapia y hormonoterapia), aunque son útiles, se han visto limitados por la aparición de células cancerosas resistentes al tratamiento. Claramente, se necesitan nuevas estrategias para identificar dianas para el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello y generalmente para el tratamiento del cáncer.

65 El cáncer se produce por una mala regulación de los mecanismos que controlan el desarrollo y el mantenimiento de tejidos normales y se piensa cada vez más que las células madre desempeñan una función principal (Beachy *et al.*,

2004, *Nature* 432: 324). Durante el desarrollo normal de los animales, las células de los tejidos más importantes proceden de células precursoras normales, denominadas células madre (Morrison *et al.*, 1997, *Cell* 88: 287-98; Morrison *et al.*, 1997, *Curr. Opin. Immunol.* 9: 216-21; Morrison *et al.*, 1995, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11: 35-71).

5 Las células madre son células que: (1) tienen una amplia capacidad proliferativa; 2) pueden realizar divisiones celulares asimétricas para generar uno o más tipos de descendencia con posibilidad proliferativa y/o de desarrollo reducidos y 3) pueden realizar divisiones celulares simétricas para su autorrenovación o automantenimiento. El ejemplo más conocido de renovación de células adultas mediante la diferenciación de células madre, es el sistema hematopoyético, en el que células precursoras inmaduras desde el punto de vista del crecimiento (células progenitoras y células madre hematopoyéticas) responden a señales moleculares para formar los diversos tipos de 10 células sanguíneas y linfoides. Otras células, incluyendo las células del intestino, del sistema ductal mamario, y de la piel, se están recargando constantemente de una pequeña población de células madre en cada tejido y recientes estudios sugieren que la mayor parte de otros tejidos adultos, incluyendo el cerebro, también albergan células madre.

15 Los tumores sólidos se componen de poblaciones de células heterogéneas. Por ejemplo, los cánceres de mama son una mezcla de células cancerosas y células normales, incluyendo células mesenquimales (estromales), células inflamatorias y células endoteliales. Los modelos clásicos de cáncer sostienen que todas las poblaciones de células cancerosas fenotípicamente distintas, tienen la capacidad de proliferar y generar un nuevo tumor. En el modelo clásico, la heterogeneidad de las células tumorales se debe a factores ambientales, así como a continuas 20 mutaciones que se producen en células cancerosas, dando como resultado una población diversa de células tumorigénicas. Este modelo se basa en la idea de que todas las poblaciones de células tumorales tendrían algún grado de potencial tumorigénico. (Pandis *et al.*, 1998, *Genes, Chromosomes & Cancer* 12: 122-129; Kuukasjärvi *et al.*, 1997, *Cancer Res.* 57: 1597-1604; Bonsing *et al.*, 1993, *Cancer* 71: 382-391; Bonsing *et al.*, 2000, *Genes Chromosomes & Cancer* 82: 173-183; Beerman H *et al.*, 1991, *Cytometry*. 12: 147-54; Aubele M y Werner M, 1999, *Analyt. Cell. Path.* 19: 53; Shen L *et al.*, 2000, *Cancer Res.* 60: 3884).

25 Un modelo alternativo para la heterogeneidad observada de las células de tumor sólido, es que los tumores sólidos son el resultado de una "célula madre de tumor sólido" (o "célula madre cancerosa" de un tumor sólido) que posteriormente experimenta un desarrollo caótico a través de rondas de división celular tanto simétrica como asimétrica. En este modelo de célula madre, los tumores sólidos contienen un subconjunto distinto y limitado (posiblemente incluso inusual) de células que comparten propiedades con "células madre" normales ya que proliferan ampliamente y dan lugar eficazmente a células madre tanto de tumor sólido adicionales (autorrenovación) como a la mayoría de células tumorales de un tumor sólido que carecen de potencial tumorigénico. De hecho, 30 mutaciones dentro de una población longeva de células madre pueden iniciar la formación de células madre cancerosas que son la base del crecimiento y mantenimiento de tumores y cuya presencia contribuye al fracaso de las estrategias terapéuticas actuales.

35 La naturaleza de las células madre del cáncer se reveló primero en el cáncer de sangre, leucemia mieloide aguda (LMA) (Lapidot *et al.*, 1994, *Nature* 17: 645-8). Más recientemente se ha demostrado que los tumores de mama humanos neoplásicos albergan de manera similar una pequeña población diferente de células madre cancerosas enriquecida por su capacidad para formar tumores en ratones inmunodeficientes. Se encontró que la población celular ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin tenía un enriquecimiento de 50 veces más de células tumorigénicas en comparación con las células tumorales no fraccionadas (Al-Hajj *et al.*, 2003, *PNAS* 100: 3983-8). Además, en los 40 cánceres de colon también hay una población similar. La capacidad de aislar de antemano las células cancerosas tumorigénicas ha permitido realizar investigaciones precisas sobre las rutas biológicas críticas que son la base de la tumorigenidad en estas células y por tanto prometen el desarrollo de mejores ensayos de diagnóstico y terapias para los pacientes con cáncer. Es hacia este propósito y hacia los restantes propósitos descritos en el presente 45 documento hacia los que se dirige esta invención.

50 Breve resumen de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

55 La presente divulgación se refiere a composiciones y a métodos del campo de la oncología. En particular, la presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que una proteína LGR (receptor acoplado a proteína G, que contiene repeticiones ricas en leucina), tal como LGR5 (receptor 5 acoplado a proteína G, que contiene repeticiones ricas en leucina) es una proteína que se sobreexpresa en células madre de cáncer de tumor sólido, y por tanto es un marcador de célula madre cancerosa útil en la caracterización, estudio, diagnóstico y tratamiento del cáncer. Adicionalmente la presente invención identifica una interacción entre la R-espondina RSPO1 y el LGR5 60 como una ruta alternativa para la activación de la señalización de la beta catenina, lo que sugiere que el bloqueo funcional de LGR5 que puede inhibir el crecimiento tumoral. Las interacciones entre LGR5 y cada una de las proteínas RSPO adicionales, RSPO2, RSPO3 y RSPO4 también se han identificado ahora.

65 Así pues, en determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona biomoléculas que alteran la señalización funcional mediante una proteína LGR incluyendo, en determinadas realizaciones, moléculas que inhiben la interacción entre la R-espondina (RSPO) y una proteína LGR tal como LGR5. En determinadas

realizaciones, las biomoléculas son anticuerpos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, las biomoléculas pueden ser anticuerpos que se unen específicamente a al menos una proteína RSPO humana o anticuerpos que se unen específicamente al dominio extracelular de al menos una proteína LGR humana. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a al menos una proteína

5 RSPO humana (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro proteínas RSPO humanas) e inhiben el crecimiento de un tumor sólido que comprende células madre de tumor sólido. En determinadas realizaciones, la al menos una proteína RSPO es RSPO1. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a un dominio extracelular de una proteína LGR humana e inhiben el crecimiento de células tumorales. En determinadas realizaciones, la proteína LGR es LGR5. En determinadas realizaciones, la presente

10 divulgación proporciona un receptor de proteína LGR soluble que inhibe el crecimiento de células tumorales. En determinadas realizaciones, el receptor de proteína LGR soluble es un receptor LGR5 soluble.

La presente divulgación también proporciona métodos de tratamiento del cáncer que comprende células madre cancerosas. En determinadas realizaciones, el método de tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína RSPO humana. En determinadas realizaciones, la al menos una proteína RSPO es RSPO1. En determinadas

15 realizaciones, el método de tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un dominio extracelular de una proteína LGR. En determinadas realizaciones, la proteína LGR es LGR5. En determinadas realizaciones, el método de tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un receptor de proteína LGR soluble (por ejemplo asociado a membrana, no transmembrana). En determinadas realizaciones, el receptor de proteína LGR soluble es un receptor LGR5 soluble.

20 La presente divulgación también proporciona un método de tratamiento del cáncer en un ser humano y/o de inhibición del crecimiento de un tumor en un ser humano que comprende administrar al ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que (a) altere la unión de una proteína RSPO humana con una proteína LGR humana y/o (b) altere la activación de la señalización de LGR por RSPO. En algunas realizaciones, el agente es un

25 anticuerpo. En determinadas realizaciones, el agente se une a una proteína RSPO humana. En determinadas realizaciones, el agente se une a una proteína LGR humana. En determinadas realizaciones, el agente es un anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína RSPO humana. En determinadas realizaciones alternativas, el agente es un anticuerpo que se une específicamente a dos o más proteínas RSPO humanas. En determinadas realizaciones alternativas, el agente es un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de al menos una proteína LGR humana. En determinadas realizaciones alternativas, el agente es un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de dos o más proteínas LGR humanas. En

30 35 determinadas realizaciones, el agente es un receptor soluble que comprende el dominio extracelular de una proteína LGR humana. En determinadas realizaciones, la proteína LGR es LGR5. En determinadas realizaciones, el cáncer o el tumor comprende células madre cancerosas.

40 Asimismo, la presente divulgación proporciona un método de inhibición de la señalización de la beta catenina en una célula tumoral, que comprende poner en contacto la célula tumoral con un agente que (a) altere la unión de una proteína RSPO humana con una proteína LGR y/o (b) altere la activación de la señalización de LGR por RSPO. En determinadas realizaciones, el agente se une a una proteína RSPO humana. En determinadas realizaciones, el agente se une a una proteína LGR humana. En determinadas realizaciones alternativas, el agente es un anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína RSPO humana. En determinadas realizaciones alternativas, el agente es un anticuerpo que se une específicamente a dos o más proteínas RSPO humanas. En determinadas

45 realizaciones alternativas, el agente es un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de al menos una proteína LGR humana. En determinadas realizaciones alternativas, el agente es un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de dos o más proteínas LGR humanas. En determinadas realizaciones alternativas, el agente es un receptor soluble que comprende el dominio extracelular de una proteína LGR humana. En determinadas realizaciones, la proteína LGR es LGR5. En determinadas realizaciones, el método es un método *in vitro*. En determinadas realizaciones, el método es un método *in vivo*.

50 Adicionalmente la presente invención proporciona anticuerpos que se unen a un dominio extracelular de una proteína LGR o LGR6 humana y que pueden inhibir el crecimiento de un tumor sólido (por ejemplo, un tumor sólido que comprende células madre de tumor sólido) a través de (a) la alteración de la unión de una proteína RSPO humana con una proteína LGR humana; (b) la alteración de la activación de la señalización de LGR por RSPO, y/o

55 (c) la inhibición de la señalización de la beta catenina. La presente invención también proporciona anticuerpos que (a) se unen a un dominio extracelular de una proteína LGR4, LGR5 o LGR6 humana; (b) alteran la unión de una proteína RSPO humana con una proteína LGR humana; (c) alteran la activación de la señalización de LGR por RSPO; (d) inhiben la señalización de la beta catenina; y/o (e) pueden inhibir el crecimiento de un tumor sólido (por ejemplo, un tumor sólido que comprende células madre de tumor sólido). En determinadas realizaciones, la proteína RSPO humana es RSPO1. En algunas realizaciones alternativas, la proteína RSPO humana es RSPO2, RSPO3 o RSPO4. Adicionalmente se proporcionan líneas celulares que producen los anticuerpos y composiciones que comprenden los anticuerpos. También se proporcionan métodos para el uso de cantidades terapéuticamente eficaces de composiciones que comprenden los anticuerpos para el tratamiento del cáncer, que incluyen, pero sin limitación, la inhibición del crecimiento de un tumor. También se proporcionan métodos para el uso de los

anticuerpos *in vivo* o *in vitro*, para inhibir la señalización de la beta catenina.

Adicionalmente, la presente divulgación también proporciona anticuerpos que se unen a una proteína RSPO humana y que pueden inhibir el crecimiento de un tumor sólido (por ejemplo, un tumor sólido que comprende células madre de tumor sólido) a través de (a) la alteración de la unión de una proteína RSPO humana con una proteína LGR4, LGR5 o LGR6 humana; (b) la alteración de la activación de la señalización de LGR por RSPO, y/o (c) la inhibición de la señalización de la beta catenina. Como alternativa, la presente invención también proporciona anticuerpos que (a) se unen a una proteína RSPO humana; (b) alteran la unión de una proteína RSPO humana con una proteína LGR4, LGR5 o LGR6 humana; (c) alteran la activación de la señalización de LGR por RSPO; (d) inhiben la señalización de la beta catenina y/o (e) pueden inhibir el crecimiento de un tumor sólido (por ejemplo, un tumor sólido que comprende células madre de tumor sólido). En determinadas realizaciones, los anticuerpos se unen específicamente a una proteína RSPO humana. En determinadas realizaciones la proteína RSPO humana es RSPO1. En algunas realizaciones alternativas, la proteína RSPO humana es RSPO2, RSPO3 o RSPO4. En determinadas realizaciones, la proteína LGR humana es LGR5. También se proporcionan líneas celulares que producen los anticuerpos y las composiciones que comprenden los anticuerpos. Adicionalmente se proporcionan métodos para el uso de cantidades terapéuticamente eficaces de composiciones que comprenden los anticuerpos para el tratamiento del cáncer incluyendo, pero sin limitación, la inhibición del crecimiento de un tumor. También se proporcionan métodos para el uso de los anticuerpos, *in vivo* o *in vitro*, para inhibir la señalización de la beta catenina.

La divulgación proporciona adicionalmente un anticuerpo anti-LGR5 monoclonal, 88M1, producido por una línea de células de hibridoma que tiene el número de depósito FTA-9341 en la ATCC. También se proporcionan anticuerpos que se unen específicamente a LGR5 y que comprenden (a) una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 95 % con la región variable de cadena pesada y/o con la región variable de cadena ligera (respectivamente) de 88M1; (b) las CDR de cadena pesada y/o cadena ligera de 88M1; (c) se unen a un epítopo que puede unirse a 88M1; y/o (d) compiten con 88M1 en un ensayo de unión competitiva. También se proporcionan líneas celulares que producen los anticuerpos (incluyendo, pero sin limitación, la línea celular de hibridoma que tiene el número de depósito FTA-9341 en la ATCC) y las composiciones que comprenden los anticuerpos. Adicionalmente se proporcionan métodos para el uso de cantidades terapéuticamente eficaces de composiciones que comprenden los anticuerpos para el tratamiento del cáncer, incluyendo, pero sin limitación, la inhibición del crecimiento de un tumor. También se proporcionan métodos para el uso de los anticuerpos, *in vivo* o *in vitro*, para inhibir la señalización de la beta catenina.

La presente divulgación proporciona adicionalmente métodos de identificación y/o de aislamiento de células madre cancerosas (por ejemplo, basándose en la expresión de LGR5), de cribado de agentes anticancerosos y de cribado de pacientes para el tratamiento idóneo con los agentes descritos en el presente documento.

Cuando se describen aspectos o realizaciones de la invención en términos de un grupo de Markush u otros grupos de alternativas, la presente invención no solo incluye todo el grupo indicado como un conjunto, sino también cada miembro del grupo individualmente y todos los posibles subgrupos del grupo principal, y también el grupo principal sin uno o más de los miembros del grupo. La presente invención también contempla la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la invención reivindicada.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. LGR5 se sobreexpresa en células madre de cáncer de tumor sólido. Mediante FACS se separaron células de tumores de colon humano que contenía células madre cancerosas, en una fracción "TG" tumorigénica (barras de la derecha) y en una fracción "NTG" no tumorigénica (barras de la izquierda). Se aisló ARNm de estas fracciones y se generaron datos de micromatriz. LGR5 demostró expresión de ARNm más alta en la fracción TG de células madre cancerosas de tres tumores de colon humano independientes (barra de la derecha de cada conjunto).

Figura 2. LGR5 se sobreexpresa en tumores epiteliales humanos. Se muestran datos de micromatriz de la expresión de ARNm de LGR5 de una gran cantidad de tumores humanos en comparación con muestras tisulares de tejidos humanos normales. El nivel de expresión de LGR5 en muestras de pacientes individuales se indica mediante líneas discontinuas verticales en el eje horizontal de cada tipo de tejido. LGR5 se sobreexpresa en la mayoría de las muestras tumorales con respecto a la expresión en el tejido normal correspondiente.

Figura 3. LGR6 muestra expresión alterada en tumores epiteliales humanos. Se muestran datos de micromatriz de la expresión de ARNm de LGR6 de una gran cantidad de tumores humanos en comparación con muestras tisulares de tejidos humanos normales. El nivel de expresión de LGR6 en muestras de pacientes individuales se indica mediante líneas discontinuas verticales en el eje horizontal de cada tipo de tejido. La expresión de LGR6 muestra expresión alterada en muchas muestras de tumor con respecto a la expresión en el tejido normal correspondiente.

Figura 4. RSPO1 activa la señalización de la beta catenina. La actividad luciférica (eje y) de un indicador de luciférica, 8xTCF, se midió después de exposición a RSPO1-Fc a la concentración indicada (eje x). RSPO1-Fc indujo la actividad luciférica del promotor sensible a la beta catenina de una manera dependiente de la dosis.

Figura 5. LGR5 (LGR5-Fc) soluble inhibe la inducción de la señalización de la beta catenina mediante RSPO1.

La actividad luciferasa (eje y) de células transfectadas con un indicador de luciferasa 8xTCF se midió en respuesta a la exposición al medio de control (cuadrados, sin RSPO) o a RSPO1-Fc en combinación con concentraciones en aumento de LGR5 soluble (rombos, RSPO 2,5 ug).

Figura 6. LGR5 Soluble, pero no FZD10 soluble, inhibe la inducción sinérgica de la señalización de la beta catenina mediante RSPO1 y Wnt3A. A) LGR5 soluble inhibe la inducción sinérgica de la señalización de la beta catenina mediante RSPO1 y Wnt3A. La actividad Luciferasa (eje y) de células transfectadas con un indicador de luciferasa 8xTCF se midió en respuesta a la exposición al medio de control (rombos, LCM); RSPO1 y LCM (cuadrados, RSPO + LCM); Wnt3A (triángulos) y RSPO1 más Wnt3A (cruces). Concentraciones en aumento de LGR5 soluble (eje x) redujeron la inducción sinérgica de la actividad luciferasa por RSPO1 y Wnt3A. B) FZD10 soluble no inhibe la inducción sinérgica de la señalización de la beta catenina por RSPO1 y Wnt3A. La actividad luciferasa (eje y) de células transfectadas con un indicador de luciferasa 8xTCF se midió en respuesta a la exposición al medio de control (rombos, LCM); RSPO1 y LCM (cuadrados, RSPO + LCM); Wnt3A (triángulos); y RSPO1 más Wnt3A (cruces). Concentraciones en aumento de LGR5 (eje x) redujeron la inducción sinérgica de la actividad luciferasa por RSPO1 y Wnt3A.

Figura 7. RSPO1 activa la señalización de la beta catenina a través de la Unión a LGR5. A) Células HEK 293 transfectadas de modo transitorio con RSPO1-CD4TM y GFP se incubaron con LGR5-Fc, LRP6FL-Fc, LRP6E1-2-Fc o FZD1-10-Fc como se indica. Los análisis FACS basados en GFP (eje x) y la unión a la proteína de fusión Fc (eje y) demostraron unión entre RSPO1 y LGR5 (parte superior izquierda). RSPO1 solo se unió débilmente a LRP6 y no pudo interaccionar con ninguna FZD. B) Células HEK 293 transfectadas de manera transitoria con FLAG-LGR5-CD4TM y GFP se incubaron en presencia de heparina con (por duplicado) RSPO1-Fc (parte superior), FZD8-Fc (parte central) o un anticuerpo FLAG como control positivo (parte inferior). Los análisis FACS basados en GFP (eje x) y la unión a la proteína de fusión Fc (eje y) demostraron unión entre RSPO1 y LGR5 pero no con FZD8. C) Todos los miembros de la familia RSPO pudieron unirse a LGR5. Células HEK 293 transfectadas de modo transitorio con FLAG-LGR5-CD4TM y GFP se incubaron en presencia de heparina con RSPO1-Fc, RSPO2-Fc, RSPO3-Fc, RSPO4-Fc, FZD8-Fc, o con un anticuerpo FLAG, como control positivo, como se indica. Los análisis FACS basados en GFP (eje x) y la unión a la proteína de fusión Fc (eje y) demostraron unión entre cada miembro de la familia RSPO y LGR5 como se indica mediante la señal FACS dentro del cuadrante en recuadro en el lado superior derecho de cada gráfica FACS.

Figura 8. Identificación de los mAb (anticuerpos monoclonales) contra LGR5. Células HEK 293 transfectadas de manera transitoria con FLAG-LGR5-CD4TM y GFP se incubaron con un anticuerpo irrelevante como anticuerpo negativo (control IgG1) o con un anticuerpo anti FLAG como control positivo para la expresión de LGR5, o los mAb contra LGR5 (88M1, 88M5), seguido de incubación con reactivo anti-mAb secundario fluorescente conjugado con PE (ficoeritrina). Después, las muestras se realizaron mediante citometría de flujo. Se descubrió que 88M1 y 88M5 presentaban unión específica a LGR5.

Figura 9. Identificación del mAb que inhibe la unión de RSPO a LGR5. Células HEK 293 transfectadas de modo transitorio con FLAG-LGR5-CD4TM y GFP. La unión de la proteína de fusión RSPO1-Fc con células transfectadas se detectó por incubación con anti-Fc humano conjugado con PE. El impacto del anticuerpo anti-LGR5, 88M1, sobre la unión con RSPO se evaluó por incubación de las células con 88M1 como se indica y con análisis de citometría de flujo. El experimento muestra que 88M1 reduce la unión de RSPO1 con LGR5.

40 Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona composiciones y métodos para caracterizar, estudiar, diagnosticar y tratar el cáncer. En particular, la presente divulgación proporciona la proteína LGR5 como un marcador de células madre de cáncer de tumor sólido e identifica una nueva interacción entre LGR5 y una proteína RSPO, RSPO1, (así como RSPO2, RSPO3, y RSPO4) como una ruta alternativa para la activación de la señalización de la beta catenina. La manipulación de esta ruta de señalización de LGR5, incluyendo la alteración de la señalización funcional de LGR5, proporciona nuevas composiciones y métodos novedosos para el tratamiento del cáncer.

50 La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de células madre de tumor sólido (también denominadas células madre cancerosas o células madre cancerosas de tumor sólido) como un subconjunto distinto y limitado de células dentro de la población celular heterogénea de tumores sólidos establecidos. Estas células madre cancerosas comparten las propiedades de las células madre normales ya que proliferan ampliamente y dan lugar eficazmente a células madre tanto de tumor sólido adicionales (autorrenovación) como a la mayoría de células tumorales de un tumor sólido que carecen de potencial tumorigénico. La identificación de células madre cancerosas se basa en 1) su expresión de un patrón exclusivo de receptores de superficie celular usados para aislarlas de la mayoría de las células tumorales no tumorigénicas y 2) sus propiedades de autorrenovación y proliferación, evaluadas en modelos animales de xenoinjerto.

60 En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona de este modo un método para direccionar de modo selectivo agentes diagnósticos o terapéuticos contra células madre cancerosas. En determinadas realizaciones, la divulgación también proporciona un agente, tal como una biomolécula, que se dirige selectivamente a células madre cancerosas (por ejemplo, se dirige a uno de los marcadores de cáncer de células madre de cáncer de colon desvelados en el presente documento). En determinadas realizaciones, el marcador de cáncer de células madre dirigido es parte de una ruta de autorrenovación o de supervivencia celular. En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para cribar agentes anticancerosos; para el ensayo de terapias

anticancerosas; para el desarrollo de fármacos que se dirigen a nuevas rutas; para la identificación de nuevas dianas terapéuticas contra el cáncer; para la identificación y diagnóstico de células neoplásicas en especímenes patológicos; para el ensayo y evaluación de la sensibilidad de fármacos contra células madre de tumor sólido; para la medición de factores específicos que predicen la sensibilidad de fármacos; y para la cribado de pacientes (por ejemplo, como un adyuvante para mamografía).

En la solicitud de patente PCT WO 02/12447, publicada por el Regents of the University of Michigan y en la solicitud de patente PCT, PCT/US02/39191, del Regents of the University of Michigan se ofrece una orientación adicional con respecto a células madre cancerosas.

La presente divulgación identifica la expresión de células madre cancerosas ya que comprenden niveles elevados de LGR5 (receptor 5 acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina) en comparación con células tumorales no tumorigénicas. LGR5 es un miembro de una pequeña familia de proteínas huérfanas de siete dominios transmembrana con dominios extracelulares relativamente grandes que incluye LGR4, LGR5 y LGR6.

La presente invención también identifica una interacción entre RSPO1 y LGR5 que activa una ruta de señalización alternativa de la beta catenina. Las R-espondinas (RSPO) son una familia de cuatro proteínas pequeñas secretadas que se ha reconocido recientemente que estimulan a la beta catenina de una manera similar a la señalización de Wnt. Cabe destacar, que las proteínas Wnt y RSPO muestran profundo sinergismo. Recientemente se ha sugerido que la activación de la beta catenina mediante RSPO está mediada a través de miembros de la familia de receptores Frizzled y de la familia de correceptores LRP5, 6 (Nam *et al.*, 2006, JBC 281: 13247-57). La presente invención identifica a LGR5 como un receptor para RSPO.

Desde hace tiempo a la ruta de señalización Wnt se la ha implicado con cáncer debido a la presencia de mutaciones que activan la ruta en determinados tumores (por ejemplo mutaciones en el gen de la PCA (poliposis cólica adenomatosa) en cáncer de colon y por la capacidad que tienen determinadas WNT para dirigirse al cáncer cuando se expresan como transgenes constitutivos o después de inserción retroviral (por ejemplo, el modelo de tumor de mama Wnt1). Sin embargo, sorprendentemente, resulta difícil conseguir pruebas reales de que las propias proteínas Wnt se dirigen a cualquier tumor humano espontáneo.

La presente invención identifica una ruta alternativa mediante proteínas RSPO y proteínas LGR que pueden dar lugar a la activación de la beta catenina en células tumorales. Sin ceñirse a la teoría, el modelo sugiere que los miembros de la familia de receptores LGR pueden actuar como un “reostato” que regula el nivel de la beta catenina en respuesta a Wnt debido al profundo sinergismo observado demostrado por la R-espondina y la Wnt en la inducción de la beta catenina. Dado que los tumores exhiben niveles notablemente elevados de LGR5, estos pueden demostrar en consecuencia beta catenina elevada en presencia de niveles “normales” de proteínas Wnt.

Basándose en parte en estos descubrimientos, la presente divulgación proporciona, en determinadas realizaciones, agentes que alteran la unión de al menos una proteína RSPO humana con al menos una proteína LGR (por ejemplo, LGR5). En determinadas realizaciones, los agentes alteran la activación de la señalización de LGR por RSPO. En realizaciones adicionales, los agentes inhiben el crecimiento tumoral, incluyendo el crecimiento de tumores sólidos que comprenden células madre cancerosas. En algunas realizaciones, los agentes son anticuerpos que se unen específicamente a al menos una proteína RSPO o inhiben al menos una proteína LGR. En algunas realizaciones, los agentes son anticuerpos que se unen específicamente a dos o más proteínas RSPO o que se unen a dos o más proteínas LGR. Adicionalmente se proporcionan composiciones que comprenden estos agentes y su uso en el tratamiento de cánceres (especialmente, pero sin limitación, los que implican células madre cancerosas).

Definiciones

Para facilitar un entendimiento de la presente invención, a continuación se definen diversos términos y frases:

Un “anticuerpo” es una molécula de inmunoglobulina que reconoce una diana y se une específicamente a ella, tal como una proteína, un polipéptido, un péptido, un carbohidrato, un polinucleótido, un lípido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. De la forma en la que se usa en el presente documento, el término se usa en el más amplio sentido e incluye anticuerpos policloniales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpo (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), mutantes de Fv monocatenario (scFv, *single chain Fv*), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno siempre que los anticuerpos muestren la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2), basándose en la identidad de sus dominios constantes de la cadena pesada denominadas alfa, beta, epsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras subunitarias diferentes y bien conocidas y configuraciones tridimensionales. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos desnudos o pueden conjugarse con otras moléculas, tales como toxinas, radioisótopos, etc.

De la forma en la que se usa en el presente documento, la expresión "fragmentos de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios; péptidos Fc o Fc', fragmentos Fab y Fab' y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

5 De la forma en la que se usa en el presente documento, formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) son anticuerpos químéricos que contienen secuencias mínimas, o que no contienen secuencias, procedentes de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco (FR, *framework*) conservada Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan generalmente para refinar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los restos FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. En la Patente de Estados Unidos 5.225.539 de Winter *et al.*, se describen ejemplos de métodos usados para generar anticuerpos humanizados.

25 La expresión "anticuerpo humano", de la forma en la que se usa en el presente documento, significa un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano fabricado utilizando cualquiera de las técnicas conocidas en la materia. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, sus fragmentos y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada y/o ligera humana tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena pesada humana y cadena ligera murina.

30 Los "anticuerpos híbridos" son moléculas de inmunoglobulina en las que los pares de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos con diferentes regiones determinantes antigenicas se ensamblan entre sí de tal manera que dos epítopos diferentes o dos antígenos diferentes pueden reconocerse y unirse mediante el tetrámero resultante.

35 La expresión "anticuerpos químéricos" se refiere a anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina procede de dos o más especies. Normalmente, la región variable de las cadenas tanto ligera como pesada corresponde a la región variable de los anticuerpos procedentes de una especie de mamífero (por ejemplo ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas aunque las regiones constantes sean homólogas a las secuencias en los anticuerpos procedentes de otro (normalmente ser humano) para evitar suscitar una respuesta inmunitaria en esa especie.

40 El término "epítopo" o la expresión "determinante antigenico" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren la parte de un antígeno que puede reconocer un anticuerpo particular y con la que puede unirse. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítopos pueden formarse a partir de aminoácidos tanto contiguos como no contiguos yuxtapuestos mediante un plegamiento terciario de una proteína. Generalmente, los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se conservan después de la desnaturización de la proteína, mientras que los formados mediante un plegamiento terciario se pierden después de dicha desnaturización. Generalmente, un epítopo incluye al menos 3, y más normalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Un determinante antigenico puede competir con el antígeno intacto (es decir, el inmunógeno "usado para suscitar la respuesta inmunitaria) por la unión con el anticuerpo.

50 Que un anticuerpo se "una específicamente con" o que muestre "unión específica hacia" un epítopo significa que el anticuerpo reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, durante más tiempo y/o con mayor afinidad, con el epítopo que con sustancias alternativas. De la forma en la que se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente" significa que un anticuerpo se une a una proteína con una K_D de al menos 55 aproximadamente 0,1 mM, al menos aproximadamente 1 μ M, al menos aproximadamente 0,1 μ M o más, o 0,01 μ M o más. Se entiende que un anticuerpo o fracción de unión, que se une específicamente a una primera diana, puede unirse específicamente o no a una segunda diana. Como tal, la "unión específica" no requiere necesariamente (aunque pueda incluir) unión exclusiva, es decir unión a una sola diana. Generalmente, aunque no necesariamente, cuando se hace alusión a una unión significa una unión específica.

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

De la forma en la que se utiliza en el presente documento, la expresión "dominio de unión a receptor" se refiere a cualquier ligando nativo para un receptor, incluyendo moléculas de adhesión celular, o cualquier región o derivado de dicho ligando nativo que conserve al menos una capacidad de unión al receptor cualitativa de un ligando nativo correspondiente.

5 De la forma en la que se utiliza en el presente documento, la expresión "quimera de inmunoadhesina-anticuerpo" comprende una molécula que combina al menos un dominio de unión de un anticuerpo con al menos una inmunoadhesina. Como ejemplos se incluyen, pero sin limitación, las quimeras CD4-IgG biespecíficas descritas en Berg *et al.*, PNAS (USA) 88: 4723-4727 (1991) y en Charnow *et al.*, J. Immunol., 153: 4268 (1994).

10 El término "enriquecido(a)", como se indica cuando se hace referencia a una población de células enriquecida, puede definirse fenotípicamente en función del número de células aumentado que tiene un marcador particular (por ejemplo, como se muestra en la Tabla 1) en un conjunto de células fraccionadas en comparación con el número de células que tiene el marcador en el conjunto de células no fraccionadas. Sin embargo, el término "enriquecido(a)" 15 puede definirse funcionalmente mediante una función tumorigénica como el número de células mínimo que forma tumores a una frecuencia de dilución limitante en ratones de ensayo. Por ejemplo, si 500 células madre tumorales forman tumores en el 63 % de los animales de ensayo, pero se necesitan 5000 células tumorales no fraccionadas para formar los tumores en el 63 % de los animales de ensayo, entonces la población de células madre de tumor sólido está 10 veces más enriquecida con actividad tumorigénica. Los marcadores de cáncer de células madre de la 20 presente divulgación pueden utilizarse para generar poblaciones de células madre enriquecidas. En algunas realizaciones, la población de células madre está enriquecida al menos 1,4 veces con respecto a las células tumorales no fraccionadas. En otras realizaciones, la población de células madre está enriquecida de 2 a 4 veces más con respecto a las células tumorales no fraccionadas. En realizaciones adicionales, la población de células madre está 20 veces más enriquecida con respecto a células tumorales no fraccionadas.

25 En lo que respecta a células, el término "aislado", se refiere a una célula que se retira de su medio natural (tal como en un tumor sólido) y que se aísla o se separa, y que está libre de al menos aproximadamente un 30 %, 50 %, 75 % o aproximadamente un 90 % de otras células con las que está presente de manera natural, pero que carece del marcador basándose en lo cual se aislaron las células. Los marcadores de cáncer de células madre de la presente 30 divulgación pueden utilizarse para generar poblaciones aisladas de células madre cancerosas.

35 De la forma en la que se usa en el presente documento, los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos en los que una población de células se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de 40 cabeza y cuello.

45 "Metástasis" de la forma en la que se usa en el presente documento se refiere al proceso mediante el cual un cáncer se disemina o se transfiere desde el lugar de origen a otras regiones del organismo con el desarrollo de una lesión cancerosa similar en el nuevo lugar. Una célula "metastásica" o "metastatizante" es una que pierde contactos adhesivos con células contiguas y migra a través de la corriente sanguínea o la linfa desde el lugar primario de la enfermedad invadiendo estructuras corporales contiguas.

50 De la forma en la que se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, primates no humanos, roedores y similares, que será el receptor de un tratamiento particular. Normalmente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento en referencia a un sujeto humano.

55 De la forma en la que se usa en el presente documento, la expresión "sujeto que se sospecha que tiene cáncer" se refiere a un sujeto que presenta uno o más síntomas indicativos de un cáncer (por ejemplo, un bulto o una masa perceptible) o un sujeto en el que se está cribando un supuesto cáncer (por ejemplo, durante un reconocimiento médico rutinario). Un sujeto que se sospecha que tiene cáncer también puede tener uno o más factores de riesgo. Un sujeto que se sospecha que tiene cáncer generalmente no se ha sometido a cribado para detectar cáncer. Sin embargo, un "sujeto que se sospecha que tiene cáncer" se trata de un individuo que ha recibido un diagnóstico inicial pero cuyo estadio de cáncer aún se desconoce. La expresión también incluye personas que alguna vez tuvieron un cáncer (por ejemplo, un individuo en remisión).

60 De la forma en la que se usa en el presente documento, la expresión "sujeto en riesgo de padecer cáncer" se refiere a un sujeto con uno o más factores de riesgo para desarrollar un cáncer específico. Los factores de riesgo incluyen, pero sin limitación, el sexo, la edad, la predisposición genética, la exposición ambiental, los episodios anteriores de cáncer, las enfermedades preexistentes no cancerosas y el modo de vida.

De la forma en la que se usa en el presente documento, la expresión "caracterizar cáncer en un sujeto" se refiere a la identificación de una o más propiedades de una muestra de cáncer en un sujeto, incluyendo pero sin limitación, la presencia de tejido benigno, precanceroso o canceroso, el estadio del cáncer, y el pronóstico del sujeto. Los cánceres pueden caracterizarse a través de la identificación de la expresión de uno o más genes marcadores de cáncer, incluyendo pero sin limitación, los marcadores de cáncer desvelados en el presente documento.

5 Las expresiones "célula madre cancerosa", "célula madre tumoral", o "célula madre de tumor sólido" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a una población de células de un tumor sólido que: (1) tienen una amplia capacidad proliferativa; (2) pueden realizar división celular asimétrica para generar uno o más tipos de

10 descendencia diferenciada con potencial proliferativo o evolutivo reducido; (3) pueden realizar división celular simétrica para la autorrenovación o automantenimiento; y (4) pueden formar tumores palpables después de un trasplante en serie en un modelo de xenoinjerto. Las propiedades de capacidad proliferativa y división celular asimétrica y simétrica potenciada de las "células madre cancerosas", "células madre tumorales" o "células madre de tumor sólido" confiere a las células madre cancerosas la capacidad de formar tumores palpables después de un

15 trasplante en serie en un ratón inmunocomprometido en comparación con la mayoría de células tumorales que no generan tumores. Las células madre cancerosas experimentan autorrenovación frente a diferenciación de una manera caótica para formar tumores con tipos de células anómalas que con el tiempo pueden cambiar a medida que se producen mutaciones. Las células madre de tumor sólido de la presente divulgación se diferencian de la "línea de célula madre cancerosa" proporcionada en la Patente de Estados Unidos Nº 6.004.528. En esa patente, la "línea de

20 célula madre cancerosa" se define como un tipo de célula progenitora de lento desarrollo que en sí misma tiene pocas mutaciones pero que experimenta divisiones celulares simétricas en lugar de asimétricas como resultado de cambios tumorigénicos que se producen en el medio celular. Esta hipótesis de "línea de célula madre cancerosa" propone por tanto que las células tumorales sumamente mutadas, que proliferan rápidamente, surgen principalmente como resultado de un entorno anómalo, lo que produce la acumulación de células madre

25 relativamente normales y después sufren mutaciones que pueden hacer que se conviertan en células tumorales. La Patente de Estados Unidos Nº 6.004.528 propone que dicho modelo puede utilizarse para mejorar el diagnóstico del cáncer. El modelo de células madre de tumor sólido es fundamentalmente diferente al modelo de la "línea de célula madre cancerosa" y como resultado presenta utilidades que no ofrece el modelo de la "línea madre cancerosa". En primer lugar, las células madre de tumor sólido no están "exentas de mutación". La línea de célula madre cancerosa

30 "exenta de mutación" descrita en la Patente de Estados Unidos Nº 6.004.528 puede considerarse como una lesión precancerosa, aunque las células madre de tumor sólido descritas en esta divulgación son células cancerosas que en sí mismas contienen las mutaciones que son responsables de la tumorigénesis. Es decir, las células madre de tumor sólido ("células madre cancerosas") de la divulgación se incluirían entre las células sumamente mutadas que se diferencian de las de la "línea de células madre cancerosas" en la Patente de Estados Unidos Nº 6.004.528. En

35 segundo lugar, las mutaciones genéticas que dan lugar a cáncer pueden ser mayormente intrínsecas dentro de las células madre de tumor sólido así como lo son en su entorno. El modelo de célula madre de tumor sólido predice que las células madre de tumor sólido aisladas pueden originar tumores adicionales después de un trasplante (explicando de este modo la metástasis) mientras que el modelo de "línea de célula madre cancerosa" predice que las células de la "línea de célula madre cancerosa" transplantada no podría originar un nuevo tumor, ya que era su

40 entorno anómalo el que era tumorigénico. De hecho, la capacidad para transplantar células madre de tumor sólido humano aisladas fenotípicamente (en un entorno que es muy diferente al del entorno de un tumor normal), en la que aún forma nuevos tumores, diferencia la presente divulgación del modelo de "línea de célula madre cancerosa". En tercer lugar, las células madre de tumor sólido probablemente se dividen de forma tanto asimétrica como simétrica,

45 de tal manera que la división celular simétrica no es una propiedad estricta. En cuarto lugar, las células madre de tumor sólido pueden dividirse de un modo rápido o lento, dependiendo de muchas variables, de tal manera que un índice de proliferación lento no es una característica definitoria.

De la forma en la que se usa en el presente documento "tumorigénico" se refiere a las características funcionales de una célula madre de tumor sólido que incluye las propiedades de autorrenovación (dando lugar a células madre cancerosas tumorigénicas adicionales) y proliferación para generar todas las demás células tumorales (dando lugar a células tumorales diferenciadas y por tanto no tumorigénicas) que permiten que las células madre de tumor sólido formen un tumor. Estas propiedades de autorrenovación y proliferación para generar otras células tumorales confieren a las células madre cancerosas de la presente divulgación la capacidad de formar tumores palpables

55 después de un trasplante en serie en un ratón inmunocomprometido en comparación con la mayoría de las células tumorales que no pueden formar tumores después de un trasplante en serie. Las células tumorales, es decir, células tumorales no tumorigénicas, pueden formar un tumor después del trasplante en un ratón inmunocomprometido un número de veces limitado (por ejemplo de una a dos veces) después de obtener las células tumorales de un tumor sólido.

60 De la forma en la que se usa en el presente documento, las expresiones "uno o más marcadores de cáncer de células madre", "uno o más marcadores de célula madre cancerosas", "uno o más marcadores de células madre tumorales" o "uno o más marcadores de células madre de tumor sólido" se refieren a uno o más genes o a una proteína, polipéptido, o péptido expresado por el gen o los genes cuyo nivel de expresión, en solitario o en combinación con otros genes, se correlaciona con la presencia de células cancerosas tumorigénicas en comparación con las no tumorigénicas. La correlación puede relacionarse con una expresión aumentada o disminuida del gen (por ejemplo, niveles aumentados o disminuidos de ARNm o del péptido codificado por el gen).

- 5 De la forma en la que se usa en el presente documento, las expresiones "células tumorales no fraccionadas", "células tumorales previamente clasificadas", "células tumorales a granel" y sus equivalentes gramaticales se usan indistintamente para referirse a una población de células tumorales aislada de una muestra de un paciente (por ejemplo una biopsia de un tumor o un derrame pleural) que no se ha segregado, o fraccionado, basándose en la expresión del marcador de superficie celular.
- 10 De la forma en la que se usa en el presente documento, las expresiones "células tumorales no-ESA+CD44+", "no-ESA+44+", "células tumorales no tumorigénicas clasificadas", "células no madre" y sus equivalentes gramaticales se usan indistintamente para referirse a una población de tumores de la que se han segregado, o retirado, células madre cancerosas ESA+CD44+, basándose en la expresión del marcador de superficie celular.
- 15 De la forma en la que se usa en el presente documento, la frase "expresión génica" se refiere al proceso de convertir la información genética codificada en un gen en ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt, o ARNsn) a través de la "transcripción" del gen (por ejemplo, mediante la acción enzimática de una ARN polimerasa) y para genes que codifican proteínas, en proteínas a través de la "traducción" de ARNm. La expresión génica puede regularse en muchas fases en el proceso. "Regulación positiva" o "activación" se refiere a regulación que aumenta la producción de los productos de expresión génica (por ejemplo, ARN o proteína), mientras que "regulación negativa" o "represión" se refiere a regulación que disminuye la producción. Las moléculas (por ejemplo, factores de transcripción) que intervienen en la regulación positiva o en la regulación negativa a menudo reciben el nombre de "activadores" y "represores", respectivamente.
- 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 Las expresiones "niveles altos", "niveles aumentados", "expresión alta", "expresión aumentada", "niveles elevados" o "expresión regulada de manera positiva" en lo que respecta a la expresión génica, de la forma en la que se usa en el presente documento de manera indistinta, se refiere a la expresión de un gen en una célula o población de células, particularmente en una célula madre cancerosa o población de células madre cancerosas, a niveles más altos que los de la expresión de ese gen en una segunda célula o población de células, por ejemplo, células tumorales de colon no fraccionadas o células tumorales de colon no-ESA+44+. La expresión "niveles elevados" de expresión génica, se refiere a la expresión de un gen en una célula madre cancerosa o población de células madre cancerosas a niveles dos veces más elevados, o mayores, que los niveles de expresión del mismo gen en células tumorales de colon no fraccionadas o en células tumorales de colon no-ESA+44+. "Niveles elevados" de expresión génica también refiere a la expresión de un gen en una célula madre cancerosa o población de células madre cancerosas a niveles seis veces más elevados, o mayores, que los niveles de expresión del mismo gen en células tumorales de colon no fraccionadas o en células tumorales de colon no-ESA+44+. Los "niveles elevados" de expresión génica pueden determinarse detectando cantidades aumentadas de un polinucleótido (ARNm, ADNc, etc.) en células madre cancerosas en comparación con células tumorales de colon no fraccionadas o células tumorales de colon no-ESA+44+ mediante, por ejemplo, RT-PCR cuantitativa o análisis de micromatríz. Como alternativa, los "niveles elevados" de expresión génica pueden determinarse detectando cantidades aumentadas de una proteína en células madre cancerosas en comparación con células tumorales de colon no fraccionadas o células tumorales de colon no-ESA+44+ mediante, por ejemplo, ELISA, transferencia de Western e inmunofluorescencia cuantitativa.
- La expresión "niveles no detectables" o "pérdida de expresión" con respecto a la expresión génica, de la forma en la que se usa en el presente documento, se refiere a la expresión de un gen en una célula o población de células, particularmente en una célula madre cancerosa o población de células madre cancerosas, a niveles que no pueden diferenciarse de los del fondo utilizando técnicas convencionales, de tal manera que no se identifica la expresión. Los "niveles no detectables" de la expresión génica pueden determinarse por no poder detectar niveles de un polinucleótido (ARNm, ADNc, etc.) en células madre cancerosas por encima de los del fondo, por ejemplo, mediante RT-PCR cuantitativa o análisis de micromatríz. Como alternativa los "niveles no detectables" de expresión génica pueden determinarse por no poder detectar niveles de una proteína en células madre cancerosas por encima de los del fondo mediante, por ejemplo ELISA, transferencia de Western o inmunofluorescencia cuantitativa.
- De la forma en la que se usa en el presente documento, las expresiones "bajos niveles", "niveles disminuidos", "baja expresión", "expresión reducida" o "expresión disminuida" en lo que respecta a la expresión génica, de la forma en la que se usa en el presente documento indistintamente, se refiere a la expresión de un gen en una célula o población de células, particularmente en una célula madre cancerosa o población de células madre cancerosas, a niveles más bajos que los de la expresión de ese gen en una segunda célula o población de células, por ejemplo, células tumorales de colon no fraccionadas o células tumorales de colon no-ESA+44+. "Bajos niveles" de expresión génica se refiere a la expresión de un gen en una célula madre cancerosa o población de células madre cancerosas a niveles de: 1) la mitad o por debajo de los niveles de expresión del mismo gen en células tumorales de colon no fraccionadas o en células tumorales de colon no-ESA+44+ y 2) el límite de detección inferior utilizando técnicas convencionales. Los "niveles bajos" de expresión génica pueden determinarse detectando su disminución a cantidades apenas no detectables de un polinucleótido (ARNm, ADNc, etc.) en células madre cancerosas en comparación con las células tumorales de colon no fraccionadas o células tumorales de colon no-ESA+44+ mediante, por ejemplo, RT-PCR cuantitativa o análisis de micromatríz. Como alternativa, los "bajos niveles" de expresión génica pueden determinarse detectando su disminución a cantidades apenas no detectables de una proteína en células madre cancerosas en comparación con las células tumorales de colon no fraccionados o células tumorales de colon no-ESA+44+, por ejemplo, mediante ELISA, transferencia de Western o inmunofluorescencia

cuantitativa.

De la forma en la que se usa en el presente documento, la expresión “un reactivo que detecta específicamente niveles de expresión” se refiere a reactivos utilizados para detectar la expresión de uno o más genes (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitación, los marcadores de cáncer de la presente divulgación). Los ejemplos de reactivos adecuados incluyen, pero sin limitación, sondas de ácido nucleico que pueden hibridarse específicamente con el gen de interés, aptámeros, cebadores de PCR que pueden amplificar específicamente el gen de interés y anticuerpos que pueden unirse específicamente a proteínas expresadas por el gen de interés. En la descripción y en los ejemplos indicados a continuación pueden encontrarse otros ejemplos no limitantes.

De la forma en la que se usa en el presente documento, la expresión “detectar una expresión disminuida o aumentada con respecto a un control no canceroso” se refiere a medir el nivel de expresión de un gen (por ejemplo, el nivel de ARN, o proteína) en relación con el nivel en una muestra de control no cancerosa. La expresión génica puede medirse utilizando cualquier método adecuado, incluyendo, pero sin limitación, los descritos en el presente documento.

De la forma en la que se usa en el presente documento, las expresiones “proporcionar un diagnóstico” o información de diagnóstico” se refieren a cualquier información que se sea útil para determinar si un paciente tiene una enfermedad o afección y/o para clasificar la enfermedad o afección en una categoría fenotípica o en cualquier categoría que tenga significado con respecto al pronóstico de o probablemente respuesta al tratamiento (bien al tratamiento en general o a cualquier tratamiento en particular) de la enfermedad o afección. De manera similar, diagnosis se refiere a proporcionar cualquier tipo de información de diagnóstico, incluyendo, pero sin limitación, si es probable que un sujeto tenga una afección (tal como un tumor), información relacionada con la naturaleza o clasificación de un tumor, como por ejemplo un tumor de alto riesgo o un tumor de bajo riesgo, información relacionada con el pronóstico y/o información útil para seleccionar un tratamiento apropiado. La selección del tratamiento puede incluir la elección de un agente quimioterapéutico particular u otra modalidad de tratamiento tal como cirugía o radiación o una elección sobre si suministrar terapia o retirarla.

De la forma en la que se usa en el presente documento, las expresiones “proporcionar un pronóstico”, “información de pronóstico” o “información predictiva” se refieren a proporcionar información en lo que se refiere al impacto de la presencia de cáncer (por ejemplo, como se determina mediante los métodos de diagnóstico de la presente divulgación) en la salud futura del sujeto (por ejemplo, morbilidad o mortalidad previstas, la probabilidad de tener cáncer, y el riesgo de metástasis).

De la forma en la que se usa en el presente documento, la expresión “tejido tumoral postquirúrgico” se refiere a tejido canceroso (por ejemplo, tejido de biopsia) que se le ha extirpado a un sujeto (por ejemplo, durante cirugía).

De la forma en la que se usa en el presente documento, la expresión “sujeto al que se le diagnostica un cáncer” se refiere a un sujeto analizado y en el que ha encontrado que tiene células cancerosas. El cáncer puede diagnosticarse utilizando cualquier método adecuado, incluyendo pero sin limitación, biopsia, rayos x, análisis de sangre y los métodos de diagnóstico de la presente divulgación.

De la forma en la que se usa en el presente documento, las expresiones “tejido de biopsia”, “muestra de un paciente”, “muestra de tumor” y “muestra de cáncer” se refiere a una muestra de células, tejidos o fluidos que se extrae de un sujeto con la finalidad de determinar si la muestra contiene tejido canceroso, incluyendo células madre cancerosas o de determinar el perfil de expresión génica de ese tejido canceroso. En algunas realizaciones, el tejido de biopsia o fluido se obtiene ante la sospecha que el sujeto tiene cáncer. El tejido de biopsia o fluido se examina después para detectar la presencia o ausencia de cáncer, de células madre cancerosas y/o detectar la expresión de la firma génica de células madre cancerosas.

De la forma en la que se usa en el presente documento, la expresión “sistema de transferencia de genes” se refiere a cualquier medio para transferir una composición que comprenda una secuencia de ácidos nucleicos a una célula o a un tejido. Por ejemplo, los sistemas de transferencia de genes incluyen, pero sin limitación, vectores (por ejemplo, sistemas de transferencia retrovirales, adenovirales, virus adenoasociados y otros basados en ácidos nucleicos), microinyección de ácido nucleico desnudo, sistemas de transferencia basados en polímeros (por ejemplo, sistemas basados en partículas metálicas y en liposomas), inyección biolítica y similares. De la forma en la que se usa en el presente documento, la expresión “sistema de transferencia génica viral” se refiere a sistemas de transferencia génica que comprenden elementos virales (por ejemplo, virus intactos, virus modificados y componentes virales tales como ácidos nucleicos o proteínas) para facilitar la transferencia de la muestra a una célula o a un tejido que se desee. De la forma en la que se usa en el presente documento, la expresión “sistema de transferencia génica adenoviral” se refiere a sistemas de transferencia génica que comprenden virus intactos o alterados que pertenecen a la familia Adenoviridae.

De la forma en la que se usa en el presente documento, la expresión “secuencias diana de recombinación específica de sitio” se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que proporcionan secuencias de reconocimiento para los factores de recombinación y el lugar donde se produce la recombinación.

De la forma en la que se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a cualquier molécula que contenga ácido nucleico, incluyendo, pero sin limitación, ADN o ARN. La expresión abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN tales como, pero sin limitación, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aciridinil-citosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroxilmethyl)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboxi-metilaminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-iso-penteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetil-guanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiamino-metil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonil-metiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, metiléster del ácido uracil- 5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2- tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2- tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

El término "gen" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN) que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido, precursor, o ARN (por ejemplo, ARNr, ARNt). El polipéptido puede codificarse por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier parte de la secuencia codificante, siempre que conserve la actividad o las propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión a ligando, transducción de señal, inmunogenicidad, etc.) deseadas de la longitud completa o fragmento. El término también incluye la región codificante de un gen estructural y las secuencias localizadas adyacentes a la región codificante en ambos extremos 5' y 3' para una distancia de al menos 1 kb o más en cualquier extremo, de tal manera que el gen se corresponde con la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias localizadas en posición 5' de la región codificante y presentes en el ARNm se denominan secuencias 5' no traducidas. Las secuencias localizadas en posición 3' o cadena abajo de la región codificante y presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. El término "gen" incluye formas tanto genómicas como de ADNc de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones intervintentes" o "secuencias intervintentes". Los intrones son segmentos de un gen que se transcribe en ARN nuclear (ARNnh); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se retiran o se "cortan y empalman" del transcripto nuclear o primario; por lo tanto los intrones no están presentes en el ARN mensajero (ARNm). El ARNm actúa durante la traducción para especificar la secuencia u ordenar los aminoácidos en un polipéptido incipiente.

De la forma en la que se usa en el presente documento, la expresión "gen heterólogo" se refiere a un gen que no está en su entorno natural. Por ejemplo, un gen heterólogo incluye un gen de una especie introducido en otra especie. Un gen heterólogo también incluye un gen nativo para un organismo que se ha alterado de alguna manera (por ejemplo, mutado, añadido en copias múltiples, ligado a secuencias reguladoras no nativas, etc.). Los genes heterólogos se diferencian de los genes endógenos en que las secuencias génicas heterólogas generalmente se unen a secuencias de ADN que no se encuentran naturalmente asociadas con las secuencias génicas en el cromosoma o que están asociadas con partes del cromosoma con las que no se encuentran en la naturaleza (por ejemplo, genes expresados en loci en los que el gen no se expresa normalmente).

De la forma en la que se usa en el presente documento, la frase "expresión génica" se refiere al proceso de convertir en ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt o ARNsn) la información genética codificada en un gen, a través de la "transcripción" del gen (por ejemplo, mediante la acción enzimática de una ARN polimerasa), y para genes que codifican proteínas, en proteínas a través de la "traducción" de ARNm. La expresión génica puede regularse a diversas fases en el proceso. Una "regulación positiva" o "activación" se refiere a la regulación que aumenta la producción de los productos de expresión génica (por ejemplo, ARN o proteína), mientras que una "regulación negativa" o "represión" se refieren a regulación que disminuye la producción. Las moléculas (por ejemplo, factores de transcripción) que intervienen en la regulación positiva o negativa con frecuencia se denominan "activadores" y "represores", respectivamente.

Además de contener intrones, las formas genómicas de un gen también pueden incluir secuencias localizadas tanto en el extremo 5' como en el 3' de las secuencias que están presentes en el transcripto de ARN. Estas secuencias se denominan secuencias o regiones "flanqueantes" (estas secuencias flanqueantes se localizan en posición 5' o 3' de las secuencias no traducidas presentes en el transcripto de ARNm). La región flanqueante 5' puede contener secuencias reguladoras tales como promotores y potenciadores que controlan la transcripción del gen o ejercen influencia sobre la misma. La región flanqueante 3' puede contener secuencias que dirijan la terminación de la transcripción, la escisión postranscripcional y la poliadenilación.

La expresión "ARNip" se refiere a ARN de interferencia corto. En algunas realizaciones, los ARNip comprenden un dúplex, o una región bicatenaria, de aproximadamente 18-25 nucleótidos de longitud, con frecuencia los ARNip contienen de aproximadamente dos a cuatro nucleótidos no emparejados en el extremo 3' de cada cadena. Al menos una cadena del dúplex o región bicatenaria de un ARNip es sustancialmente homóloga a o sustancialmente complementaria a una molécula de ARN diana. La cadena complementaria con una molécula de ARN diana es la "cadena antisentido", la cadena homóloga a la molécula de ARN diana es la "cadena en sentido", y también es complementaria a la cadena antisentido del ARNip. Los ARNip también pueden contener secuencias adicionales; como ejemplos no limitantes de dichas secuencias se incluyen secuencias de unión, o bucles, así como estructuras

en tallo y otras estructuras plegadas. Los ARNip parecen actuar como productos intermedios clave en el desencadenamiento de la interferencia del ARN en invertebrados y en vertebrados, y en el desencadenamiento de la degradación de ARN específica de secuencia durante el silenciamiento génico postranscripcional en plantas.

- 5 La expresión "interferencia de ARN" o "ARNi" se refiere al silenciamiento o disminución de la expresión génica mediante los ARNip. Se trata del proceso de silenciamiento génico postranscripcional, específico de secuencia, en animales y plantas, iniciado por el ARNip que es homólogo en su región duplex a la secuencia del gen silenciado. El gen puede ser endógeno o exógeno para el organismo, presente integrado en un cromosoma o presente en un vector de transfección que no está integrado en el genoma. La expresión del gen se inhibe bien completamente o 10 parcialmente. También puede considerarse que el ARNi inhibe la función de un ARN diana; la función del ARN diana puede ser completa o parcial.

15 De la forma en la que se usa en el presente documento, las expresiones "molécula de ácido nucleico codificante", "secuencia de ADN codificante" y "ADN codificante" se refieren al orden o secuencia de desoxirribonucleótidos a lo largo de una cadena de ácido desoxirribonucleico. El orden de estos desoxirribonucleicos determina el orden de aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica (proteína). Por tanto la secuencia de ADN codifica la secuencia de aminoácidos.

20 De la forma en la que se usa en el presente documento, las expresiones "un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un gen" y "un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica a un gen", significa una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la región codificante de un gen o, en otras palabras, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un producto génico. La región codificante puede estar presente en forma de ADNc, ADN genómico, ADN o ARNc. Cuando está presente en forma de ADN, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser mono- (es decir, LA cadena en sentido) o bicatenario. Los elementos de 25 control adecuados, tales como potenciadores/promotores, uniones de corte y empalme, señales de poliadenilación, etc. pueden colocarse en estrecha proximidad a la región codificante del gen si se requiere para permitir el inicio adecuado de la transcripción y/o el procesamiento correcto del transcrito de ARN primario. Como alternativa, la región codificante utilizada en los vectores de expresión de la presente divulgación puede contener potenciadores/promotores endógenos, uniones de corte y empalme, secuencias intervintentes, señales de 30 poliadenilación, etc. o una combinación de elementos de control, tanto endógenos como exógenos.

35 De la forma en la que se usa en el presente documento el término "parte", cuando si indica en referencia a una secuencia de nucleótidos (como en "una parte de una secuencia de nucleótidos determinada") se refiere a fragmentos de esa secuencia. El tamaño de los fragmentos puede variar de cuatro nucleótidos a toda la secuencia de nucleótidos menos un nucleótido (10 nucleótidos, 20, 30, 40, 50, 100, 200, etc.).

40 Las frases "se hibrida", "se hibrida selectivamente" o "se hibrida específicamente" se refiere a la unión o a la formación de dúplex de una molécula únicamente con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones de hibridación rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, una biblioteca de moléculas de ADN o ARN). Véase, por ejemplo, Andersen (1998) Nucleic Acid Hybridization Springer-Verlag; Ross (ed. 1997) Nucleic Acid Hybridization Wiley.

45 La frase "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones en las que una sonda se hibridará con su secuencia diana, normalmente en una mezcla compleja de ácido nucleico, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una amplia orientación con respecto a la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10 °C menores 50 que el punto de fusión térmico (T_f) para la secuencia específica a una fuerza iónica definida. La T_f es la temperatura (bajo una fuerza iónica, un pH y una concentración de ácido nucleico definidas) a la cual el 50 % de las sondas complementarias con la diana, se hibridan con la secuencia diana en el equilibrio (dado que las secuencias diana están presentes en exceso, a la T_f, el 50 % de las sondas están ocupadas en el equilibrio). Las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración salina de iones de sodio sea menor de aproximadamente 1,0 M, normalmente una concentración de iones de sodio (u otras sales) de aproximadamente 0,01 a 1,0 M a un pH de 55 7,0 a 8,3 y la temperatura sea de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos de aproximadamente 60 °C, para sondas largas (por ejemplo, mayores de 50 nucleótidos). También pueden obtenerse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para una hibridación de alta rigurosidad, una señal positiva es de al menos dos veces el fondo, o 60 diez veces la hibridación del fondo. Como ejemplos de condiciones de hibridación rigurosas o de alta rigurosidad se incluyen: formamida al 50 %, 5x SSC, y SDS al 1 % incubado a 42 °C o 5x SSC a SDS al 1 % incubado a 65 °C, con un lavado en 0,2x SSC y SDS al 0,1 % a 65 °C. Para la PCR, es típica una temperatura de aproximadamente 36 °C para una amplificación de baja rigurosidad, aunque las temperaturas de hibridación pueden variar de aproximadamente 72 °C a aproximadamente 48 °C dependiendo de la longitud del cebador. Para una amplificación de PCR a alta rigurosidad, es típica una temperatura de aproximadamente 62 °C, aunque las temperaturas de hibridación de alta rigurosidad pueden variar de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 65 °C, dependiendo de 65

la longitud y de la especificidad del cebador. Las condiciones de ciclo típicas para amplificaciones de rigurosidad tanto baja como alta incluyen una fase de desnaturalización de aproximadamente 90 °C a 95 °C durante 30-120 segundos, una fase de hibridación que dura 30-120 segundos y una fase de extensión de aproximadamente 72 °C durante 1-2 minutos.

5 Las expresiones "en combinación operativa", "en orden operativo" y "unido operativamente", de la forma en la que se usa en el presente documento, se refieren a la unión de secuencias de ácidos nucleicos de tal manera que se produzca una molécula de ácido nucleico que pueda dirigir la traducción de un gen determinado y/o la síntesis de una molécula proteica deseada. Las expresiones también se refieren a la unión de secuencias de aminoácidos de tal manera que se produzca una proteína funcional.

10 Cuando el término "aislado" se usa en relación a un ácido nucleico, como en "un oligonucleótido aislado" o "polinucleótido aislado", se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que está identificada y separada de al menos un componente o contaminante con el cual está normalmente asociada en su fuente natural. El ácido nucleico aislado está por tanto presente en una forma o configuración que es diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por el contrario, los ácidos nucleicos no aislados, tales como ácidos nucleicos de ADN y ARN se encuentran en el estado en el que existen en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de ADN determinada (por ejemplo, un gen) se encuentra en el cromosoma de la célula hospedadora cerca de genes adyacentes; las secuencias de ARN, tales como una secuencia de ARNm específica que codifica una proteína específica, se encuentra en la célula como una mezcla con numerosos otros ARNm que codifican una multitud de proteínas. Sin embargo, el ácido nucleico aislado que codifica una proteína determinada incluye, a modo de ejemplo, dicho ácido nucleico en células que normalmente expresan la proteína determinada en la que el ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales, o de otra manera flanqueado por una secuencia de ácidos nucleicos diferente de la encontrada en la naturaleza. El ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado puede estar presente en forma mono o bicatenaria. Cuando un ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado se utiliza para expresar una proteína, el oligonucleótido o polinucleótido contendrá como mínimo la cadena en sentido o codificante (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser monocatenario), pero puede contener tanto la cadena en sentido como la antisentido (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser bicatenario).

20 30 De manera similar, en determinadas realizaciones, cuando el término "aislado" se usa en relación a un polipéptido, como en "un polipéptido aislado" o "un anticuerpo aislado", se refiere a un polipéptido (o anticuerpo) que está separado de al menos un componente o contaminante con el cual está normalmente asociado en su fuente natural. Los anticuerpos aislados u otros polipéptidos aislados están por tanto presentes en una forma o configuración que es diferente de esa en la se encuentra en la naturaleza. En determinadas realizaciones, un polipéptido aislado (por ejemplo, un anticuerpo) es sustancialmente puro.

35 40 De la forma en la que se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" se refiere a material que tiene una pureza (es decir, está libre de contaminantes) de al menos 50 %, preferentemente tiene una pureza de al menos 90 %, más preferentemente tiene una pureza de al menos 95 %, aún más preferentemente tiene una pureza de al menos 98 %, o más preferentemente tiene una pureza de al menos 99 %.

45 Una "secuencia de aminoácidos" y términos tales como "polipéptido", "proteína" o "péptido" no significan limitar la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos completa, nativa, asociada con la molécula de proteína indicada.

50 55 La expresión "proteína nativa" se usa en el presente documento para indicar que una proteína no contiene restos de aminoácidos codificados por secuencias vectoriales; es decir, la secuencia nativa contiene solamente aquellos aminoácidos encontrados en la proteína como se producen en la naturaleza. Una proteína nativa puede producirse de manera recombinante o puede aislarse de una fuente de origen natural.

60 De la forma en la que se usa en el presente documento, el término "parte" cuando se indica en referencia a una proteína (como en "una parte de una proteína determinada") se refiere a fragmentos de esa proteína. El tamaño de los fragmentos puede variar de cuatro restos de aminoácido a la secuencia de aminoácidos completa menos un aminoácido.

65 La expresión "transferencia de Southern", se refiere al análisis de ADN en geles de agarosa o acrilamida para fraccionar el ADN de acuerdo con el tamaño, seguido de la transferencia del ADN del gel a un soporte sólido, tal como una membrana de nitrocelulosa o de nylon. Después, el ADN inmovilizado se criba con una sonda marcada para detectar especies de ADN complementarias a la sonda usada. El ADN puede escindirse con enzimas de restricción antes de realizar la electroforesis. Después de la electroforesis, el ADN puede despurinizarse parcialmente y desnaturalizarse antes o durante la transferencia al soporte sólido. Las transferencias de Southern son herramientas estándar que utilizan los biólogos en biología molecular (J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY, páginas 9.31-9.58 [1989]).

- La expresión “transferencia de Northern”, de la forma en la que se usa en el presente documento, se refiere al análisis de ARN por electroforesis de ARN en geles de agarosa para fraccionar el ARN de acuerdo con el tamaño seguido por la transferencia del ARN del gel a un soporte sólido, tal como una membrana de nitrocelulosa o de nylon. Después, el ARN inmovilizado se criba con una sonda marcada para detectar especies de ARN complementarias a la sonda usada. Las transferencias de Northern son herramientas estándar que utilizan los biólogos en biología molecular (J. Sambrook, *et al.*, citado anteriormente, págs. 7.39-7.52 [1989]).
- 5
- El término “transferencia de Western” se refiere al análisis de una o más proteínas (o polipéptidos) inmovilizados sobre un soporte tal como una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas se procesan en geles de acrilamida para separar las proteínas, seguido de la transferencia de la proteína del gel a un soporte sólido, tal como una membrana de nitrocelulosa o de nylon. Después, las proteínas inmunitizadas se exponen a anticuerpos con reactividad contra un antígeno de interés. La unión de los anticuerpos puede detectarse mediante diversos métodos, entre los que se incluye el uso de anticuerpo radiomarcados.
- 10
- 15
- El término “transgén” de la forma en la que se usa en el presente documento, se refiere a un gen exógeno que se coloca en un organismo, por ejemplo, mediante la introducción del gen exógeno en huevos recién fertilizados o embriones tempranos. La expresión “gen exógeno” se refiere a cualquier ácido nucleico (por ejemplo, secuencia génica) que se introduce en el genoma de un animal mediante manipulaciones experimentales y puede incluir secuencias génicas encontradas en ese animal siempre que el gen introducido no resida en el mismo lugar en el 20 cual reside el gen de origen natural.
- 20
- 25
- De la forma en la que se usa en el presente documento, el término “vector” se usa en referencia a moléculas de ácido nucleico que transfieren uno o más segmentos de ADN de una célula a otra. El término “vehículo” se utiliza algunas veces indistintamente con el de “vector”. A menudo los vectores proceden de plásmidos, bacteriófagos o de virus de plantas o animales.
- 30
- 35
- La frase “vector de expresión” de la forma en la que se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ADN recombinante que contiene una secuencia codificante deseada y secuencias de ácidos nucleicos apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la expresión en procariotas normalmente incluyen un promotor, un operador (opcional) y un sitio de unión a ribosoma, con frecuencia junto con otras secuencias. Se sabe que las secuencias eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de terminación y de poliadenilación.
- 40
- 45
- De la forma en la que se usa en el presente documento la expresión “*in vitro*” se refiere a un entorno artificial y a procesos o reacciones que se producen dentro de un entorno artificial. Los entornos *in vitro* pueden consistir, pero sin limitación, en tubos de ensayo y cultivos celulares. La expresión “*in vivo*” se refiere al entorno natural (por ejemplo, un animal o una célula) y a procesos o reacciones que se producen dentro de un entorno natural.
- 50
- 55
- Las expresiones “compuesto de ensayo” y “compuesto candidato” se refieren a cualquier entidad química, farmacéutica, fármaco y similar que sea un candidato para su uso en el tratamiento o en la prevención de una enfermedad, dolencia, indisposición o trastorno de la función corporal (por ejemplo cáncer). Los compuestos de ensayo comprenden compuestos terapéuticos tanto potenciales como conocidos. Se puede determinar que un compuesto de ensayo es terapéutico mediante cribado utilizando los métodos de cribado de la presente divulgación. En algunas realizaciones de la presente divulgación, los compuestos de ensayo incluyen compuestos antisentido.
- 60
- 65
- De la forma en la que se usa en el presente documento, el término “muestra” se usa en su sentido más amplio. En un sentido, significa que incluye un espécimen o un cultivo obtenido de cualquier fuente, así como de muestras biológicas y ambientales. Las muestras biológicas pueden obtenerse de animales (incluyendo seres humanos) e incluir fluidos, sólidos, tejidos y gases. Las muestras biológicas incluyen productos sanguíneos, tales como plasma, suero y similares. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia de superficie, suelo, agua, cristales y muestras industriales. Sin embargo, dichos ejemplos no deben considerarse como limitantes de los tipos de muestras que pueden aplicarse a la presente divulgación.
- Por “unión específica” o “unión única” se entiende cuando un agente se une solamente a un ligando, receptor o antígeno particular. Por “unión selectiva” se entiende cuando un agente se une preferentemente a un ligando, receptor o antígeno sobre otros con una magnitud de aproximadamente dos veces o mayor, de aproximadamente cinco veces o mayor, de aproximadamente ocho veces o mayor o de aproximadamente diez veces o mayor.
- De la forma en la que se usa en el presente documento, “aproximadamente” se refiere a más o menos un 1 % del número indicado. Por ejemplo, “aproximadamente 10 %” indica un intervalo del 9 % al 11 %.
- Se dice que dos secuencias de polinucleótidos o de polipéptidos son “idénticas” o tienen “identidad” si la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para obtener una correspondencia máxima como se describe más adelante. La comparación entre dos secuencias generalmente se realiza comparando las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia.

En algunas realizaciones, el "porcentaje de identidad" se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en la que la parte de la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (es decir, huecos) de un 20 por ciento o menor, normalmente de un 5 a un 10 por ciento o de un 10 a un 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o delecciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se producen bases de aminoácidos idénticas o restos de aminoácidos idénticos en ambas secuencias, para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando los resultados por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. En algunas realizaciones, la ventana de comparación puede ser más pequeña (por ejemplo, de 7 o 10 aminoácidos).

El alineamiento óptimo de secuencias para realizar la comparación puede realizarse con el programa Megalign del juego de programación bioinformática de Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.), utilizando parámetros determinados. Como alternativa, el % de identidad (de aminoácidos) puede obtenerse utilizando uno de los programas BLAST o BLAST-2 disponibles al público. El programa informático WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)). El porcentaje de identidad de secuencia (de aminoácidos) también puede determinarse utilizando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)). El programa BLAST se basa en el método de alineamiento de Karlin y Altschul. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268 (1990) y se comenta en Altschul, *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990); Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877 (1993); y Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997).

En determinadas realizaciones, términos tales como "tratamiento" o "tratando" o "tratar" se refieren tanto a 1) mediciones terapéuticas que curan, reducen, aminoran los síntomas de, y/o detienen la progresión de, una afección patológica diagnosticada o un trastorno diagnosticado y 2) mediciones profilácticas o preventivas que impiden o retrasan el desarrollo de una afección patológica diagnosticada o de un trastorno diagnosticado. Por tanto, las personas que necesitan tratamiento son personas que ya tienen el trastorno; que son propensas a tener el trastorno; las que pueden haber tenido el trastorno y en las que el trastorno puede recurrir; y aquellas personas en las que se previene el trastorno. En determinadas realizaciones, un sujeto se "trata" satisfactoriamente si el paciente muestra uno o más de lo siguiente: una reducción del número de o ausencia completa de células cancerosas; una reducción del tamaño del tumor; inhibición de o una ausencia de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos incluyendo la propagación del cáncer a tejidos blandos y huesos; inhibición de o ausencia de metástasis tumoral; inhibición o ausencia de crecimiento tumoral; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y/o mortalidad reducidas; mejora de la calidad de vida; una reducción en el número de o ausencia completa de células madre cancerosas; una disminución en la proporción de células madre cancerosas en un tumor sólido (con respecto a células en el tumor que no son células madre cancerosas); inhibir la proliferación de células madre cancerosas y un retraso en o una ausencia de recidiva.

En determinadas realizaciones, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido, polinucleótido, molécula orgánica pequeña u otro fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o un trastorno en un sujeto. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede, en determinadas realizaciones, reducir el número de células cancerosas; reducir el número de células madre cancerosas; reducir la proporción de células madre cancerosas en un tumor sólido (con respecto a células tumorales que no son células madre cancerosas); reducir el tamaño del tumor; inhibir o detener la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir y/o detener la metástasis tumoral; inhibir y detener el crecimiento tumoral; aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer; inhibir la proliferación de células madre cancerosas; o ser el resultado de una combinación de dichos efectos sobre las célula cancerosas.

Las expresiones "inhibir" e "inhibición" se usan indistintamente en el presente documento con "alterar" y "alteración".

Marcadores de cáncer de células madre de tumor sólido

La presente divulgación proporciona marcadores cuya expresión está diferencialmente expresada en células madre de cáncer de colon en comparación con células tumorales de colon no fraccionadas o células tumorales de colon no-ESAT44+. Dichos marcadores encuentran uso en el diagnóstico y el tratamiento (por ejemplo, direccionamiento terapéutico) de diversos cánceres, entre ellos cáncer de mama y de colon. En determinadas realizaciones, el marcador de células madre de tumor sólido es LGR5.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para la detección de la expresión de marcadores de cáncer de células madre (por ejemplo, marcadores de cáncer de células madre de cáncer de mama). En algunas realizaciones, la expresión se mide directamente (por ejemplo a nivel de ARN o proteína). En algunas realizaciones, la expresión se detecta en muestras tisulares (por ejemplo, tejido de biopsia). En otras realizaciones, la expresión se detecta en fluidos corporales (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitación, plasma, suero, sangre entera, moco y orina). La presente divulgación proporciona adicionalmente paneles y kits para la detección de

5 marcadores. En algunas realizaciones, la presencia de un marcador de cáncer de células madre se usa para proporcionar un pronóstico en un sujeto. La información proporcionada también se usa para dirigir el ciclo del tratamiento. Por ejemplo, si se encuentra que un sujeto tiene un marcador indicativo de una célula madre de tumor sólido, pueden comenzarse terapias adicionales (por ejemplo, terapia hormonal o radioterapia) en un punto inicial cuando probablemente es más eficaz (por ejemplo, antes de la metástasis). Además, si se encuentra que un sujeto tiene un tumor que no responde a la terapia hormonal, el gasto y la inconveniencia de dicha terapia pueden evitarse.

10 La presente divulgación no se limita a los marcadores descritos anteriormente. Puede utilizarse cualquier marcador adecuado que se correlacione con cáncer o con la progresión de cáncer. También se contemplan marcadores adicionales dentro del ámbito de la presente divulgación. Puede utilizarse cualquier método adecuado para identificar y caracterizar marcadores de cáncer adecuados para su uso en los métodos de la presente divulgación, entre los que se incluyen, pero sin limitación, los descritos en el ejemplo 1 ilustrativo más adelante. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los marcadores identificados como que se regulan positiva o negativamente en células madre de tumor sólido que utilizan los métodos de micromatriz de expresión génica de la presente divulgación se caracterizan adicionalmente utilizando micromatriz de tejidos, inmunohistoquímica, análisis de transferencia de Northern, inhibición de ARNip o ARN antisentido, análisis de mutación, investigación de la expresión con resultados clínicos, así como otros métodos desvelados en el presente documento.

15 20 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un panel para el análisis de una pluralidad de marcadores. El panel permite el análisis simultáneo de marcadores múltiples que se correlacionan con carcinogénesis y/o metástasis. Dependiendo del sujeto, pueden analizarse paneles solos o en combinación para proporcionar el mejor diagnóstico y pronóstico posible. Para su inclusión en un panel los marcadores se seleccionan cribando su valor predictivo utilizando cualquier método adecuado, incluyendo, pero sin limitación, los métodos descritos más adelante en los ejemplos ilustrativos.

25 1. Detección de ARN

30 En algunas realizaciones, la detección de marcadores de cáncer de células madre de tumor sólido se efectúa midiendo la expresión del ARNm correspondiente en una muestra tisular (por ejemplo, tejido de cáncer de mama). La expresión de ARNm puede medirse mediante cualquier método adecuado, incluyendo pero sin limitación, los métodos desvelados más adelante.

35 En algunas realizaciones, el ARN se detecta mediante análisis de transferencia de Northern. El análisis de transferencia de Northern implica la separación de ARN y la hibridación de una sonda complementaria marcada.

40 45 En otras realizaciones más, el ARN (o ADNc correspondiente) se detecta por hibridación con una sonda oligonucleotídica. Se dispone de varios ensayos de hibridación que utilizan diversas tecnologías para la hibridación y detección. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utiliza el ensayo TaqMan (PE Biosystems, Foster City, CA; Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.962.233 y 5.538.848). El ensayo se realiza durante una reacción PCR. El ensayo TaqMan aprovecha la actividad 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa de AMPLITAQ GOLD. En la reacción PCR se incluye una sonda que consiste en un oligonucleótido con un colorante indicador en la posición 5' (por ejemplo un colorante fluorescente) y un colorante desactivador en la posición 3'. Durante la PCR, si la sonda está unida a su diana, la actividad nucleolítica 5'-3' de la polimerasa AMPLITAQ GOLD escinde la sonda entre el colorante indicador y el desactivador. La separación del colorante indicador del colorante desactivador produce un aumento de fluorescencia. La señal se acumula con cada ciclo de PCR y puede monitorizarse con un fluorímetro.

50 55 En otras realizaciones más, se usa la PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) para detectar la expresión de ARN. En la RT-PCR, el ARN se convierte enzimáticamente en ADN complementario o "ADNc" utilizando una enzima transcriptasa inversa. Después, el ADNc se utiliza como un molde para una reacción PCR. Los productos de la PCR pueden detectarse mediante cualquier método adecuado, incluyendo pero sin limitación, electroforesis en gel y tinción con un tinte específico de ADN o hibridación con una sonda marcada. En algunas realizaciones, se utiliza la PCR cuantitativa con transcriptasa inversa con el método de mezclas estandarizadas de moldes competitivos descrito en las Patentes de Estados Unidos 5.639.606, 5.643.765 y 5.876.978.

2. Detección de proteínas

60 En otras realizaciones, la expresión génica de marcadores de cáncer de células madre, tal como LGR5, se detecta midiendo la expresión de la proteína o del polipéptido correspondiente. La expresión de la proteína puede detectarse mediante cualquier método adecuado. En algunas realizaciones, las proteínas se detectan por inmunohistoquímica. En otras realizaciones, las proteínas se detectan mediante su unión a un anticuerpo suscitado contra la proteína. La generación de anticuerpos se describe más adelante.

65 La unión de anticuerpos se detecta mediante técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación con difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos

5 *in situ* (por ejemplo, utilizando oro coloidal, marcadores enzimáticos o radioisótopos, por ejemplo), transferencias de Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación, etc.), ensayos de fijación al complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos con proteína A, y ensayos de inmunoelectroforesis, etc.

10 En una realización, la unión del anticuerpo se detecta detectando un marcador en el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta detectando la unión de un anticuerpo secundario o reactivo con el anticuerpo primario. En una realización adicional, el anticuerpo secundario está marcado. Se conocen muchos métodos en la técnica para detectar la unión en un inmunoensayo y se encuentran dentro del ámbito de la presente divulgación.

15 En algunas realizaciones, se utiliza un ensayo de detección automática. Los métodos para la automatización de inmunoensayos incluyen los descritos en las Patentes de Estados Unidos 5.885.530, 4.981.785, 6.159.750 y 5.358.691. En algunas realizaciones, los análisis y presentación de resultados también son automáticos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utiliza un programa informático que genera un pronóstico basándose en la presencia o en la ausencia de una serie de proteínas correspondientes a marcadores de cáncer.

20 En otras realizaciones, se utiliza el inmunoensayo descrito en las Patentes de Estados Unidos 5.599.677 y 5.672.480.

25 3. Tecnología de micromatrices de ADNc

30 Las micromatrices de ADNc consisten en ADNc múltiples (normalmente miles de ellos) diferentes aplicados puntualmente (normalmente utilizando un dispositivo robótico de aplicación puntual) sobre lugares conocidos en un soporte sólido, tal como un portaobjetos de vidrio de microscopio. Los ADNc se obtienen normalmente por amplificación mediante PCR de insertos de bibliotecas de plásmidos utilizando cebadores complementarios con la parte estructural del vector del plásmido o con el propio gen para genes en los que se desconoce la secuencia. Los productos de la PCR adecuados para la producción de micromatrices generalmente tienen una longitud entre 0,5 y 2,5 kb. Pueden seleccionarse ADNc de longitud completa, marcadores de secuencia expresada (EST) o los ADNc seleccionados al azar de una biblioteca de interés. Los EST son ADNc parcialmente secuenciados, como se describe, por ejemplo, en Hillier, *et al.*, 1996, 6: 807-828. Aunque algunos de estos EST corresponden a genes conocidos, frecuentemente se dispone de muy poca información, o de ninguna, con respecto a cualquier EST particular, excepto para una pequeña cantidad de secuencias 3' y/o 5' y, posiblemente, el tejido de origen del ARNm del cual procede el EST. Como apreciará un experto habitual en la técnica, en general los ADNc contienen suficiente información de secuencia para identificar exclusivamente un gen dentro del genoma humano. Además, en general, los ADNc son de suficiente longitud para hibridarse, selectivamente, específicamente o exclusivamente, con el ADNc obtenido del ARNm procedente de un solo gen en las condiciones de hibridación del experimento.

40 En un experimento de micromatriz típico, una micromatriz se hibrida con poblaciones de ARN, ADN o ADNc diferencialmente marcadas procedentes de dos muestras diferentes. Más habitualmente el ARN (bien ARN total o poli A+ ARN) se aísla de células o tejidos de interés y se realiza la transcripción inversa para producir ADNc. El marcaje se realiza habitualmente durante la transcripción inversa incorporando un nucleótido marcado en la mezcla de reacción. Aunque pueden utilizarse diversos marcadores, más habitualmente se conjuga el nucleótido con los colorantes fluorescentes Cy3 o Cy5. Por ejemplo, pueden utilizarse Cy5-dUTP y Cy3-dUTP. El ADNc procedente de 45 una muestra (que representa, por ejemplo, un tipo de célula, un tipo de tejido o una condición de crecimiento particular) se marca con un fluoróforo mientras que el ADNc procedente de una segunda muestra (que representa, por ejemplo un tejido de célula, un tipo de tejido o una condición de crecimiento diferente) se marca con el segundo fluoróforo. Similares cantidades de material marcado de las dos muestras se cohíbridan en la micromatriz. En el caso de un experimento de micromatriz en el que las muestras se marcan con Cy5 (que emite fluorescencia roja) y Cy3 (que emite fluorescencia verde), los datos primarios (obtenidos escaneando la micromatriz utilizando un detector capaz de detectar cuantitativamente la intensidad de fluorescencia) son proporciones de intensidad de fluorescencia (roja/verde, R/V). Estas proporciones representan las concentraciones relativas de las moléculas de ADNc que se hibridan con los ADNc representados en la micromatriz y por tanto reflejan los niveles de expresión relativa del ARNm correspondientes a cada ADNc/gen representado en la micromatriz.

55 Cada experimento de micromatriz puede proporcionar decenas de miles de puntos de datos, representando cada uno de ellos la expresión relativa de un gen particular en las dos muestras. La organización apropiada y los análisis de los datos es de importancia clave, y se han desarrollado diversos programas informáticos que incorporan herramientas estadísticas convencionales que facilitan los análisis de los datos. Una base para la organización de los datos de expresión génica es reunir grupos genes con patrones de expresión similares entre sí. En Eisen *et al.*, 1998, PNAS 95: 14863-14868 se describe un método para realizar análisis de grupos jerárquicos y mostrar los datos procedentes de experimentos de micromatriz. Como se describe en el presente documento, la agrupación puede combinarse con una representación gráfica de los datos primarios en los que cada punto de datos se representa con un color que representa de modo cuantitativo y cualitativo el punto del dato. Convirtiendo los datos de una gran tabla de números, en un formato visual, este proceso facilita un análisis intuitivo de los datos. Puede encontrarse información y detalles adicionales con respecto a las herramientas matemáticas y/o a la propia estrategia de

agrupamiento, por ejemplo, en Sokal y Sneath, *Principles of numerical taxonomy*, xvi, 359, W. H. Freeman, San Francisco, 1963; Hartigan, *Clustering algorithms*, xiii, 351, Wiley, Nueva York, 1975; Paull *et al.*, 1989, *J. Natl. Cancer Inst.* 81: 1088-92; Weinstein *et al.* 1992, *Science* 258: 447-51; van Osdol *et al.*, 1994, *J. Natl. Cancer Inst.* 86: 1853-9; y Weinstein *et al.*, 1997, *Science*, 275: 343-9.

5 En los ejemplos se encuentran detalles adicionales de los métodos experimentales usados en la presente divulgación. En la Patente de Estados Unidos Nº 5.807.522 se encuentra información adicional que describe los métodos para fabricar y utilizar micromatrices. Para la construcción de componentes informáticos de micromatriz (por ejemplo, robots diseñados para la fabricación de micromatrices y escáneres) utilizando partes disponibles en el comercio, pueden encontrarse instrucciones en la página web <http://cmgm.stanford.edu/pbr-own/> y en Cheung *et al.*, 1999, *Nat. Genet. Supplement* 21: 15-19.

10 Otros comentarios sobre tecnología de micromatriz y protocolos para preparar muestras y realizar experimentos de micromatriz se encuentran, por ejemplo, en matrices de ADN para análisis de expresión génica, *Methods Enzymol.*, 303: 179-205, 1999; monitorización de expresión basada en fluorescencia utilizando micromatrices, *Methods Enzymol.*, 306: 3-18, 1999; y M. Schena (ed.), *Micromatrices de ADN: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, RU, 1999. En la página web <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/arrayerHTML/ArrayerDocs.html>, se encuentran descripciones de cómo usar un robot diseñado para la fabricación de micromatrices y el programa informático asociado.

20 4. Análisis de datos

25 En algunas realizaciones, se utiliza un programa de análisis basado en ordenador para traducir los datos no procesados generados por el ensayo de detección (por ejemplo, la presencia, ausencia o cantidad de uno o más marcadores determinados) en datos de valor predictivo para un médico. El médico puede acceder a los datos predictivos utilizando cualquier medio adecuado. Por tanto, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona el beneficio adicional de que no es necesario que el médico, que probablemente no está formado en genética o biología molecular, entienda los datos no procesados. Los datos se presentan directamente al médico en su forma más útil. El médico después puede utilizar inmediatamente la información para optimizar el cuidado del sujeto.

30 La presente divulgación contempla cualquier método capaz de recibir, procesar y transmitir la información a y desde los laboratorios que realizan los ensayos; proporcionando la información datos del personal médico y los sujetos. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente divulgación, se obtiene una muestra (por ejemplo, una biopsia o un suero o una muestra de orina) de un sujeto y se somete a un servicio de perfilado (por ejemplo, un laboratorio clínico en una instalación médica, industrias de perfilado genómico etc.), localizado en cualquier parte del mundo (por ejemplo, en un país diferente al del país en donde reside el sujeto o donde se utiliza finalmente la información) para generar datos sin procesar. Cuando la muestra comprende un tejido u otra muestra biológica, el sujeto puede acudir a un centro médico para que se obtenga la muestra y se envíe al centro de perfilado, o los sujetos pueden recoger la muestra ellos mismos y enviarla directamente a un centro de perfilado. Cuando la muestra comprende información biológica previamente determinada, el sujeto puede enviar directamente la información al servicio de perfilado (por ejemplo, una tarjeta de información que contiene la información puede escanearse mediante un ordenador y los datos trasmítirse a un ordenador del centro de perfilado utilizando un sistema de comunicación electrónico). Una vez recibido por el servicio de perfilado, la muestra se procesa y se produce un perfil (por ejemplo, datos de expresión) específico para la información de diagnóstico o de pronóstico deseada para el sujeto.

35 Despues se preparan los datos de perfil en un formato adecuado para la interpretación por el médico tratante. Por ejemplo, en lugar de proporcionar datos de expresión no procesados, el formato preparado puede representar un diagnóstico o una evaluación del riesgo para el sujeto, junto con recomendaciones para opciones de tratamiento particulares. Los datos pueden presentarse al médico mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el servicio de perfilado genera un informe que puede imprimir el médico (por ejemplo, en un centro de atención) o presentarse al médico en un monitor de ordenador.

40 En algunas realizaciones, la información se analiza primero en el punto de atención o en una instalación regional. Despues, los datos no procesados se envían a una instalación de procesamiento central para un análisis posterior y/o para convertir los datos no procesados en información útil para el médico o el paciente. La instalación de procesamiento central proporciona la ventaja de privacidad (todos los datos se almacenan en una instalación central con protocolos de seguridad uniformes), velocidad y uniformidad de análisis de los datos. La instalación de procesamiento central puede controlar despues el destino de los datos después del tratamiento del sujeto. Por ejemplo, utilizando un sistema de comunicación electrónico, la instalación central puede proporcionar datos al médico, al sujeto o a los investigadores.

45 En algunas realizaciones, el sujeto puede acceder directamente a los datos utilizando el sistema de comunicación electrónico. El sujeto puede seleccionar intervención adicional o consejo basándose en los resultados. En algunas realizaciones, los datos se utilizan para el uso en investigación. Por ejemplo, los datos pueden utilizarse para optimizar adicionalmente la inclusión o eliminación de marcadores como indicadores útiles de una afección o fase de

enfermedad en particular.

5. Kits

5 En otras realizaciones adicionales, la presente divulgación proporciona kits para la detección y caracterización de cánceres, o para modular la actividad de un péptido expresado por uno o más marcadores de células madre cancerosas, tales como LGR5. En algunas realizaciones, los kits contienen anticuerpos específicos para un marcador de cáncer, además de reactivos de detección y tampones. En otras realizaciones, los kits contienen reactivos específicos para la detección de ARNm o ADNc (por ejemplo, sondas o cebadores oligonucleotídicos). En 10 algunas realizaciones, los kits contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para realizar un ensayo de detección, incluyendo todos los controles, direcciones para realizar los ensayos y cualquier programa informático necesario para el análisis y presentación de resultados.

15 Otra realización de la presente divulgación comprende un kit para analizar la presencia de polinucleótidos o proteínas, por ejemplo en una muestra de tejido o en un fluido corporal, de una firma genética de célula madre de tumor sólido, tal como la firma de la alfa catenina. El kit puede comprender, por ejemplo, un anticuerpo para la detección de un polipéptido o una sonda para la detección de un polinucleótido. Además, el kit puede comprender una muestra de referencia o de control; instrucciones para el procesamiento de muestras, la realización del ensayo y la interpretación de los resultados; y tampones y otros reactivos necesarios para realizar el ensayo. En determinadas 20 realizaciones, el kit comprende un panel de anticuerpos para detectar la expresión de una o más de las proteínas codificadas por los genes de la firma de la alfa-catenina. En otras realizaciones, el kit comprende pares de cebadores para detectar la expresión de uno o más de los genes de la firma genética de células madre de tumor sólido. En otras realizaciones, el kit comprende una matriz de ADNc o de oligonucleótidos para detectar la expresión de uno o más de los genes de la firma genética de células madre de tumor sólido.

25 6. Formación de imágenes *in vivo*

En algunas realizaciones, se utilizan técnicas de formación de imágenes *in vivo* para visualizar la expresión de 30 marcadores de cáncer en un animal (por ejemplo, un ser humano o un mamífero no humano). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ARNm o proteína marcadora de cáncer se marca utilizando un anticuerpo marcado 35 específicamente para el marcador de cáncer. Un anticuerpo unido y marcado específicamente puede detectarse en un individuo utilizando un método de formación de imágenes *in vivo*, incluyendo, pero sin limitación, la formación de imágenes de radionúclidos, la tomografía de emisión de positrones, la tomografía axial computarizada, rayos X o el método de formación de imágenes por resonancia magnética, detección de fluorescencia y detección de 40 quimioluminiscencia. Más adelante se describen métodos para generar anticuerpos contra los marcadores de cáncer de la presente divulgación.

Los métodos de formación de imágenes *in vivo* de la presente divulgación son útiles en el diagnóstico de cánceres 45 que expresan los marcadores de cáncer de células madre de tumores sólidos de la presente divulgación (por ejemplo, en cáncer de mama). La formación de imágenes *in vivo* se utiliza para visualizar la presencia de un marcador indicativo del cáncer. Dichas técnicas permiten el diagnóstico sin el uso de una biopsia desagradable. Los métodos de formación de imágenes *in vivo* de la presente divulgación también son útiles para proporcionar pronósticos a los pacientes de cáncer. Por ejemplo, puede detectarse la presencia de un marcador indicativo de 50 células madre cancerosas. Los métodos de formación de imágenes *in vivo* de la presente divulgación pueden utilizarse adicionalmente para detectar cánceres metastásicos en otras partes del cuerpo.

En algunas realizaciones, los reactivos (por ejemplo, anticuerpos) específicos para los marcadores de cáncer de la 55 presente divulgación se marcan con fluorescencia. Los anticuerpos marcados se introducen en un sujeto (por ejemplo, por vía oral o parenteral). Los anticuerpos marcados con fluorescencia se detectan utilizando cualquier método adecuado (por ejemplo, utilizando el aparato descrito en la Patente de Estados Unidos 6.198.107).

En otras realizaciones, los anticuerpos se marcan con radiactividad. El uso de anticuerpos para el diagnóstico *in vivo* 60 es muy conocido en la técnica. Sumerdon *et al.*, (Nucl. Med. Biol 17: 247-254 [1990] han descrito un quelante de anticuerpo optimizado para la formación de imágenes radioinmunoescintográficas de tumores utilizando Indio-111 como marcador. Griffin *et al.*, (J Clin Onc 9: 631-640 [1991] han descrito el uso de este agente en la detección de tumores en pacientes que se sospecha que tienen cáncer colorrectal recurrente. En la técnica se conoce el uso de agentes similares con iones paramagnéticos como marcadores para la formación de imágenes de resonancia magnética (Lauffer, Magnetic Resonance in Medicine 22: 339-342 [1991]). El marcador utilizado dependerá de la modalidad de formación de imágenes seleccionada. Los marcadores radiactivos tales como Indio-111, Tecnecio- 65 99m, o Yodo-131 pueden utilizarse para escáneres planos o tomografía computarizada de emisión de un solo positrón (SPECT). También pueden utilizarse marcadores que emiten positrones tales como Flúor-19 para tomografía de emisión de positrones (PET). En el caso de la MRI, pueden utilizarse iones paramagnéticos tales como Gadolinio (III) o Manganoso (II).

Se dispone de metales radiactivos con semividas que varían de 1 hora a 3,5 días para la conjugación con anticuerpos tales como escandio-47 (3,5 días), galio-67 (2,8 días), galio-68 (68 minutos), tecnecio-99m (6 horas) e indio-111 (3,2 días), de los cuales el galio-67, el tecnecio-99m y el indio-111 son preferibles para la formación de imágenes con cámaras gamma, siendo preferible el galio-68 para la tomografía de emisión de positrones.

5 Un método útil de marcaje de anticuerpos con dichos radiometales es mediante un agente quelante bifuncional tal como el ácido dietilentriaminopentaacético (DPTA), como se describe, por ejemplo, por Khaw *et al.* (Science 209: 295 [1980]) para In-111 y Tc-99m, y por Scheinberg *et al.* (Science 215: 1511 [1982]). También pueden utilizarse otros agentes quelantes, pero el 1-(p-carboximetoxibencil)EDTA y el anhídrido carboxicarbónico de DPTA son ventajosos debido a que su uso permite la conjugación sin afectar sustancialmente a la inmunorreactividad del anticuerpo.

10 15 Otro método para el acoplamiento de DPTA a proteínas es mediante el uso de anhídrido cíclico de DPTA, como describen Hnatowich *et al.* (Int. J. Appl. Radiat. Isot. 33: 327 [1982]) para marcar albúmina con In-111, pero que puede adaptarse para marcar anticuerpos. Un método adecuado de marcaje de anticuerpos con Tc-99m que no utiliza quelación con DPTA es el método de pre-estañado de Crockford *et al.*, (Patente de Estados Unidos Nº 4.323.546).

20 25 Un método para marcar inmunoglobulinas con Tc-99m es el descrito por Wong *et al.* (Int. J. Appl. Radiat. Isot., 29: 251 [1978]) para proteínas plasmáticas, y recientemente aplicado de manera satisfactoria por Wong *et al.* (J. Nucl. Med., 23: 229 [1981]) para anticuerpos marcados.

30 35 En el caso de radiometales conjugados con el anticuerpo específico, probablemente es deseable introducir una proporción de radiomarcador tan alta como sea posible en la molécula de anticuerpo sin destruir su inmunoespecificidad. Una mejora adicional puede conseguirse efectuando el radiomarcado en presencia del marcador de cáncer de células madre específico de la presente divulgación para garantizar que se protege el sitio de unión a antígeno del anticuerpo.

40 45 En otras realizaciones adicionales, se utiliza la formación de imágenes biofotónica *in vivo* (Xenogen, Almeda, CA) para la formación de imágenes *in vivo*. Esta formación de imágenes *in vivo* en tiempo real utiliza luciferasa. El gen de la luciferasa se incorpora en las células, microorganismos y animales (por ejemplo, como una proteína de fusión con un marcador de cáncer de la presente divulgación). Cuando está activo, conduce a una reacción que emite luz. Para capturar la imagen y analizarla se utiliza una cámara CCD y un programa informático.

50 55 Agentes terapéuticos

La presente divulgación proporciona diversos agentes terapéuticos. En algunas realizaciones, los agentes se unen a al menos una proteína RSPO humana. En realizaciones alternativas, los agentes se unen a dos o más proteínas RSPO humanas. En determinadas realizaciones alternativas, los agentes se unen a al menos una proteína LGR humana. En realizaciones alternativas, los agentes se unen a dos o más proteínas LGR humanas. En algunas realizaciones, los agentes alteran (parcial o completamente) la unión de al menos una proteína RSPO (por ejemplo, RSPO1, RSPO2, RSPO3 y/o RSPO4) a al menos una proteína LGR (por ejemplo, LGR4, LGR5 y/o LGR6). En determinadas realizaciones, los agentes alteran la señalización de LGR activada por RSPO, tal como la señalización de LGR5. En determinadas realizaciones, los agentes alteran la señalización de la beta catenina.

60 65 En determinadas realizaciones, el agente terapéutico es una biomolécula. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico o biomolécula es un anticuerpo, tal como un anticuerpo que se une a al menos una proteína RSPO o a al menos una proteína LGR. Por tanto, el agente terapéutico o biomolécula puede ser un anticuerpo que se une específicamente a LGR5. En determinadas realizaciones alternativas, el agente terapéutico o biomolécula es un anticuerpo que se une específicamente a LGR4 o LGR6. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico o biomolécula es un anticuerpo que se une específicamente a RSPO1, RSPO2, RSPO3 y/o RSPO4.

70 75 En determinadas realizaciones, el agente terapéutico o biomolécula es un receptor LGR soluble (por ejemplo, un receptor LGR5). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente terapéutico es una proteína de fusión que comprende un fragmento del receptor LGR5 y/o la porción Fc de un anticuerpo.

80 85 En determinadas realizaciones alternativas, el agente terapéutico es un oligonucleótido antisentido, una molécula de ARNip o una ribozima.

90 95 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona terapias para el cáncer (por ejemplo, cáncer de mama). En algunas realizaciones, las terapias se dirigen a marcadores de cáncer.

100 105 La presente divulgación proporciona un anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína LGR humana. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a al menos una proteína LGR humana selección del grupo que consiste en LGR4, LGR5 y LGR6. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a LGR5. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a dos o más

5 proteínas LGR humanas seleccionadas del grupo que consiste en LGR4, LGR5 y LGR6. En determinadas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína LGR humana, también altera la unión de al menos una proteína RSPO (por ejemplo, RSPO1, RSPO2, RSPO3 y/o RSPO4) a al menos una proteína LGR humana (por ejemplo, LGR5). En determinadas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína LGR humana se caracteriza por una capacidad para alterar la activación de la señalización de LGR mediante RSPO y/o una capacidad de alterar la señalización de la beta catenina. En determinadas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína LGR humana se caracteriza por la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral, tal como el crecimiento de un tumor sólido que comprende células madre de tumores sólidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína LGR humana, altera o inhibe la unión de RSPO a LGR, e inhibe el crecimiento tumoral. En determinadas realizaciones alternativas, el anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína LGR también altera la activación de la señalización de LGR por RSPO e inhibe el crecimiento tumoral. En determinadas realizaciones alternativas, el anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína LGR también altera la activación de la señalización de LGR por RSPO y/o la señalización de la beta catenina e inhibe el crecimiento tumoral. (En determinadas realizaciones, la inhibición del crecimiento tumoral proporcionada por un anticuerpo puede, pero no necesariamente, ser el resultado de la activación de la señalización de LGR por RSPO. En determinadas realizaciones, la inhibición del crecimiento tumoral proporcionada por un anticuerpo puede, pero no necesariamente, ser el resultado de la inhibición de la unión de una proteína RSPO a una proteína LGR).

10 20 La presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína RSPO humana seleccionada del grupo que consiste en RSPO1, RSPO2, RSPO3 y RSPO4. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a dos o más proteínas RSPO humanas seleccionadas del grupo que consiste en RSPO1, RSPO2, RSPO3 y RSPO4. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a RSPO1. En determinadas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína RSPO, también es capaz de alterar la unión de al menos una proteína RSPO (por ejemplo, RSPO1, RSPO2, RSPO3 y/o RSPO4) a al menos una proteína LGR humana (por ejemplo LGR5). En determinadas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína RSPO humana se caracteriza por una capacidad para alterar la activación por RSPO de la señalización de LGR y/o una capacidad para alterar la señalización de la beta catenina. En determinadas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína RSPO humana se caracteriza por la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral, tal como el crecimiento de un tumor sólido que comprende células madre de tumor sólido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína RSPO humana altera o inhibe la unión de RSPO a LGR, e inhibe el crecimiento tumoral. En determinadas realizaciones alternativas, el anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína RSPO, también altera la activación de la señalización de LGR por RSPO e inhibe el crecimiento tumoral. En determinadas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína RSPO, altera la activación de la señalización de LGR por RSPO y/o la señalización de la beta catenina e inhibe el crecimiento tumoral.

15 40 En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-LGR o anti-RSPO (u otro agente) que altera la unión de una proteína RSPO con una proteína LGR, altera al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 % de la unión de la proteína RSPO con una proteína LGR en un ensayo *in vitro* o *in vivo*.

45 50 Igualmente, en determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-LGR o anti-RSPO (u otro agente) que altera (a) la activación por RSPO de la señalización de LGR y/o (b) la señalización de la beta catenina, altera al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 % de la señalización en un ensayo *in vitro* o *in vivo*.

55 55 La presente invención proporciona, en determinadas realizaciones, un anticuerpo aislado que se une específicamente a una proteína R-espondina (RSPO) humana e inhibe el crecimiento de un tumor sólido que comprende células madre de tumores sólidos. En determinadas realizaciones, la RSPO humana es RSPO1. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano.

60 En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a una proteína RSPO humana y altera la activación de la señalización de LGR5 por RSPO. En determinadas realizaciones, la RSPO es RSPO1. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano.

65 65 En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a un dominio extracelular de una proteína LGR humana e inhibe el crecimiento de un tumor sólido que comprende células madre de tumor sólido. En determinadas realizaciones, el dominio extracelular comprende los aminoácidos 22-564 de la LGR5 humana (SEC ID Nº: 1). En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a un dominio extracelular de una proteína LGR humana y altera la activación de la señalización de LGR por RSPO. En determinadas realizaciones, el dominio extracelular comprende los aminoácidos 22-564 de la LGR5 humana (SEC ID Nº: 1). En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En determinadas 5 realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano.

La invención proporciona adicionalmente un anticuerpo monoclonal anti-LGR5 88M1. El anticuerpo monoclonal 88M1 se produce por una línea celular de hibridoma depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Blvd, Manassas, Virginia, 20110, Estados Unidos, el 31 de julio de 2008, de acuerdo con el Tratado 10 de Budapest, con el número de depósito ATCC PTA-9342. También se proporcionan anticuerpos que se unen específicamente a LGR5 humano y (a) comprenden una región variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 95 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 98 % o aproximadamente 100 %) con la región variable de cadena pesada de 88M1; (b) comprenden una región variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos 15 aproximadamente 95 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 98 % o aproximadamente 100 %) con la región variable de cadena ligera de 88M1; (c) comprenden las CDR de cadena pesada de 88M1; (d) comprenden las CDR de cadena ligera de 88M1; (e) se unen a un epítopo capaz de unirse a 88M1 y/o (f) compiten con 88M1 en un ensayo de unión competitiva. También se proporcionan líneas celulares productoras de los anticuerpos (incluyendo, pero sin limitación, la línea celular de hibridoma que tiene el número de 20 depósito PTA-9342 de la ATCC) y composiciones que comprenden los anticuerpos. También se proporcionan polinucleótidos que codifican la región variable de cadena ligera y/o la región variable de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales, y vectores y células que comprenden los polinucleótidos.

25 Pueden utilizarse ensayos de competición para determinar si dos anticuerpos se unen al mismo epítopo reconociendo epítopos idénticos o estéricamente solapantes. Puede utilizarse cualquier método conocido en la técnica para determinar la unión competitiva (tal como, por ejemplo, los inmunoensayos descritos en cualquier parte del presente documento).

30 En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un receptor soluble que comprende un dominio extracelular de una proteína LGR humana que inhibe el crecimiento de un tumor sólido que comprende células madre de tumor sólido. En determinadas realizaciones, el dominio extracelular comprende los aminoácidos 22-564 de la LGR5 humana (SEC ID Nº: 1). En determinadas realizaciones, el dominio extracelular de la LGR5 humana está unido en fase con una secuencia de proteína que no es LGR. En determinadas realizaciones, la proteína que no es LGR es Fc humana.

35 En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un receptor soluble que comprende un dominio extracelular de una proteína LGR humana que altera la activación de la señalización de LGR por RSPO. En determinadas realizaciones, el dominio extracelular comprende los aminoácidos 22-564 de la LGR5 humana (SEC ID Nº: 1). En determinadas realizaciones, el dominio extracelular de la LGR5 humana está unido en fase con una 40 secuencia de proteína que no es LGR. En determinadas realizaciones, la proteína que no es LGR es Fc humana.

45 Los ensayos *in vitro* e *in vivo* para cribar agentes terapéuticos candidatos que tienen la capacidad de unirse específicamente a una proteína RSPO o LGR particular se conocen bien en la técnica. Los inmunoensayos que pueden utilizarse para evaluar la unión por anticuerpos incluyen, por ejemplo, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como transferencias de Western, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones de precipitina con difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación al complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos con proteína A. El uso de análisis FACS para determinar la unión específica a una proteína RSPO o LGR diana se perfila en un ejemplo específico, el Ejemplo 3, más adelante.

55 Además, la afinidad de unión de un anticuerpo con una proteína LGR o RSPO y la velocidad de disociación de la interacción del anticuerpo con LGR o RSPO puede determinarse mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de la proteína LGR o RSPO marcada con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de proteína LGR o RSPO no marcada, y la detección del anticuerpo unido a la proteína LGR o RSPO marcada. Despues puede determinarse la afinidad del anticuerpo por la proteína LGR o RSPO y las velocidades de disociación a partir de los datos mediante análisis de representación de Scatchard. También puede determinarse la competición con un anticuerpo secundario (por ejemplo, 88M1) utilizando radioinmunoensayos. Por ejemplo, la proteína LGR o RSPO se incuba 60 con el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto marcado en presencia de cantidades en aumento de un anticuerpo secundario no marcado. Como alternativa, puede determinarse la afinidad de unión de un anticuerpo a una proteína LGR o RSPO y las velocidades de asociación y disociación de la interacción del anticuerpo-LGR o anticuerpo-RSPO mediante resonancia de plasmón superficial, tal como BIACore. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-LGR pueden dirigirse a y acumularse en la membrana de una célula que exprese LGR.

Más adelante, en la sección titulada “cribado de Fármacos” se describen ensayos conocidos adicionales para evaluar la unión u otra interacción de un agente terapéutico candidato (incluyendo aquellos que no sean anticuerpos) con una proteína tal como una proteína LGR o RSPO.

5 De forma similar, también son muy conocidos en la técnica ensayos adecuados para determinar si un agente terapéutico candidato (tal como un anticuerpo anti-LGR o anti-RSPO puede bloquear la unión de una proteína RSPO con una proteína LGR. Se describen ejemplos de dichos ensayos de unión competitiva en otras partes del presente documento. Un ejemplo del uso de un ensayo de unión competitiva basado en FACS para determinar la capacidad de un anticuerpo contra LGR5 para al menos bloquear parcialmente la unión de RSPO1 con LGR5 se proporciona 10 en un ejemplo específico, el Ejemplo 3, más adelante.

Además, también se conocen en la técnica ensayos para determinar si un agente terapéutico candidato particular es capaz de alterar la activación por RSPO de la señalización de LGR (por ejemplo, señalización de LGR5) y/o es capaz de alterar la señalización de la beta catenina. Por ejemplo, pueden utilizarse ensayos que emplean el uso de 15 genes indicadores unidos operativamente a un promotor sensible a beta catenina para medir el nivel de señalización de la beta catenina en presencia de un anticuerpo anti-RSPO o anti-LGR. Véanse, por ejemplo, los ensayos de luciferasa descritos en el ejemplo específico, Ejemplo 2, más adelante.

20 Los ensayos *in vitro* e *in vivo* para cribar en agentes terapéuticos candidatos que se dirigen a una proteína RSPO o LGR la eficacia anticancerosa y/o antitumoral de células madre serán obvios para un experto en la materia. Más adelante, en la sección titulada “Cribado de Fármacos” y en el ejemplo específico, Ejemplo 4, mostrado más adelante, se proporcionan ensayos a modo de ejemplo conocidos en la técnica. Además se ofrecen orientaciones adicionales con respecto a la evaluación de la eficacia antitumoral y anticancerosa de células madre proporcionadas 25 en la Publicación de Patente Internacional Nº WO 08/042236, Publicación de Patente de Estados Unidos Nº US 2007/0117751 y en la Publicación de Patente de Estados Unidos Nº US 2008/0131434.

Anticuerpos (Incluyendo fragmentos de anticuerpo)

30 Como se ha descrito anteriormente, en determinadas realizaciones, los agentes terapéuticos son anticuerpos, tales como anticuerpos contra una proteína LGR humana o una proteína RSPO humana. Además, la presente invención proporciona anticuerpos útiles para otras finalidades, tales como finalidades de diagnóstico o cribado. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento (incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos terapéuticos) se aíslan. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente 35 documento son sustancialmente puros.

35 En algunas realizaciones, los anticuerpos (tanto para su uso en terapia como para otros propósitos) son anticuerpos monoclonales. En determinadas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos químéricos, humanizados o humanos. Adicionalmente, la divulgación proporciona anticuerpos biespecíficos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab.

40 En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos aislados contra un marcador de células madre de cáncer (por ejemplo, LGR5). El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal que reconoce específicamente el marcador de célula madre de cáncer de colon descrito. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, 45 que se unen específicamente a un polipéptido marcador de célula madre de cáncer de colon descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, son anticuerpos químéricos o humanizados que se unen específicamente al dominio extracelular de un polipéptido marcador de célula madre de cáncer de colon descrito en el presente documento. En otras realizaciones, los anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, son anticuerpos humanos que se unen específicamente al dominio 50 extracelular de un polipéptido marcador de célula madre de cáncer de colon descrito en el presente documento.

55 Los anticuerpos contra un marcador de célula madre de cáncer encuentran utilidad en los métodos experimentales, de diagnóstico y terapéuticos descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se utilizan para detectar la expresión de una proteína marcadora de célula madre de cáncer de colon en muestras biológicas tales como, por ejemplo, una biopsia de tejido de un paciente, una muestra de derrame pleural o de sangre. Las biopsias de tejidos pueden seccionarse y las proteínas pueden detectarse utilizando, por ejemplo, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. Como alternativa, se aíslan células individuales de una muestra, y la expresión de las proteínas se detecta en células fijas o vivas mediante análisis FACS. Además, 60 los anticuerpos pueden utilizarse en matrices de proteínas para detectar la expresión de un marcador de célula madre de cáncer de colon, por ejemplo, en células tumorales, en lisados celulares o en otras muestras de proteína. En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación se utilizan para inhibir el crecimiento de células tumorales poniendo en contacto los anticuerpos con células tumorales en ensayos basados en células *in vitro* o en 65 modelos animales *in vivo*. En otras realizaciones adicionales, los anticuerpos se utilizan para tratar cáncer en un paciente humano administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo contra un marcador de célula madre de cáncer de colon.

Los anticuerpos policlonales pueden prepararse mediante cualquier método conocido. Pueden crearse anticuerpos policlonales inmunizando a un animal (por ejemplo, un conejo, una rata, un ratón, un burro, etc.) mediante inyecciones múltiples subcutáneas o intraperitoneales del antígeno relevante (un fragmento peptídico purificado, una proteína recombinante de longitud completa, una proteína de fusión, etc.) opcionalmente conjugado con un hemocianina de lapa americana (KLH), seroalbúmina, etc. diluido en solución salina estéril y combinado con un adyuvante (por ejemplo, Adyuvante de Freund Completo o Incompleto) para formar una emulsión estable. Después, el anticuerpo policlonal se recupera de la sangre, de líquido ascítico y similar de un animal inmunizado de esta manera. La sangre recogida se aglutina, y el suero se decanta, se depura por centrifugación y se ensaya con respecto a la titulación de anticuerpos. Los anticuerpos policlonales pueden purificarse del suero o del líquido ascítico de acuerdo con métodos convencionales en la técnica incluyendo cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, diálisis, etc.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Utilizando el método del hibridoma, un ratón, un hámster u otro animal hospedador apropiado se inmuniza como se describe anteriormente para suscitar la producción por linfocitos de anticuerpos que se unirán específicamente a un antígeno inmunizante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y se fusionan con una línea de células de mieloma adecuada utilizando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que después pueden seleccionarse de linfocitos no fusionados y células de mieloma. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos especialmente contra un antígeno seleccionado como se determina mediante inmunoprecipitación, inmunotransferencia o mediante un ensayo de unión *in vitro* tal como radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) pueden después propagarse bien en cultivo *in vitro* utilizando métodos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986) o bien *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales pueden después purificarse del medio de cultivo o del líquido ascítico como se describe para los anticuerpos policlonales anteriores.

Como alternativa, los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse utilizando métodos de ADN recombinante como se describe en la Patente de Estados Unidos 4.816.567. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan, tal como a partir de células B maduras o de células de hibridoma, tal como mediante RT-PCR utilizando cebadores oligonucleotídicos que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y su secuencia se determina utilizando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesada y ligera se cloran después en vectores de expresión adecuados, que cuando se introducen por transfección en células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma de otra manera no producen proteína de inmunoglobulina, generan anticuerpos monoclonales por las células hospedadoras. Además, pueden aislarse anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de los mismos de las especies deseadas a partir de bibliotecas de presentación de fagos como se describe (McCafferty *et al.*, 1990, *Nature*, 348: 552-554; Clackson *et al.*, 1991, *Nature*, 352: 624-628; y Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597).

40 El polinucleótido (o polinucleótidos) que codifica un anticuerpo monoclonal puede modificarse adicionalmente de diversas maneras utilizando tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En una realización, los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón pueden sustituirse 1) por aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o 2) por un polipéptido no humano para generar un anticuerpo de fusión. En otras realizaciones, las 45 regiones constantes se truncan o retiran para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. Además, puede usarse mutagénesis de alta densidad o dirigida de la región variable para optimizar específicamente la afinidad, etc. de un anticuerpo monoclonal.

50 En algunas realizaciones de la presente invención, el anticuerpo monoclonal contra un marcador de célula madre de cáncer de colon es un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos que contienen secuencias mínimas de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) dentro de las regiones variables. Dichos anticuerpos se utilizan terapéuticamente para reducir la antigenicidad y respuestas HAMA (anticuerpo humano anti-ratón) cuando se administran a un sujeto humano. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos con muy pocas o ninguna secuencia no humana. Un anticuerpo humano es un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un ser humano.

60 Los anticuerpos humanizados pueden producirse utilizando varias técnicas conocidas en este campo. Un anticuerpo puede humanizarse sustituyendo la CDR de un anticuerpo humano con la de un anticuerpo no humano (por ejemplo, de ratón, de rata, de conejo, de hámster, etc.) que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas (Jones *et al.*, 1986, *Nature*, 321: 522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature*, 332: 323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science*, 239: 1534-1536). El anticuerpo humanizado puede modificarse adicionalmente mediante la sustitución de un resto adicional bien en la región marco conservada Fv y/o dentro de los restos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad de los anticuerpos.

Los anticuerpos humanos pueden prepararse directamente utilizando diversas técnicas conocidas en este campo. Pueden generarse linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o aislados de un individuo inmunizado que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (véase, por ejemplo Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer *et al.*, 1991, J. Immunol., 147 (1): 86-95; y la Patente de Estados Unidos 5.750.373). Además, el anticuerpo humano puede seleccionarse de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan *et al.*, 1996, Nature Biotechnology, 14: 309-314; Sheets *et al.*, 1998, PNAS, 95: 6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227: 381; Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol., 222: 581). Los anticuerpos humanizados también pueden prepararse en ratones transgénicos que contienen loci de inmunoglobulina humana que son capaces, después de la inmunización, de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. Esta estrategia se describe en las Patentes de Estados Unidos 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016.

La presente invención también incluye anticuerpos biespecíficos que reconocen específicamente un marcador de célula madre de cáncer de colon. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que son capaces de reconocer específicamente y unirse a al menos dos epítopos diferentes. Los epítopos diferentes pueden estar dentro de la misma molécula (por ejemplo, el mismo polipéptido marcador de célula madre de cáncer de colon) o en diferentes moléculas de tal forma que, por ejemplo, los anticuerpos pueden reconocer específicamente y unirse a un marcador de célula madre de cáncer de colon así como, por ejemplo 1) a una molécula efectora en un leucocito tal como un receptor de células T (por ejemplo CD3) o receptor Fc (por ejemplo CD64, CD32 o CD16) o 2) un agente citotóxico como se describe con detalle más adelante. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpo. Las técnicas para fabricar anticuerpos biespecíficos son comunes en la materia (Millstein *et al.*, 1983, Nature 305: 537-539; Brennan *et al.*, 1985, Science 229: 81; Suresh *et al.*, 1986, Methods in Enzymol. 121: 120; Traunecker *et al.*, 1991, EMBO J. 10: 3655-3659; Shalaby *et al.*, 1992, J. Exp. Med. 175: 217-225; Kostelný *et al.*, 1992, J. Immunol. 148: 1547-1553; Gruber *et al.*, 1994, J. Immunol. 152: 5368; y Patente de Estados Unidos 5.731.168).

En determinadas realizaciones de la invención, puede ser deseable utilizar un fragmento de anticuerpo en lugar de un anticuerpo intacto, por ejemplo, para aumentar la penetración del tumor. Para la producción de los fragmentos de anticuerpos se conocen diversas técnicas. Tradicionalmente, estos fragmentos son el resultado de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (por ejemplo, Morimoto *et al.*, 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 y Brennan *et al.*, 1985, Science, 229: 81). Sin embargo, estos fragmentos se producen normalmente ahora directamente por células hospedadoras recombinantes como se ha descrito anteriormente. Por tanto, los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv todos ellos pueden expresarse en y secretarse de *E. coli* u otras células hospedadoras, permitiendo de esta manera la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Como alternativa, dichos fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las fagotecas de anticuerpo indicadas anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser anticuerpos lineales como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.641.870, por ejemplo, y pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. Serán obvias otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos.

Puede ser deseable adicionalmente, especialmente en el caso de fragmentos de anticuerpos, modificar un anticuerpo para aumentar su semivida en suero. Esto puede realizarse, por ejemplo, incorporando un epítopo de unión a receptor de salvamento en el fragmento de anticuerpo por mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o incorporando el epítopo en una etiqueta peptídica que después se fusiona con el fragmento de anticuerpo en un extremo o en el centro (por ejemplo por síntesis de ADN o peptídica).

La presente divulgación también incluye variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos químéricos, humanizados y humanos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, expuestos en el presente documento. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustituciones conservativas, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, una sustitución conservativa se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro dentro de la misma clase general tal como, por ejemplo, un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido, un aminoácido básico por otro aminoácido básico o un aminoácido neutro por otro aminoácido neutro. Lo que se entiende por sustitución de aminoácidos conservativa es bien conocido en la técnica.

La invención también se refiere a inmunoconjungados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o sus fragmentos), isótopos radiactivos (es decir, un radioconjungado), etc. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjungados incluyen, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, doxorrubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden utilizarse incluyen la cadena de la difteria A, fragmentos activos sin unión de la toxina difterica, cadena de exotoxina A, cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modecina A, alfa sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas dianina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Se dispone de diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjungados incluyendo ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Los conjungados del anticuerpo y agente citotóxico se

- 5 preparan utilizando diversos agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazonio-benzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolien 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). También pueden utilizarse conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteno, y CC1065 y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.
- 10 10 En algunas realizaciones el anticuerpo de la invención contiene regiones Fc humanas que se modifican para potenciar la función efectora, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Esto puede realizarse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Por ejemplo, puede introducirse uno o más restos de cisteína en la 15 región Fc para permitir la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región para mejorar la destrucción celular mediada por complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Caron *et al.*, 1992, *J. Exp Med.* 176: 1191-1195; Shope, 1992, *Immunol.* 148: 2918-2922). También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada utilizando reticulantes heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.*, 1993, *Cancer Research* 53: 2560-2565. Como alternativa, puede obtenerse por ingeniería genética un anticuerpo que tenga regiones Fc dobles (Stevenson *et al.*, 1989, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230).
- 20 20 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos que se dirigen a tumores que expresan un marcador de cáncer de célula madre de la presente divulgación. Puede utilizarse cualquier anticuerpo adecuado (por ejemplo, monoclonal, policlonal o sintético) en los métodos terapéuticos desvelados en el presente documento. En 25 algunas realizaciones, los anticuerpos utilizados para la terapia contra el cáncer son anticuerpos humanizados. En la técnica se conocen bien métodos para humanizar anticuerpos (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 6.180.370, 5.585.089, 6.054.297 y 5.565.332).
- 30 En algunas realizaciones, los anticuerpos terapéuticos comprenden un anticuerpo generado contra un marcador de cáncer de célula madre de la presente divulgación, donde el anticuerpo está conjugado con un agente citotóxico. En dichas realizaciones, se genera un agente terapéutico específico de tumor que no se dirige a células normales reduciéndose de este modo muchos de los efectos secundarios perjudiciales de la quimioterapia tradicional. Para 35 determinadas aplicaciones, se contempla que los agentes terapéuticos sean agentes farmacológicos que servirán como agentes útiles para la unión a anticuerpos, particularmente agentes citotóxicos o anticelulares de otra manera que tienen la capacidad de destruir o suprimir el crecimiento o la división celular de células endoteliales. La presente divulgación contempla el uso de cualquier agente farmacológico que pueda conjugarse con un anticuerpo y suministrarse en forma activa. Los agentes anticelulares a modo de ejemplo incluyen agentes quimioterapéuticos, radioisótopos y citotoxinas. Los anticuerpos terapéuticos de la presente invención pueden incluir diversas fracciones citotóxicas, incluyendo pero sin limitación isótopos radiactivos (por ejemplo, yodo-131, yodo-123, tecnecio-99m, 40 indio-111, renio-188, renio-186, galio-67, cobre-67, itrio-90, yodo-125 o astatina-211), hormonas tales como una hormona esteroidea, antimetabolitos tales como citosinas (por ejemplo, arabinósido, fluorouracilo, metotrexato o aminopterina; una antraciclina; mitomicina C), alcaloides de la vinca (por ejemplo, demecolcina; etopósido; mitramicina), y agente alquilante antitumoral tal como clorambucilo o melfalán. Otras realizaciones pueden incluir agentes tales como un coagulante, una citocina, factor de crecimiento, endotoxina bacteriana o la fracción de lípido A de una endotoxina bacteriana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los agentes terapéuticos incluirán toxinas procedentes de plantas, hongos o bacterias, tales como una toxina de cadena A, una proteína inactivadora de ribosoma, α -sarcina, aspergilina, restrictocina, una ribonucleasa, toxina diftérica o exototoxina de pseudomonas, por mencionar solo algunos ejemplos. En algunas realizaciones, se utiliza la cadena A de ricina desglucosilada.
- 45 50 En cualquier caso, se propone que agentes tales como estos puedan, si se desea, conjugarse satisfactoriamente con un anticuerpo, de una manera que permita su direccionamiento, internalización, liberación o presentación a los componentes sanguíneos en el lugar de las células tumorales diana como se requiere utilizando tecnología de conjugación conocida (véase, por ejemplo, Ghose *et al.*, *Methods Enzymol.*, 93: 280 [1983]).
- 55 60 Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona inmunotoxinas dirigidas a un marcador de cáncer de célula madre de la presente divulgación. Las inmunotoxinas son conjugados de un agente de direccionamiento específico, normalmente un anticuerpo o fragmento dirigido a tumor, con un agente citotóxico, tal como la fracción de toxina. El agente de direccionamiento se dirige a la toxina y por lo tanto destruye selectivamente células que llevan el antígeno diana. En algunas realizaciones, los anticuerpos terapéuticos emplean reticuladores que proporcionan una estabilidad *in vivo* elevada (Thorpe *et al.*, *Cancer Res.*, 48: 6396 [1988]).
- 65 En otras realizaciones, particularmente las que implican el tratamiento de tumores sólidos, se diseñan anticuerpos que tengan un efecto citotóxico o anticelular de otra manera contra la vasculatura tumoral suprimiendo el crecimiento o la división celular de las células endoteliales vasculares. Este ataque pretende conducir a un colapso vascular localizado en tumor, privando a las células tumorales, particularmente a aquellas células tumorales distales a la vasculatura de oxígeno y nutrientes, que conduce finalmente a la muerte celular y a la necrosis tumoral.

En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos basados en anticuerpos se formulan como composiciones farmacéuticas como se describe más adelante. En algunas realizaciones, la administración de una composición de anticuerpo de la presente invención da como resultado una disminución medible en el cáncer (por ejemplo, una disminución o eliminación del tumor).

5 La divulgación también proporciona kits y artículos de fabricación que comprenden uno o más anticuerpos. En determinadas realizaciones, los kits comprenden al menos dos anticuerpos. En determinadas realizaciones, los kits comprenden al menos dos anticuerpos que se unen específicamente a una proteína RSPO humana o una proteína LGR humana.

10 Cribado de fármacos

15 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona ensayos de cribado de fármacos (por ejemplo para cribar fármacos contra el cáncer). En determinadas realizaciones, los métodos de cribado de la presente divulgación utilizan marcadores de cáncer de células madre identificados utilizando los métodos de la presente divulgación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de cribado de un compuesto que altera (por ejemplo aumenta o disminuye) la expresión de genes marcadores de cáncer de células madre. En algunas realizaciones, los compuestos candidatos son agentes antisentido o agentes ARNip (por ejemplo, oligonucleótidos) dirigidos contra marcadores de cáncer. En otras realizaciones, los compuestos candidatos son 20 anticuerpos que se unen específicamente a un marcador de cáncer de célula madre de la presente divulgación. En determinadas realizaciones, las bibliotecas de compuestos de moléculas pequeñas se criban utilizando los métodos descritos en el presente documento.

25 En un método de cribado, se evalúan compuestos candidatos con respecto a su capacidad para alterar la expresión del marcador de cáncer de la célula madre poniendo en contacto un compuesto con una célula que expresa un marcador de cáncer de célula madre y después ensayando el efecto de los compuestos candidatos sobre la expresión. En algunas realizaciones, el efecto de los compuestos candidatos sobre la expresión de un gen marcador de cáncer se ensaya detectando el nivel del ARNm de marcador de cáncer expresado por la célula. La expresión del ARNm puede detectarse mediante cualquier método adecuado. En otras realizaciones, el efecto de los compuestos 30 candidatos sobre la expresión de genes marcadores de cáncer se ensaya midiendo el nivel de polipéptido codificado por los marcadores de cáncer. El nivel del polipéptido expresado puede medirse utilizando cualquier método adecuado incluyendo, pero sin limitación, los desvelados en el presente documento. En algunas realizaciones, se detectan otros cambios en la biología celular (por ejemplo, la apoptosis).

35 Específicamente, la presente divulgación proporciona métodos de cribado para identificar moduladores, es decir compuestos o agentes candidatos o de ensayo (por ejemplo, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, peptoides, moléculas pequeñas u otros fármacos) que se unen a, o alteran la señalización o función asociada con los marcadores de cáncer de la presente divulgación, tienen un efecto inhibidor (o estimulador) por ejemplo sobre la expresión del marcador de cáncer de célula madre o la actividad de marcadores de cáncer, o tienen un efecto 40 estimulador o inhibidor sobre, por ejemplo, la expresión o actividad de un sustrato de marcador de cáncer. Los compuestos así identificados pueden utilizarse para modular la actividad de productos génicos diana (por ejemplo, genes marcadores de cáncer de célula madre) bien directamente o indirectamente en un protocolo terapéutico, para elaborar la función biológica del producto genético diana o para identificar compuestos que alteran las interacciones normales de genes diana. Los compuestos que inhiben la actividad o expresión de marcadores de cáncer son útiles 45 en el tratamiento de trastornos proliferativos, por ejemplo, cáncer, particularmente cáncer metastásico, o en la eliminación o control de células madre tumorales para prevenir o reducir el riesgo de cáncer.

50 En una realización, la divulgación proporciona ensayos para cribar compuestos candidatos o de ensayo que son sustratos de proteínas o polipéptidos marcadores de cáncer o una parte biológicamente activa de los mismos. En otra realización, la divulgación proporciona ensayos para cribar compuestos candidatos o de ensayo que se unen a o modulan la actividad de una proteína o polipéptido marcador de cáncer o una parte biológicamente activa de los mismos.

55 Los compuestos de ensayo de la presente divulgación pueden obtenerse utilizando cualquiera de las numerosas estrategias en métodos de biblioteca combinatoria conocidos en la técnica, incluyendo bibliotecas biológicas; bibliotecas de peptoides (bibliotecas de moléculas que tienen las funcionalidades de péptidos, pero con una nueva estructura no peptídica, que son resistentes a degradación enzimática pero que, sin embargo, permanecen bioactivas; véase, por ejemplo, Zuckermann *et al.*, *J. Med. Chem.* 37: 2678-85 [1994]); bibliotecas de fase en solución o en fase sólida paralelas espacialmente dirigibles; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren la desconvolución; el método de biblioteca "una perla un compuesto"; y métodos de bibliotecas sintéticas que utilizan selección de cromatografía por afinidad. La biblioteca biológica y las estrategias de bibliotecas peptoides se prefieren para su uso con bibliotecas peptídicas, mientras que las otras cuatro estrategias son aplicables a bibliotecas de compuestos de molécula pequeña u oligómeros peptídicos o no peptídicos (*Lam (1997) Anticancer Drug Des.* 12: 145).

- En la técnica pueden encontrarse ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares, por ejemplo en: DeWitt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909 [1993]; Erb *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422 [1994]; Zuckermann *et al.*, J. Med. Chem. 37: 2678 [1994]; Cho *et al.*, Science 261: 1303 [1993]; Carrell *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059 [1994]; Carell *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061 [1994]; y Gallop *et al.*, J. Med. Chem. 37: 1233 [1994].
- Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (por ejemplo, Houghten, Biotechniques 13: 412-421 [1992]), o en perlas (Lam, Nature 354: 82-84 [1991]), microplacas (Fodor, Nature 364: 555-556 [1993]), bacterias o esporas (Patente de Estados Unidos Nº 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 18651-869 [1992]) o en fagos (Scott y Smith, Science 249: 386-390 [1990]; Devlin Science 249: 404-406 [1990]; Cwirla *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 6378-6382 [1990]; Felici, J. Mol. Biol. 222: 301 [1991]).
- En una realización, un ensayo es un ensayo basado en células en el que una célula que expresa una proteína marcadora de cáncer de célula madre o una parte biológicamente activa de la misma se pone en contacto con un compuesto de ensayo, y se determina la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad del marcador del cáncer. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad del marcador de cáncer de célula madre puede realizarse controlando, por ejemplo cambios en la actividad enzimática. La célula puede, por ejemplo, ser de origen mamífero.
- También puede evaluarse la capacidad del compuesto de ensayo para modular la unión del marcador de cáncer con un compuesto, por ejemplo, un sustrato marcador de cáncer de célula madre. Esto puede realizarse, por ejemplo, acoplando el compuesto, por ejemplo, el sustrato, con un radioisótopo o marcador enzimático de tal manera que la unión del compuesto, por ejemplo, el sustrato, con un marcador de cáncer puede determinarse detectando el compuesto marcado, por ejemplo el sustrato, en un complejo.
- Como alternativa, el marcador de cáncer de célula madre se acopla con un radioisótopo o un marcador enzimático para controlar la capacidad de un compuesto de ensayo para modular la unión del marcador de cáncer a un sustrato de marcadores de cáncer en un complejo. Por ejemplo, los compuestos (por ejemplo, sustratos) pueden marcarse con ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³H, bien directa o indirectamente, y el radioisótopo puede detectarse por recuento directo de radioemisión o por recuento de centelleo. Como alternativa, los compuestos pueden marcarse enzimáticamente por ejemplo con peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa y el marcador enzimático puede detectarse por determinación de conversión de un sustrato apropiado en producto.
- Puede evaluarse la capacidad de un compuesto (por ejemplo, un sustrato marcador de cáncer de célula madre) para interaccionar con un marcador de cáncer de célula madre con o sin el marcate de cualquiera de los elementos que intervienen. Por ejemplo, puede utilizarse un microfisiómetro para detectar la interacción de un compuesto con un marcador de cáncer sin el marcate del compuesto ni del marcador de cáncer (McConnell *et al.* Science 257: 1906-1912 [1992]). En la manera en la que se utiliza en el presente documento, un "microfisiómetro" (por ejemplo, Citodetector) es un instrumento analítico que mide la tasa a la cual la célula acidifica su entorno utilizando un sensor potenciométrico dirigible por luz (LAPS). Los cambios en esta tasa de acidificación pueden utilizarse como un indicador de la interacción entre un compuesto y marcadores de cáncer.
- En otra realización adicional, se proporciona un ensayo sin células en el que una proteína marcadora de cáncer o parte biológicamente activa de la misma se pone en contacto con un compuesto de ensayo y se evalúa la capacidad del compuesto de ensayo para unirse a la proteína marcadora de cáncer de célula madre o parte biológicamente activa de la misma. Las partes biológicamente activas de las proteínas de marcadores de cáncer a utilizar en los ensayos de la presente divulgación incluyen fragmentos que participan en interacciones con sustratos u otras proteínas, por ejemplo, fragmentos con altas puntuaciones de probabilidad de superficie.
- Los ensayos acelulares implican la preparación de una mezcla de reacción de la proteína del gen diana y el compuesto de ensayo en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que los dos componentes interaccionen y se unan, formando así un complejo que puede retirarse y/o detectarse.
- La interacción entre dos moléculas también puede detectarse, por ejemplo, utilizando transferencia de energía fluorescente (FRET) (véase, por ejemplo, Lakowicz *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.631.169; Stavrianopoulos *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 4.968.103). Un marcador de fluoróforo se selecciona de tal manera que la energía de fluorescencia emitida por una primera molécula donante se absorba por un marcador fluorescente en una segunda molécula aceptora, que a su vez puede emitir fluorescencia debido a la energía absorbida.
- Como alternativa, la molécula de proteína "donante" puede utilizar simplemente la energía fluorescente natural de restos de triptófano. Se seleccionan marcadores que emitan diferentes longitudes de onda de luz, de tal forma que el marcador de la molécula "aceptora" pueda diferenciarse de la del donante. Dado que la eficiencia de la transferencia de energía entre los marcadores está relacionada con la distancia que separa las moléculas, puede evaluarse la relación espacial entre las moléculas. En una situación en la que se produce unión entre las moléculas, la emisión fluorescente del marcador de la molécula "aceptora" en el ensayo debe ser máxima. Un acontecimiento de unión FRET puede medirse convenientemente a través de medios de detección fluorométricos convencionales bien

conocidos en la técnica (por ejemplo, utilizando un fluorímetro).

En otra realización, la determinación de la capacidad de la proteína marcadora de cáncer de célula madre para unirse a una molécula diana puede realizarse utilizando análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIA) (véase, por ejemplo Sjolander y Urbaniczky, Anal. Chem. 63: 2338-2345 [1991] y Szabo *et al.* Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705 [1995]). La "resonancia de plasmón superficial" o "BIA" detecta interacciones biespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los elementos que interaccionan (por ejemplo BIACore). Los cambios en la masa en la superficie de unión (indicativo de un acontecimiento de unión) dan como resultado alteraciones del índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de la resonancia de plasmón superficial (SPR)) dando como resultado una señal detectable que puede utilizarse como una indicación de reacciones en tiempo real entre las moléculas biológicas.

En una realización, el producto génico diana o sustancia de ensayo se ancla sobre una fase sólida. Los complejos de producto génico diana/compuesto de ensayo anclados en la fase sólida pueden detectarse al final de la reacción. El producto génico diana puede anclarse sobre una superficie sólida y el compuesto de ensayo (que no está anclado) puede marcarse, directa o indirectamente, con marcadores detectables analizados en el presente documento.

Puede ser deseable inmovilizar marcadores de cáncer de células madre, un anticuerpo marcador anticáncer o su molécula diana para facilitar la separación de las formas que están formando complejo de las que no están formando complejo de una o las dos proteínas, así como para acomodar la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de ensayo con una proteína marcadora de cáncer de célula madre, o la interacción de una proteína marcadora de cáncer con una molécula diana en presencia y en ausencia de un compuesto candidato, puede realizarse en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Los ejemplos de dichos recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrifuga. En una realización, puede proporcionarse una proteína de fusión que añade un dominio que permite que una o las dos proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión del marcador de cáncer glutatión-S-transferasa o las proteínas de fusión glutatión-S-transferasa/diana pueden adsorberse sobre perlas de glutatión Sepharose (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que después se combinan con el compuesto de ensayo o con el compuesto de ensayo y la proteína diana no adsorbida o la proteína marcadora de cáncer, y la mezcla se incuba en condiciones conductoras para la formación de complejos (por ejemplo, en condiciones fisiológicas de sal y pH). Despues de la incubación, las perlas o los pocillos de placas de microtitulación se lavan para retirar cualquiera de los componentes no unidos, la matriz se inmoviliza en el caso de perlas, y el complejo se determina directa o indirectamente, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente.

Como alternativa, los complejos pueden disociarse de la matriz y el nivel de unión o de actividad de los marcadores de cáncer puede determinarse utilizando técnicas convencionales. Otras técnicas para inmovilizar proteínas marcadoras de cáncer o una molécula diana sobre matrices incluyen el uso de conjugación de biotina y estreptavidina. La proteína marcadora de cáncer biotinilada o las moléculas diana pueden prepararse a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) utilizando técnicas conocidas en este campo (por ejemplo el kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, IL) e inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical).

Para realizar el ensayo, el componente no inmovilizado se añade a la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Despues de completar la reacción, se retiran los componentes que no han reaccionado (por ejemplo mediante lavado) en condiciones tales que cualquiera de los complejos formados permanezca inmovilizado sobre el soporte sólido. La detección de los complejos anclados en la superficie sólida puede realizarse de diversas maneras. Cuando el componente no movilizado se ha marcado previamente, la detección del marcador inmovilizado sobre la superficie indica que se han formado los complejos. Cuando el componente no inmovilizado previamente no está marcado previamente, puede utilizarse un marcador indirecto para detectar complejos anclados en la superficie; por ejemplo, utilizando un anticuerpo marcado específico para el componente inmovilizado (el anticuerpo, a su vez, puede marcarse directamente o marcarse indirectamente, por ejemplo, con un anticuerpo anti-IgG marcado).

Este ensayo se realiza utilizando anticuerpos reactivos con proteínas marcadoras de cáncer de célula madre o moléculas diana pero que no interfieren con la unión de las proteínas marcadoras de cáncer de célula madre con su molécula diana. Dichos anticuerpos pueden derivatizarse en los pocillos de la placa y las proteínas marcadoras de cáncer o diana no unidas pueden quedar atrapadas en los pocillos por conjugación con anticuerpo. Los métodos para detectar dichos complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados en GST, incluyen inmunodetección de complejos utilizando anticuerpos reactivos con la proteína marcadora de cáncer o la molécula diana, así como ensayos ligados a enzimas que se basan en la detección de una actividad enzimática asociada con la proteína marcadora de cáncer o la molécula diana.

Como alternativa, pueden realizarse ensayos sin células en una fase líquida. En dicho ensayo, los productos de reacción se separan de los componentes que no han reaccionado, mediante diversas técnicas convencionales, incluyendo, pero sin limitación: centrifugación diferencial (véase, por ejemplo, Rivas y Minton, Trends Biochem Sci 18: 284-7 [1993]); cromatografía (cromatografía de filtración con gel, cromatografía de intercambio iónico);

electroforesis (véase, por ejemplo Ausubel *et al.*, eds. *Current Protocols in Molecular Biology* 1999, J. Wiley: Nueva York.); e inmunoprecipitación (véase, por ejemplo Ausubel *et al.*, eds. *Current Protocols in Molecular Biology* 1999, J. Wiley: Nueva York). Dichas resinas y técnicas cromatográficas son conocidas (véase por ejemplo Heegaard J. Mol. Recognit 11: 141-8 [1998]; Hageand Tweed J. Chromatogr. Biomed. Sci. App1 699: 499-525 [1997]). Además, 5 también puede utilizarse convenientemente la transferencia de energía fluorescente, como se describe en el presente documento, para detectar la unión sin purificación adicional del complejo de la solución.

El ensayo puede incluir poner en contacto la proteína marcadora de cáncer de célula madre o la parte biológicamente activa de la misma con un compuesto conocido que se une al marcador de cáncer para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interaccionar con una proteína marcadora de cáncer, donde la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para interaccionar con una proteína marcadora de cáncer incluye la determinación de la actividad del compuesto de ensayo para unirse preferentemente a marcadores de cáncer o 10 partes biológicamente activas de los mismos o modular la actividad de una molécula diana, en comparación con el compuesto conocido.

En la medida en que los marcadores de cáncer de célula madre pueden interaccionar *in vivo* con una o más macromoléculas celulares o extracelulares, tales como proteínas, son útiles inhibidores de dicha interacción. Puede 15 utilizarse un ensayo homogéneo para identificar inhibidores.

Por ejemplo, se prepara un complejo previamente formado del producto génico diana y el compañero de unión 20 celular o extracelular interactivo de tal manera que se marque el producto génico diana o su compañero de unión, pero la señal generada por el marcador se inactiva debido a la formación del complejo (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.109.496 que utiliza esta estrategia para inmunoensayos). La adición de una 25 sustancia de ensayo que compite con y desplaza una de la especie del complejo previamente formado dará como resultado la generación de una señal por encima del efecto de fondo. De esta manera, pueden identificarse sustancias de ensayo que alteran la interacción del compañero de unión-producto génico diana. Como alternativa, 30 las proteínas de marcadores de cáncer pueden utilizarse como una "proteína cebo" en un ensayo de dos híbridos o un ensayo de tres híbridos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.283.317; Zervos *et al.*, Cell 72: 223-232 [1993]; Madura *et al.*, J. Biol. Chem. 268:12046-12054 [1993]; Bartel *et al.*, Biotechniques 14: 920-924 [1993]; Iwabuchi *et al.*, Oncogene 8: 1693-1696 [1993]; y Brent, documento WO 94/10300), para identificar otras 35 proteínas que se unen a, o interaccionan con, marcadores de cáncer ("proteínas de unión a marcadores de cáncer" o "pu-marcador de cáncer") y que están implicadas en la actividad marcadora de cáncer. Dichas PU-marcador de cáncer pueden ser activadoras o inhibidoras de señales por las proteínas marcadoras de cáncer o dianas, tales como, por ejemplo, elementos cadena abajo de una ruta de señalización mediada por marcadores de cáncer.

También puede identificarse moduladores de la expresión de marcadores de cáncer. Por ejemplo, una célula o una mezcla acelular se ponen en contacto con un compuesto candidato y se evalúa la expresión de un ARNm o proteína 40 marcadora de cáncer con respecto al nivel de expresión del ARNm o proteína marcadora de cáncer de célula madre en ausencia del compuesto candidato. Cuando la expresión de un ARNm o proteína marcadora de cáncer es mayor en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un estimulador de la expresión de un ARNm o una proteína marcadora de cáncer. Como alternativa, cuando la expresión de un ARNm o proteína marcadora de cáncer es menor (es decir, menor con significado estadístico) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un inhibidor del 45 ARNm o de la proteína marcadora de cáncer. El nivel de expresión del ARNm o la proteína marcadora de cáncer puede determinarse por métodos descritos en el presente documento para detectar ARNm o proteína marcadora de cáncer.

Un agente de modulación puede identificarse utilizando un ensayo basado en células o acelular, y la capacidad del 50 agente para modular la actividad de una proteína marcadora de cáncer puede confirmarse *in vivo*, por ejemplo, en un animal tal como un modelo animal para una enfermedad (por ejemplo, una animal con cáncer de próstata o cáncer de próstata metastásico; o en un animal que lleva un xenoinjerto de un cáncer de próstata de un animal (por ejemplo un ser humano) o células de un cáncer resultante de metástasis de un cáncer de próstata (por ejemplo, contra un ganglio linfático, hueso o hígado), o células de una línea celular de cáncer de próstata.

La presente divulgación también se refiere a nuevos agentes identificados por los ensayos de cribado descritos 55 anteriormente (véase, por ejemplo más adelante la descripción de terapias contra el cáncer). Por consiguiente, se encuentra dentro del ámbito de la presente divulgación el uso adicional de un agente identificado como se describe en el presente documento (por ejemplo, un agente modulador de marcador de cáncer, una molécula de ácido nucleico marcadora de cáncer antisentido, una molécula de ARN_i, un anticuerpo específico de marcador de cáncer, o un compañero de unión de marcador de cáncer) en un modelo animal apropiado (tal como los descritos en el presente documento) para determinar la eficacia, toxicidad, efectos secundarios o mecanismo de acción del tratamiento con dicho agente. Además, los nuevos agentes identificados mediante los ensayos de cribado anteriormente mencionados pueden utilizarse, por ejemplo, para los tratamientos descritos anteriormente (por 60 ejemplo, para tratar a un paciente humano que tiene cáncer).

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para cribar fármacos candidatos, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos, con respecto a su capacidad para (a) unirse específicamente a una proteína RSPO humana o una proteína LGR humana; (b) alterar la unión entre una proteína RSPO humana y una proteína LGR humana y/o (c) alterar la activación por RSPO de la señalización de LGR.

- 5 Composiciones farmacéuticas y métodos
- 10 La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas (por ejemplo, que comprenden una molécula pequeña, una molécula antisentido, un anticuerpo o ARNip que, por ejemplo, se dirige a los marcadores de cáncer de células madre de la presente divulgación). Por tanto, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los agentes terapéuticos descritos en el presente documento, tales como los anticuerpos que se dirigen a las proteínas LGR o RSPO. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más agentes terapéuticos descritos en el presente documento comprenden adicionalmente un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 15 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de diversas maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y dependiendo de la zona a tratar. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a las membranas mucosas, incluyendo el suministro vaginal y rectal), pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular o infusión; o administración intracranial, por ejemplo, intratecal o intraventricular.
- 20 Las composiciones farmacéuticas y las formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o convenientes transportadores farmacéuticos convencionales, acuosos, en polvo o bases oleaginosas, espesantes y similares.
- 25 Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en medios acuosos o no acuosos, cápsulas, sobrecitos o comprimidos. Pueden ser convenientes espesantes, agentes saporíferos, diluyentes, emulsionantes, ayudantes de dispersión o aglutinantes.
- 30 Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también contienen tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados, tales como, pero sin limitación, potenciadores de penetración, compuestos transportadores y otros transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 35 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de diversos componentes que incluyen, pero sin limitación, líquidos previamente formados, sólidos auto emulsionantes y semisólidos auto emulsionantes.
- 40 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria individual, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de asociar los principios activos con el transportador (transportadores) o excipiente (o excipientes) farmacéutico. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima los principios activos con transportadores líquidos o transportadores sólidos finamente divididos o ambos, y después, si fuera necesario, dando forma al producto.
- 45 Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de las muchas formas farmacéuticas posibles, tales como, pero sin limitación, comprimidos, cápsulas, jarabes líquidos, geles suaves, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener adicionalmente sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano.
- 50 Las composiciones de la presente invención también pueden formularse en espumas. Las espumas farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, pero sin limitación, emulsiones, microemulsiones, cremas, gelatinas y liposomas. Aunque básicamente son similares en su naturaleza, estas formulaciones varían en los componentes y consistencia del producto final.
- 55 La suspensión también puede contener estabilizantes.
- 60 En una realización de la presente invención las composiciones farmacéuticas pueden formularse y usarse como espumas. Las espumas farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, pero sin limitación, emulsiones, microemulsiones, cremas, gelatinas y liposomas. Aunque básicamente son similares en su naturaleza, estas formulaciones varían en los componentes y consistencia del producto final.
- 65 Los agentes que potencian la captación de oligonucleótidos a nivel celular también pueden añadirse a las composiciones farmacéuticas y a otras composiciones de la presente invención. Por ejemplo, lípidos catiónicos, tales como lipofectina (Patente de Estados Unidos Nº 5.705.188), derivados de glicerol catiónico y moléculas poliacidáticas, tales como polilisina (documento WO 97/30731), también potencian la captación celular de los oligonucleótidos.

Las composiciones de la presente invención pueden contener adicionalmente otros componentes asociados convencionalmente encontrados en las composiciones farmacéuticas. Por tanto, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales adicionales compatibles farmacéuticamente activos, tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles para formular físicamente diversas formas farmacéuticas de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, agentes saporíferos, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, cuando dichos materiales se añaden, no deben interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales, para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, saporíferos y/o sustancias aromáticas y similares que no interaccionan perjudicialmente con el ácido nucleico (o ácidos nucleicos) de la formulación.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) uno o más de los agentes terapéuticos descritos en el presente documento y (b) un segundo agente anticanceroso. En determinadas realizaciones, el segundo agente anticanceroso es un agente quimioterapéutico. Determinadas realizaciones de la divulgación proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más compuestos que modulan la actividad de un marcador de cáncer de células madre (por ejemplo, un anticuerpo, una molécula pequeña, un ARNip, una molécula antisentido, etc.) y (b) uno o más agentes quimioterapéuticos distintos.

Los ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación, fármacos contra el cáncer, tales como daunorrubicina, dactinomicina, doxorrubicina, bleomicina, mitomicina, mostaza de nitrógeno, clorambucilo, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina (CA), 5-fluorouracilo (5-FU), floxuridina (5-FUDR), metotrexato (MTX), colchicina, vincristina, vinblastina, etopósido, tenipósido, cisplatino y dietilstilbestrol (DES). En determinadas realizaciones, el agente quimoterapéutico es irinotecán o paclitaxel. Los fármacos antiinflamatorios, incluyendo, pero sin limitación, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y grupos antivirales, incluyendo pero sin limitación ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en las composiciones de la invención. Otros agentes quimioterapéuticos también se encuentran dentro del ámbito de la presente divulgación.

Dos o más compuestos combinados pueden usarse conjunta o secuencialmente.

La dosificación depende de la gravedad y respuesta de la patología a tratar, durando el ciclo del tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una curación o una disminución de la patología (por ejemplo, una reducción del tamaño del tumor). Las pautas de dosificación óptimas pueden calcularse a partir de mediciones de la acumulación de fármacos en el organismo del paciente. El médico administrador puede determinar fácilmente las posologías óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición. Las pautas óptimas pueden variar dependiendo de la fuerza relativa de los oligonucleótidos individuales, y generalmente pueden calcularse basándose en los valores de CE_{50} que se encuentra que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo* o en base a los ejemplos descritos en el presente documento. En general, la pauta es de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, y puede darse una o más veces al día, a la semana, al mes o al año. El médico tratante puede estimar las tasas de repetición para la dosificación basándose en los tiempos de residencia medidos y en las concentraciones del fármaco en los tejidos o fluidos corporales. Después de un tratamiento satisfactorio, puede ser conveniente tener al sujeto bajo terapia de mantenimiento para impedir la recurrencia de la patología, en la que el oligonucleótido se administra a dosis de mantenimiento, que varían de 0,01 µg a 100 g por kg por peso corporal, de una o más veces al día a una vez cada 20 años.

La divulgación proporciona métodos de tratamiento de cáncer que comprenden administrar a un sujeto (por ejemplo, un ser humano), uno o más de los agentes terapéuticos descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, el cáncer implica células madre cancerosas. En determinadas realizaciones, el cáncer tratado es cáncer de mama o cáncer de colon.

En algunas realizaciones, el sujeto tratado con los métodos descritos en el presente documento tiene un tumor sólido. En algunas realizaciones, el sujeto tratado con los métodos descritos en el presente documento ha tenido un tumor sólido que se ha extirpado. En determinadas realizaciones, el tumor comprende células madre de tumor sólido. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor que sobreexpresa LGR5 (con respecto a células normales del mismo tipo de tejido). En determinadas realizaciones, el tumor no sobreexpresa de manera significativa una proteína Wnt con respecto al tejido normal, y por tanto, el tumor presenta expresión normal de Wnt. En algunas realizaciones alternativas, el tumor sobreexpresa al menos una proteína Wnt.

En determinadas realizaciones, antes de la administración del agente terapéutico, se examina al sujeto que tiene un tumor para identificar si el tumor sobreexpresa LGR5 o si comprende células madre cancerosas que sobreexpresan LGR5.

La divulgación proporciona un método de tratamiento de cáncer o de inhibición del crecimiento de un tumor en un ser humano, que comprende administrar al ser humano de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que

(a) altera la unión de una proteína R-espondina (RSPO) humana y un receptor acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina (LGR); y/o (b) altera la activación de la señalización de LGR por RSPO.

- 5 La divulgación también proporciona un método de tratamiento de cáncer o de inhibición del crecimiento tumoral inhibiendo la señalización de la beta catenina en una célula tumoral, que comprende poner en contacto dicha célula tumoral con un agente que (a) altera la unión de una proteína R-espondina (RSPO) humana y un receptor acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina humana (LGR); y/o (b) altera la activación de la señalización de LGR por RSPO. En determinadas realizaciones, el método es un método *in vivo*. En realizaciones alternativas, el método es un método *in vitro*.
- 10 En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de cáncer (por ejemplo, un cáncer que comprende células madre cancerosas), comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una proteína R-espondina (RSPO) humana.
- 15 En determinadas realizaciones, la proteína RSPO humana es RSPO1. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para inhibir el crecimiento tumoral, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una proteína R-espondina (RSPO) humana. En determinadas realizaciones, la proteína RSPO humana es RSPO1. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor que comprende células madre de tumor sólido. En determinadas realizaciones, el anticuerpo altera la unión de la proteína RSPO humana con una proteína LGR humana. En determinadas realizaciones alternativas, el anticuerpo altera la activación de la señalización de LGR por RSPO y/o altera la señalización de la beta catenina.
- 20 25 En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento del cáncer que comprende células madre de cáncer, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un dominio extracelular de una proteína LGR humana. En determinadas realizaciones, el dominio extracelular comprende los aminoácidos 22-564 de la LGR5 humana (SEC ID N°: 1). En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano.
- 30 35 En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para inhibir el crecimiento tumoral, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una proteína LGR humana. En determinadas realizaciones, la proteína LGR humana es LGR5. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor que comprende células madre de tumor sólido. En determinadas realizaciones, el anticuerpo altera la unión de una proteína RSPO humana con la proteína LGR humana. En determinadas realizaciones alternativas, el anticuerpo altera la activación de la señalización de LGR por RSPO y/o altera la señalización de la beta catenina.
- 40 45 En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de cáncer que comprende células madre de cáncer, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un receptor soluble que comprende un dominio extracelular de la LGR5 humana. En determinadas realizaciones, el dominio extracelular comprende los aminoácidos 22-564 de la LGR5 humana (SEC ID N°: 1). En determinadas realizaciones, el dominio extracelular de la LGR5 humana está unido en fase a una secuencia de proteína no-LGR. En determinadas realizaciones, la proteína no-LGR es un Fc humano.
- 50 55 La divulgación proporciona adicionalmente métodos para inhibir la proliferación de células madre cancerosas y/o disminuir el número o la proporción de células madre cancerosas en un sujeto que comprende administrar al sujeto uno o más de los agentes terapéuticos descritos en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos anti-LGR y anti-RSPO.
- 60 En determinadas realizaciones, los métodos comprenden la administración de un agente terapéutico a un sujeto que comprende adicionalmente la administración de un segundo agente anticanceroso al sujeto. El agente terapéutico y el segundo agente anticanceroso pueden administrarse al mismo tiempo (simultáneamente) o a diferentes tiempos (por ejemplo, secuencialmente). En determinadas realizaciones, los dos agentes se administran al sujeto como parte de la misma composición. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico se administra al sujeto en una composición, mientras que el segundo agente anticanceroso se administra al sujeto en una segunda composición.
- 65 66 En determinadas realizaciones, los sujetos son mamíferos. En determinadas realizaciones, los sujetos a los cuales se administran los agentes terapéuticos son seres humanos.
- 67 La presente divulgación proporciona adicionalmente kits y artículos de fabricación que comprenden tanto un agente terapéutico descrito en el presente documento, así como un segundo agente anticanceroso. En determinadas realizaciones el segundo agente anticanceroso es un agente quimioterapéutico.

Animales transgénicos que expresan genes marcadores de cáncer

La presente divulgación contempla la generación de animales transgénicos que comprenden un gen marcador de cáncer exógeno de la presente divulgación o mutantes y variantes de los mismos (por ejemplo, truncamientos o polimorfismos de un solo nucleótido) o *knock-outs* (genosuprimidos) de los mismos. En algunas realizaciones, el animal transgénico presenta un fenotipo alterado (por ejemplo la presencia aumentada o disminuida de marcadores) en comparación con animales de tipo silvestre (no mutados). Los métodos para analizar la presencia o ausencia de dichos fenotipos incluyen, pero sin limitación, los desvelados en el presente documento. En algunas realizaciones, los animales transgénicos presentan adicionalmente un crecimiento aumentado o disminuido de tumores o indicios de cáncer.

Los animales transgénicos de la presente divulgación encuentran uso en cribado de fármacos (por ejemplo, terapia contra el cáncer). En algunas realizaciones, los compuestos de ensayo (por ejemplo, un fármaco que se sospecha que es útil para tratar el cáncer) y los compuestos de control (por ejemplo, un placebo) se administran a los animales transgénicos y a los animales de control y se evalúan los efectos.

Los animales transgénicos pueden generarse mediante diversos métodos. En algunas realizaciones, se usan células embrionarias en varias fases de desarrollo para introducir transgenes para la producción de animales transgénicos. Dependiendo de la fase de desarrollo de la célula embrionaria se usan diferentes métodos. El cigoto es la mejor diana para la microinyección. En el ratón, el pronúcleo del macho alcanza un tamaño de aproximadamente 20 micras de diámetro lo que permite realizar una inyección reproducible de 1-2 picolitros (pl) de solución de ADN. El uso de cigotos como una diana para la transferencia génica tiene la ventaja principal de que en la mayoría de los casos el ADN inyectado se incorporará en el genoma del hospedador antes de la primera escisión (Brinster *et al.*, 1985, PNAS 82: 4438-4442). Como consecuencia, todas las células del animal no humano transgénico llevarán el transgén incorporado. Esto también se reflejará en general, en la transmisión eficaz del transgén a la descendencia del fundador ya que el 50 % de las células germinales llevarán el transgén. La Patente de Estados Unidos Nº 4.873.191 describe un método para la microinyección de cigotos.

En otras realizaciones, para introducir transgenes en un animal no humano se usa infección retroviral. En algunas realizaciones, el vector retroviral se utiliza para transfectar oocitos inyectando el vector retroviral en el espacio perivitelino del oocito (Patente de Estados Unidos Nº 6.080.912).

En otras realizaciones, el embrión no humano en desarrollo puede cultivarse *in vitro* en la fase de blastocisto. Durante este tiempo, los blastómeros pueden ser dianas para la inyección retroviral (Janenich, 1976, PNAS 73: 1260). La infección eficaz de los blastómeros se obtiene por tratamiento enzimático para retirar la zona pelúcida (Hogan *et al.*, in Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. [1986]). El sistema de vector viral usado para introducir el transgen es normalmente un retrovirus con replicación defectuosa que lleva el transgén (Jahner *et al.*, 1985, PNAS 82: 6927). La transfección se obtiene de un modo sencillo y eficaz cultivando los blastómeros en una monocapa de células productoras de virus (Stewart, *et al.*, 1987, EMBO J., 6: 383).

Como alternativa, la infección puede realizarse en una fase tardía. El virus o las células productoras de virus, pueden inyectarse en el blastocele (Jahner *et al.*, 1982, Nature 298: 623). La mayoría de los fundadores serán mosaicos para el transgén dado que la incorporación solo se produce en un subconjunto de células que forma el animal transgénico. Además, el fundador puede contener diversas inserciones retrovirales del transgén en diferentes posiciones en el genoma que generalmente se segregarán en la descendencia. Además, también es posible introducir transgenes en la línea germinal, aunque con baja eficiencia, por infección retroviral intrauterina del embrión a la mitad de la gestación (Jahner *et al.*, citado anteriormente [1982]). Medios adicionales del uso de retrovirus o vectores retrovirales para crear animales transgénicos conocidos en la técnica implican la microinyección de partículas retrovirales o células tratadas con mitomicina C que producen retrovirus en el espacio perivitelino de huevos fertilizados o embriones tempranos (Solicitud Internacional PCT WO 90/08832 [1990], y Haskell y Bowen, 1995, Mol. Reprod. Dev., 40: 386).

En otras realizaciones, el transgén se introduce en células madre embrionarias y las células madre transfectadas se utilizan para formar un embrión. Las células ME se obtienen cultivando embriones preimplantados *in vitro* en condiciones apropiadas (Evans *et al.*, 1981, Nature 292: 154; Bradley *et al.*, 1984, Nature 309: 255; Gossler *et al.*, 1986, PNAS 83: 9065; y Robertson *et al.*, 1986, Nature 322: 445). Los transgenes pueden introducirse eficazmente en las células ME mediante transfección de ADN mediante diversos métodos conocidos en la técnica incluyendo coprecipitación con fosfato de calcio, fusión de protoplastos o esferoplastos, lipofección y transfección mediada con DEAE dextrano. Los transgenes también pueden introducirse en células ME mediante transducción mediada por retrovirus o por microinyección. Dichas células ME transfectadas pueden después colonizar un embrión tras su introducción en el blastocele de un embrión en fase blastocisto y contribuir a la línea germinal del animal químérico resultante (para una revisión, véase, Jaenisch, Science, 1988, 240: 1468). Antes de la introducción de las células ME transfectadas en el blastocele, las células ME transfectadas pueden someterse a diversos protocolos de selección para enriquecer células ME que tienen integrado el transgén suponiendo que el transgén proporcione un medio para dicha selección. Como alternativa, puede usarse la reacción en cadena de la polimerasa para cribar las

células ME que tengan integrado el transgén. Esta técnica obvia la necesidad del crecimiento de las células ME transfectadas en condiciones selectivas apropiadas antes de transferir en el blastocele.

En otras realizaciones más, se utiliza la recombinación homóloga para funcionar como genes *knock-out* o crear 5 mutantes de delección (por ejemplo, mutantes de truncamiento). En la Patente de Estados Unidos Nº 5.614.396 se describen métodos de recombinación homóloga.

EXPERIMENTOS

10 Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar y adicionalmente ilustrar diversas realizaciones y aspectos de la presente invención y no deben considerarse como limitantes del alcance de la misma.

Ejemplo 1

15 LGR5 se sobreexpresa en células madre cancerosas en relación con células tumorales no tumorigénicas

Recientemente se ha demostrado que los tumores de mama humanos neoplásicos albergan una pequeña población, distinta, de células madre cancerosas, que están enriquecidas por la capacidad para formar tumores en ratones inmunodeficientes. Se descubrió que una población de células ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- estaba 50 veces 20 enriquecida para células tumorales de mama tumorigénicas en comparación con las células tumorales no fraccionadas (Al-Hajj *et al.*, 2003, PNAS 100: 3983-8). Una población similar de células madre cancerosas ESA+ CD44+ se ha identificado en cánceres de colon (Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 11/591.019). Un análisis de micromatriz de células madre cancerosas tumorigénicas seleccionadas por FACS en comparación con células tumorales no tumorigénicas ha revelado diversos marcadores de células madre cancerosas regulados positivamente 25 en células madre cancerosas en relación con células tumorales no tumorigénicas (Solicitudes de Patente de Estados Unidos Nos 10/864.207 y 11/050.282).

Estos datos de micromatriz también revelaron que LGR5 se sobreexpresaba en células madre de cáncer de colon en comparación con células tumorales no tumorigénicas (Fig. 1). Se aislaron células madre de cáncer de colon 30 tumorigénicas (TG) de células tumorales en conjunto basándose en los marcadores de superficie celular usando FACS. Específicamente, las células se contaron, se lavaron dos veces con HBSS que contenía suero de ternero termoinactivado (HICS) al 2 % y HEPES 25 mM y se resuspendieron a 10⁶ células por 100 ul. Las células tumorales se incubaron con anticuerpos de rata anti-CD3, CD4, CD8, Ter119, Mac1 y Gr1 de ratón conjugados con una perla magnética y se procesaron sobre una columna magnética para retirar las células hematopoyéticas de ratón. 35 Despues, las células tumorales se incubaron con un anticuerpo de cabra anti-rata conjugado con Cy5.5-PE y con el colorante de viabilidad, yoduro de propidio, para detectar y retirar las restantes células hematopoyéticas de ratón y las células muertas, respectivamente. Despues de bloquear, las células se incubaron adicionalmente con anticuerpos conjugados con fluorescencia contra células H-2K^d de ratón, ESA (Miltenyi Biotec; Auburn, CA) y CD44 (Bioscience, San Diego, CA) humanos, para retirar células de ratón y seleccionar positivamente células tumorales 40 humanas que expresaban ESA y CD44. Se realizó citometría de flujo en un FACSaria (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) con el uso de perfiles de dispersión lateral y de dispersión directa para seleccionar células sencillas. Primero, se excluyeron células positivas a yoduro de propidio y Cy5.5-PE+ y se aisló una fracción de células ESA+44+ independientemente de una fracción de células tumorales no-ESA+44+.

45 Para identificar marcadores para células madre de cáncer de colon frente a células tumorales no tumorigénicas se utilizó análisis de micromatriz. Se aisló ARN total de células madre cancerosas tumorigénicas separadas por FACS y células de tumor sólido no tumorigénicas usando RNasy (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se prepararon sondas para análisis de micromatriz y se hibridaron con microplacas génicas HG-U133 de Affymetrix de acuerdo con los protocolos de Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA). Las matrices se escanearon 50 con un microscopio confocal láser ion-argón y la intensidad de cada conjunto de sondas en la matriz se evaluó con un programa informático de Affymetrix Microarray Versión 4.0 de acuerdo con los procedimientos de Affymetrix. Los análisis de micromatriz de tres cánceres de colon diferentes (C4, C6 y C9) revelaron la sobreexpresión de LGR5 en células madre de tumor sólido tumorigénicas en comparación con células de tumor sólido no tumorigénicas (Fig. 1).

55 Los análisis de micromatriz usando ARNm aislado de tumores y correspondiente tejido normal de una gran cantidad de pacientes humanos (GeneLogic BioExpress Datasuite) revelaron adicionalmente expresión aumentada de LGR5 así como LGR6 en tumores humanos de origen epitelial. La expresión de LGR5 en muestras de pacientes individuales de una amplia serie de tumores epiteliales se comparó con la expresión en epitelios de órganos normales. LGR5 en la microplaca HG-U133_Plus_2, fragmentoID(MicroplacaID) 244395(51), mostró expresión 60 aumentada en la mayoría de los tumores pero especialmente en tumores de colon, hígado, ovario y pulmón (Fig. 2). De manera similar, LGR6 sobre la microplaca HG-U133_Plus_2, fragmentoID(MicroplacaID) 258288(51), mostró expresión alterada en la mayoría de los tumores epiteliales (Fig. 3).

Ejemplo 2

RSPO1 activa la señalización de la beta catenina mediante LGR5

5 Este ejemplo describe la activación de la señalización de la beta catenina por RSPO1 mediante LGR5.

En determinadas realizaciones, un ensayo con el indicador de luciferasa 8xTCF demostró que la RSPO1 activaba la expresión de un promotor sensible a la beta catenina. Se generó una construcción RSPO1-Fc usando técnicas convencionales de ADN recombinante. Específicamente, la RSPO1 humana de longitud completa, se ligó en fase 10 con la Fc humana y la proteína RSPO1-Fc recombinante se expresó en células de insecto usando baculovirus. Después, la RSPO1-Fc recombinante se purificó del medio de insecto acondicionado usando cromatografía con proteína A. Células HEK 293 transfectadas de manera estable con un indicador de luciferasa 8xTCF se expusieron a RSPO1-Fc a concentraciones en aumento gradualmente, durante un total de doce horas. Las células indicadoras mostraron una actividad luciferasa más grande en respuesta a concentraciones en aumento de RSPO 1 (Fig. 4).

15 Se evaluó el efecto de la LGR5 soluble sobre la activación de RSPO1 del promotor sensible a la beta catenina 8xTCF (Fig. 5). Se generó una construcción de LGR5-Fc soluble usando técnicas convencionales de ADN recombinante. Específicamente, los aminoácidos 1 a 564 de la LGR5 humana se ligaron en fase con la Fc humana y la LGR5-Fc recombinante se expresó en células de insecto usando baculovirus. La escisión de la secuencia señal de LGR5 dio como resultado una proteína de fusión madura LGR5-Fc que contenía los aminoácidos 22-564 de LGR5. Las células HEK 293 transfectadas de manera estable con una construcción indicadora de luciferasa 8xTCF se cultivaron en placas de 96 pocillos y se expusieron a cualquiera de: medio de control; RSPO1-Fc 2,5 ug; o RSPO1-Fc en combinación con concentraciones en aumento de LGR5-Fc soluble durante 24 horas. La LGR5 soluble inhibió la activación de RSPO1 de la actividad luciferasa mediante el promotor sensible a la beta catenina.

25 La LGR5 soluble también inhibe específicamente la activación sinérgica de la señalización de la beta catenina por RSPO1 y Wnt3B. Se cultivaron células HEK 293 transfectadas de manera estable con una construcción indicadora de luciferasa 8xTCF en placas de 96 pocillos y se expusieron a cualquiera de: medio de control (LCM, medio acondicionado de células L); RSPO1-Fc 2,5 ug en LCM; Wnt3A (Wnt 3A que contenía medio acondicionado de células L); o una combinación de RSPO1-Fc y Wnt3A junto con concentraciones en aumento de LGR5-Fc soluble (Fig. 6A) o FZD10-Fc soluble (Fig. 6B) durante 24 horas. La RSPO1 y Wnt3A actuaban sinérgicamente activando la actividad luciferasa del promotor de la beta catenina y la LGR5 soluble inhibía esta activación (Fig. 6A). Por otro lado, la FZD10 soluble no tenía ningún efecto (Fig. 6B).

35 Para determinar el mecanismo mediante el cual la RSPO1 activa la señalización de la beta catenina, se usó análisis FACS para evaluar la unión entre RSPO1 y LGR5. En determinadas realizaciones, se determinó la unión entre la LGR5 soluble y la RSPO1 de superficie celular. La proteína RSPO1 de superficie celular se generó ligando la RSPO1 humana de longitud completa con el dominio transmembrana de CD4 usando técnicas convencionales de ADN recombinante (RSPO1-CD4TM). Las células HEK 293 se transfectaron de manera transitoria con RSPO1-40 CD4TM y GFP. Después de 48 horas, las células se suspendieron en PBS enfriado con hielo que contenía FCS al 2 % y después se incubaron en hielo en presencia de LGR5-Fc, LRP6-ECD-Fc (que contenía el dominio extracelular de la LRP6 humana fusionado a un dominio Fc), LRP6E1-2-Fc (que contenía los aminoácidos 1-629 de la LRP6 humana fusionado a un dominio Fc), o de diversas construcciones de FZD-Fc, incluyendo FZD1-10. Las células transfectadas con RSPO1 interaccionaron con LGR5 pero no interaccionaron con ninguna de las construcciones de FZD (Fig. 7A). Solamente se detectó una interacción débil entre RSPO1 y el coreceptor WNT LRP6.

50 En determinadas realizaciones, se determinó la unión entre la RSPO1 soluble y la LGR5 de superficie celular. Se generó una proteína LGR5 de superficie celular variante ligando los aminoácidos 22-564 de LGR5 a una etiqueta FLAG N terminal y al dominio transmembrana de CD4 usando técnicas convencionales de ADN recombinante (FLAG-LGR5-CD4TM). Células HEK 293 se transfectaron de manera transitoria con FLAG-LGR5-CD4TM y GFP. Después de 48 horas, las células se suspendieron en PBS enfriado con hielo que contenía FCS al 2 % y heparina y después se incubaron en hielo en presencia de RSPO1-Fc, FZD8-Fc o un anticuerpo FLAG como control positivo. La RSPO1 soluble interacciona con células transfectadas con LGR5 pero la FZD8 no lo hizo (Fig. 7B).

55 Para determinar si otros miembros de la familia RSPO también podían unirse a LGR5 se realizaron estudios adicionales examinando la interacción de cada miembro de la familia RSPO con LGR5. Células HEK 293 se transfectaron de manera transitoria con FLAG-LGR5-CD4TM y GFP. Después de 48 horas, las células se suspendieron en PBS enfriado con hielo que contenía heparina FCS al 2 % y después se incubaron en hielo en presencia de RSPO1-Fc, RSPO2-Fc, RSPO3-Fc, RSPO4-Fc, FZD8-Fc, como se indica (Fig. 7C) o con un anticuerpo FLAG como un control positivo. Cada miembro de la familia RSPO interaccionó con las células transfectadas con LGR5.

Ejemplo 3

Generación de anticuerpos anti-RSPO1 o anti-LGR5

5 El ejemplo 2 identifica una ruta alternativa a la activación de la beta catenina mediante RSPO1 y LGR5. Por lo tanto, el bloqueo de la interacción entre las proteínas RSPO y LGR podría alterar la sobreactivación de la señalización de la beta catenina asociada con la tumorigenidad. En determinadas realizaciones, los anticuerpos contra una proteína RSPO actúan como un agente terapéutico contra el cáncer alterando la señalización de LGR. En determinadas realizaciones, los anticuerpos contra RSPO1 alteran la interacción entre RSPO1 y LGR5. En 10 determinadas realizaciones, los anticuerpos contra una proteína LGR actúan como un agente terapéutico contra el cáncer alterando la señalización de LGR. En determinadas realizaciones, los anticuerpos contra LGR5 alteran la interacción entre RSPO1 y LGR5.

15 Este ejemplo describe la generación de anticuerpos contra RSPO1 y LGR5. Para generar anticuerpos contra RSPO2, RSPO3, RSPO4, LGR4 y LGR6 se usaron técnicas similares.

Producción de antígenos

20 En determinadas realizaciones, como antígenos para la producción de anticuerpos, se generaron fragmentos de proteína, parciales o de longitud completa, recombinantes, de la RSPO1 humana o un dominio extracelular de la LGR5 humana. Para aislar los polinucleótidos que codifican la RSPO1 o la LGR5 se usó tecnología de ADN recombinante convencional. Estos polinucleótidos se ligaron después en fase con la secuencia de etiqueta de proteína, incluyendo, por ejemplo, una Fc humana, una etiqueta de histidina, una etiqueta FLAG u otra etiqueta de proteína adecuada y se clonaron en un vector plasmídico de transferencia para la expresión mediada por baculovirus en células de insecto. Después, se usaron protocolos de transfección, infección y cultivo celular convencionales para producir células de insecto recombinantes que expresaban los correspondientes polipéptidos RSPO1 y LGR5 (O'Reilly *et al.*, *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994)). La proteína antigénica se purificó de los lisados de células de insecto usando cromatografía de afinidad. La proteína antigénica purificada se dializó frente a PBS (pH=7), se concentró a aproximadamente 1 mg/ml, 25 y se esterilizó por filtración en preparaciones para la inmunización.

Inmunización

30 Usando técnicas convencionales, se inmunizaron ratones (n=3) con la proteína antigénica RSPO1 o LGR5 purificada (Antibody Solutions; Mountain View, CA). La sangre de ratones individuales se cribó aproximadamente 70 días después de la inmunización inicial para el reconocimiento antigenico usando análisis ELISA y FACS. Se seleccionaron los dos animales que tenían las titulaciones más elevadas para el refuerzo antigenico final después de lo cual se aislaron esplenocitos para la producción de hibridomas. Las células de hibridoma se sembraron a 1 célula por pocillo en placas de 96 pocillos y el sobrenadante de cada pocillo se cribó mediante análisis ELISA y FACS 35 frente a la proteína antigenica. Se seleccionaron diversos hibridomas con alta titulación de anticuerpos y se aumentaron a escala en un cultivo en matraz estático. Los anticuerpos se purificaron del sobrenadante del hibridomas usando cromatografía de agarosa con proteína G o proteína A y los anticuerpos se ensayaron por FACS para separar las células que expresaban RSPO 1 o LGR5.

40 Análisis FACS

45 Para seleccionar anticuerpos monoclonales producidos por clones de hibridoma que reconocen la proteína LGR5 de superficie celular nativa o la RSPO1 nativa, se usaron análisis FACS. En un ejemplo, para facilitar la cribado de células por FACS, se conjugaron, un anticuerpo IgG1κ de ratón de control de isótipo, un anti-RSPO1 y anticuerpos monoclonales anti-LGR5, con Alexa Fluor™ 647 (AF647) usando el kit de Invitrogen N° A-20186. Las células HEK 293 se cotransfectaron transitoriamente con vectores de expresión que codificaban una construcción RSPO1 o LGR5 asociada a células y GFP. Después de 24 a 48 horas de transfección las células se recogieron en suspensión y se incubaron en hielo con anticuerpos anti-RSPO1 o anti-LGR5 en comparación con los anticuerpos IgG1 de control para detectar la unión de fondo del anticuerpo. Las células se lavaron y después se separaron por FACS 50 para identificar la unión de los anticuerpos a las RSPO1 o LGR5 expresadas en superficie, respectivamente.

55 En un experimento, se seleccionaron anticuerpos monoclonales producidos por clones de hibridoma que reconocen la proteína LGR5 de superficie celular nativa usando análisis FACS. Se cotransfectaron células HEK 293 de manera transitoria con vectores de expresión que codificaban una construcción de LGR5 asociada a células (FLAG-LGR5-CD4TM) y a GFP. Después de 24 a 48 horas de transfección, las células se recogieron en suspensión y se incubaron en hielo con un anticuerpo irrelevante como un control negativo (control IgG1) o con un anticuerpo anti-FLAG como control positivo para la expresión de LGR5 o con los mAb contra LGR5 (88M1, 88M5), seguido de incubación con reactivo secundario anti-mAb fluorescente conjugado con PE. Las células se lavaron y después se separaron por FACS para identificar la unión de los anticuerpos a la LGR5 expresada en la superficie, respectivamente. De esta manera se identificaron anticuerpos contra LGR5 (Figura 8). Se encontró que los anticuerpos monoclonales, 88M1 y 88M5, presentaban unión específica a LGR5. Además, puede usarse análisis 60

FACS para seleccionar anticuerpos que alteran la interacción entre una proteína RSPO y una proteína LGR (por ejemplo LGR5). Por ejemplo, se puede medir la unión de una RSPO a LGR5 mediante citometría de flujo en presencia o en ausencia de un anticuerpo contra RSPO o LGR5.

- 5 Como se muestra (Figura 9), el anticuerpo monoclonal 88M1 se identificó como un anticuerpo anti-LGR5 que inhibe la unión de RSPO a LGR5. Se transfecaron células HEK 293 de manera transitoria con FLAG-LGR5-CD4TM y GFP. La unión de la proteína de fusión RSPO1-Fc con células transfectadas se detectó por incubación con anti Fc humano conjugado con PE. El impacto del anticuerpo anti LGR5, 88M1, sobre la unión de RSPO1-Fc se evaluó mediante incubación de las células transfectadas con 88M1 como se indica y análisis con citometría de flujo. El experimento muestra que el anticuerpo 88M1 redujo la unión de RSPO1-Fc a LGR5 en las células transfectadas.
- 10

Anticuerpos químicos

- 15 Despues de identificar anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente cualquiera de RSPO1 y LGR5, estos anticuerpos se modificaron para superar la respuesta inmunitaria de anticuerpos humanos anti ratón (HAMA, *Human Anti-mouse Antibodies*) cuando se usan anticuerpos de roedores como agentes terapéuticos. Las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal seleccionado, se aislaron de células de hibridoma mediante RT-PCR y se ligaron en fase con las regiones constantes de la cadena pesada y cadena ligera kappa de la IgG1, respectivamente, en vectores de expresión de mamíferos. Como alternativa, se usó un vector de expresión de Ig humana, tal como TCAE 5.3, que contenía los genes de la región constante de cadena ligera kappa y de cadena pesada de la IgG1 humana en el mismo plásmido (Preston *et al.*, 1998, *Infection & Immunity* 66: 4137-42). Los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera químicas se cotransfiereron después en células de ovario de hámster Chino (CHO) para la producción de anticuerpos químicos. Se comparó la inmunorreactividad y la afinidad de los anticuerpos químicos con la de los anticuerpos murinos parentales por ELISA y FACS.
- 20
- 25

Anticuerpos humanizados

- 30 Dado que los agentes terapéuticos de anticuerpos químicos son todavía frecuentemente antigenicos, la producción de una respuesta inmunitaria de anticuerpos humanos anti químicos (HACA, *Human Anti-chimeric Antibodies*) contra RSPO1 o LGR5 puede requerir una humanización adicional. Para generar los anticuerpos humanizados las tres secuencias hipervariables cortas, o regiones determinantes de complementariedad (CDR), de los dominios variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo químico, descritos anteriormente, se modificaron por ingeniería genética usando tecnología de ADN recombinante en la región marco conservada del dominio variable de las secuencias de cadena ligera y pesada humana respectivamente y después se clonaron en un vector de expresión de mamífero para la expresión en células CHO. Se comparó la inmunorreactividad y afinidad de los anticuerpos humanizados con la de los anticuerpos químicos parentales por ELISA y FACS. Adicionalmente, puede usarse mutagénesis dirigida o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc. del anticuerpo humanizado.
- 35
- 40

Anticuerpos humanos

- 45 En realizaciones alternativas, los anticuerpos humanos que reconocen específicamente la proteína RSPO1 o un dominio extracelular de LGR5 se aíslan usando tecnología de presentación de fagos. Se cribó una biblioteca de anticuerpos sintéticos que contenía los dominios variables del anticuerpo humano (MorphoSys, Munich, Alemania) para el reconocimiento específico y de alta afinidad de un antígeno descrito anteriormente. Los casetes de la CDR en la biblioteca se intercambiaron específicamente mediante sitios de restricción flanqueantes únicos para la optimización de los anticuerpos. Después, las regiones variables humanas optimizadas se clonaron en un vector de expresión de Ig que contenía la cadena ligera kappa y la cadena pesada de la IgG1 humana para la expresión de anticuerpos humanos en células CHO.
- 50

Ejemplo 4

Prevención *in vivo* del crecimiento tumoral direccionando RSPO1 y LGR5

- 55 Este ejemplo describe el uso de biomoléculas que se dirigen a RSPO1 y LGR5 para efectuar el crecimiento de células tumorales *in vivo*. En determinadas realizaciones, se usan anticuerpos contra RSPO1 para inhibir el crecimiento de células tumorales *in vivo*. En determinadas realizaciones, se usan anticuerpos contra RSPO1 para inhibir el crecimiento de células tumorales *in vivo*. En determinadas realizaciones, se usa un receptor de LGR5 soluble para inhibir el crecimiento de células tumorales *in vivo*. Similares técnicas se usan con biomoléculas que se dirigen RSPO2, RSPO3, RSPO4, LGR4 y LGR6.

- 60 Las células tumorales de muestras de pacientes en las que se han realizado pases como un xenoinjerto en ratones se prepararon para inyección en animales experimentales. El tejido tumoral se extirpó en condiciones estériles, se cortó en pequeños trozos, se trituró completamente usando cuchillas estériles y se obtuvieron suspensiones unicelulares por digestión enzimática y alteración mecánica. Los trozos tumorales resultantes se mezclaron con
- 65

colagenasa III ultrapura en medio de cultivo (200-250 unidades de colagenasa por ml) y se incubaron a 37 °C durante 3-4 horas pipeteando hacia arriba y hacia abajo a través de una pipeta de 10 ml cada 15-20 minutos. Las células digeridas se filtraron a través de una malla de nylon de 42 μ l, se lavaron con RPMI/FBS al 20 % y se lavaron dos veces con HBSS. Las células tumorales disociadas se inyectaron después en ratones NOD/SCID a las 6-8

5 semanas para suscitar el crecimiento tumoral. En determinadas realizaciones, se inyectaron células de tumor mamario a una densidad de 50.000 células en 100 μ l en el panículo adiposo mamario derecho (n=10) junto con el implante de un gránulo de estrógeno. En determinadas realizaciones, se inyectaron células tumorales de colon a una densidad de 50.000 células en 100 μ l en la región del flanco del costado derecho (n=10).

10 En realizaciones alternativas, primero se separaron células tumorales disociadas en células tumorigénicas y no tumorigénicas basándose en marcadores de superficie celular antes de la inyección en animales experimentales. Específicamente, se lavaron células tumorales disociadas, como se ha descrito anteriormente, dos veces con HBSS que contenía suero de ternero termoinactivado (HICS) al 2 % y se resuspendieron a 10^6 células por 100 μ l. Se añadieron anticuerpos y las células se incubaron durante 20 minutos en hielo seguido de dos lavados con HBSS/HICS al 2 %. Los anticuerpos incluyen anti-ESA (Biomedica, Foster City, CA), anti-CD44, anti-CD24 y marcadores Lineage anti-CD2, -CD3, -CD10, -CD16, -CD18, -CD31, -CD64 y -CD140b (en su conjunto denominados Lin; PharMingen, San Jose, CA). Los anticuerpos se conjugaron directamente con fluorocromos para seleccionar de manera positiva o negativa células que expresaban estos marcadores. Las células de ratón se eliminaron seleccionando contra células H2Kd+, y las células muertas se eliminaron usando el colorante de viabilidad 7AAD. Se realizó citometría de flujo en un FACS Vantage (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Se usaron perfiles de dispersión lateral y directa para eliminar cúmulos celulares. Después, las células ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin tumorigénicas se inyectaron por vía subcutánea en ratones NOD/SCID para suscitar el crecimiento tumoral.

25 En determinadas realizaciones, se dejó que los tumores crecieran a aproximadamente 75 mm^2 antes de comenzar el tratamiento. En determinadas realizaciones, el tratamiento comenzó dos días después de las inyecciones celulares. En determinadas realizaciones, cada animal inyectado recibe 10 mg/kg de anticuerpos anti RSPO1 o control por vía intraperitoneal (i.p.). En determinadas realizaciones, cada animal inyectado recibe 10 mg/kg de un anticuerpo anti LGR5 (por ejemplo, 88M1) o un anticuerpo de control. Los animales reciben el tratamiento con anticuerpos dos veces a la semana durante un total de 6 a 8 semanas, y el tamaño del tumor se evalúa dos veces por semana. Se espera que, en comparación con los animales inyectados con control, los animales tratados con cualquiera de los anticuerpos anti-RSPO1 o anti-LGR5 muestren un crecimiento de células tumorales significativamente reducido. En determinadas realizaciones, cada animal inyectado recibe 10 mg/kg de una proteína LGR5 soluble (por ejemplo LGR5-Fc). Los animales reciben tratamiento con proteína LGR5-Fc dos veces por semana durante un total de 6 a 8 semanas, y el tamaño tumoral se evalúa dos veces por semana. Se espera que, en comparación con los animales inyectados con control, los animales tratados con la proteína LGR5 muestren un crecimiento de células tumorales significativamente reducido.

Ejemplo 5

40 Tratamiento de cánceres humanos alterando la señalización de LGR5

Este ejemplo describe métodos para el tratamiento del cáncer en pacientes humanos usando biomoléculas que alteran la señalización de LGR5 funcional. En determinadas realizaciones, para inhibir el crecimiento de un tumor sólido que comprende células madre de tumor sólido se usan anticuerpos contra RSPO1. En determinadas realizaciones, se usan anticuerpos contra LGR5 se usan para inhibir el crecimiento de un tumor sólido que comprende células madre de tumor sólido. En determinadas realizaciones, se usa un receptor de LGR5 soluble para inhibir el crecimiento de un tumor sólido que comprende células madre de tumor sólido. Se usan técnicas similares con biomoléculas que se dirigen a RSPO2, RSPO3, RSPO4, LGR4 y LGR6.

50 En determinadas realizaciones, la presencia de la expresión de un marcador de células madre cancerosas, se determina primero a partir de una biopsia tumoral. Las células tumorales de una biopsia de un paciente al que se ha diagnosticado cáncer se extraen en condiciones estériles. En determinadas realizaciones, la biopsia de tejido se congela fresca en nitrógeno líquido, embebida en O.C.T., y se corta en un criostato en secciones de 10 μ m en portaobjetos de vidrio. En determinadas realizaciones, la biopsia de tejido se fija en formalina, se embebe en parafina y se corta en un micrótomo en una sección de 10 μ m en portaobjetos de vidrio. Las secciones se incuban con los anticuerpos contra un marcador de células madre cancerosas tal como LGR5 para detectar la expresión de las proteínas. En determinadas realizaciones, la presencia de las células madre cancerosas, se determina por FACS. Las muestras de biopsia de tejido se cortan en pequeños trozos, se trocean completamente usando cuchillas estériles y las células se someten a digestión enzimática y a alteración mecánica para obtener una suspensión unicelular. Las células tumorales disociadas se incuban después con anticuerpos anti-ESA y -CD44 y la presencia de células madre tumorales se determina mediante citometría de flujo.

65 Los pacientes con cáncer cuyos tumores se diagnostican ya que expresan un marcador de células madre cancerosas se tratan con una molécula que altera la señalización de LGR5 funcional. En determinadas realizaciones, la molécula comprende anticuerpos anti-RSPO1. En determinadas realizaciones, la molécula comprende anticuerpos anti-LGR5. Los anticuerpos monoclonales humanizados o humanos anti-RSPO1 o LGR5

generados como se describe anteriormente se purifican y se formulan con un transportador farmacéutico adecuado en PBS para inyección. En determinadas realizaciones, la molécula comprende una proteína LGR5 soluble. Los pacientes se tratan una vez a la semana durante al menos 10 semanas, pero en determinados casos una vez a la semana durante al menos 14 semanas. Cada administración debe ser una dosis farmacéuticamente eficaz de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 mg/ml y en determinados casos entre aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mg/ml. El tratamiento puede administrarse antes, simultáneamente con, o después de, regímenes de radioterapia o quimioterapia usando uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como oxaliplatin, fluorouracilo, leucovorina o estreptozenocina. Se supervisa a los pacientes para determinar si dicho tratamiento ha dado como resultado una respuesta antitumoral, por ejemplo, basándose en la regresión del tumor, reducción de las 5 incidencias de nuevos tumores, disminución de la expresión antigénica tumoral, números disminución de células madre cancerosas, u otros medios para evaluar el pronóstico de la enfermedad.

Secuencias

15 ECD de LGR5 aminoácidos 22-564 (SEC ID Nº: 1)

GSSPRSGVLLRGCPTHCHCEPDGRMLLRVDCSDLGLSELPSNLSVFTSYLDLSMNNISQLPNPLPSLRFI
 EELRLAGNALTYIPKGAFTGLYSLKVLMLQNNQLRHVPTEALQNLRSLQSLRLDANHISYVPPSCFSGLHS
 LRHLWLDDNALTEIPVQAFRSLSALQAMTLALNKIHIIIPDYAFGNLSSLVVLHLHNNRIHSLGKKCFDGLH
 SLETLDLNYYNLDEFPTAIRTLSNLKELGFHSNNIRSIPEKAFVGNPSSLITIHFYDNPIQFVGRSAFQHLE
 ELRTLTNGASQITEFPDLTGATANLESLTGTGAQISSLPQTVCNQLPNLQVLDLSYNLLEDLPSFSVCQKL
 QKIDLRHNEIYEIKVDTFQQLLSRLSLNLAWNKIAIIPNAFSTLPSLIKLDLSSNLLSSFPITGLHGLTH
 LKLTGNHALQSLISSENFPPELKVIEMPTYAYQCCAFGVCENAVYKISNQWNKGDNSSMDDLHKKDAGMFQAQE
 ERDLEDFLLDFEEDLKALHSVQCSPPGPFKPCEHLLDGWLIRIGV

Secuencia de ADN de RSPO1 humana (SEC ID Nº: 2):

20 ATGCGGCTTGGGCTGTGTGGTGGCCCTGGTTCTGAGCTGGACGCACCTCACCATCAGC
 AGCCGGGGATCAAGGGAAAAGGCAGAGGCGGATCAGTGCCGAGGGGAGCCAGGCCTGT
 GCCAAAGGCTGTGAGCTCTGCTCTGAAGTCACGGCTGCCCTCAAGTGCACCCAAAGCTG
 TTCATCCTGCTGGAGAGGAACGACATCCGCCAGGTGGCGTCTGCTTGCCTGCC
 CCTGGATACTTCGACGCCGCAACCCGACATGAACAAGTCATCAAATGCAAGATCGAG
 CACTGTGAGGCCTGCTTCAGCCATAACTCTGCACCAAGTGTAAAGGAGGGCTTGTACCTG
 CACAAGGGCCGCTGCTATCCAGCTTGTCCCAGGGCTCCTCAGCTGCCATGGCACCATG
 GAGTGCAGTAGTCCTGCGCAATGTGAAATGAGCGAGTGGTCTCCGTGGGGCCCTGCTCC
 AAGAACGAGCAGCTCTGGTTCCGGAGGGGCTCCGAGGAGCGGACACGCAGGGTGCTA
 CATGCCCTGTGGGGACCATGCTGCCTGCTCTGACACCAAGGAGACCCGGAGGTGCACA
 GTGAGGAGAGTGCCGTGCTGAGGGCAGAAGAGGAGGAAGGGAGGCCAGGGCCGG
 GAGAATGCCAACAGGAACCTGCCAGGAAGGAGAGCAAGGAGGCCGGTGTGCTCTCGA
 AGACGCAAGGGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAAGGGACAGTGGGCCACTCACATCTGCA
 GGGCCTGCCTAG

Secuencia de la proteína RSPO1 humana (SEC ID Nº: 3):

MRLGLCVVALVLSWTHLTISRGIGKQRRIASAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKL
FILLERNDIROQVGVLPCPPGYFDARNPDNMNKCIKCKIEHCEACFSHNFCCKEGLYL
HKGRCYPACPEGSSAANGTMECSSPAQCEMSEWSWGPCSKKQQLCGFRRGSEERTRRL
HAPVGDHAACSDTKETRRCTVRRVPCPEGQKRRKGQGRRENANRNLARKESKEAGAGSR
RRKGQQQQQQQGTVGPLTSAGPA

5

Secuencia de ADN de la RSPO2 humana (SEC ID Nº: 4):

ATGCAGTTCGCCTTCTCCTTGCCCTCATCATTCTGAAC TGCACTGCATGGATTACAGCCAC
TGCCAAGGCAACCGATGGAGACGCAGTAAGCGAGCTAGTTATGTATCAAATCCCATTGC
AAGGGTTGTTGTCTTGTCAAAGGACAATGGGTGTAGCCATGTCAACAGAAAGTTGTT
TTCTCCTCGAAGAGAAGGGATGCGCCAGTATGGAGAGTGCCTGCATTCTGCCATCC
GGGTACTATGGACACCGAGCCCCAGATATGAACAGATGTGCAAGATGCAGAATAGAAAAC
TGTGATTCTGCTTAGCAAAGACTTTGTACCAAGTGCAAAGTAGGCTTTATTCAT
AGAGGCCGTTGCTTGATGAATGTCCAGATGGTTGCACCATTAGAAGAAACCATGGAA
TGTGTGGAAGGATGTGAAGTTGGTCATTGGAGCGAATGGGAACCTGTAGCAGAAATAAT
CGCACATGTGGATTAAATGGGTCTGGAAACCAAGAACACGGCAAATTGTTAAAAGCCA
GTGAAAGACACAATACCGTGTCCAACCATTGCTGAATCCAGGAGATGCAAGATGACAATG
AGGCATTGTCCAGGAGGGAAAGAGAACACCAAAGGCGAAGGAGAAGAGGAACAAGAAAAG
AAAAGGAAGCTGATAGAAAGGGCCAGGAGCAACACAGCGTCTCCTAGCTACAGACAGA
GCTAACCAATAA

10 Secuencia de la proteína RSPO2 humana (SEC ID Nº: 5):

MQFRLFSFALIILNCMDYSHCQGNRWRRSKRASYVSNPICKGCLSCSKDNGCSRQQKLF
FFLRREGMRQYGECLHSCPSPGYYGHRAPDMNRCARCRRIENCDSCFSKDFCTKCKVGFYLH
RGRCFDEC PDGFAPLEETMEC VEGCEVGHWSEWGTCSRNNRTCGFKWGLETRTRQIVKKP
VKDTIPCPTIAESRRCKMTMRHCPGGKRTPKAKEKRNKKKKRKLIERAQEQHSVFLATDR
ANQ

Secuencia de ADN de la RSPO3 humana (SEC ID Nº: 6):

ATGCACTTGCGACTGATTCTGGCTTTATCATTGAACTTATGGAATACATCGGC
 AGCCAAAACGCCCTCCGGGGAGGCAGCGAAGAATGCATCCTAACGTTAGTCAGGC
 TGCCAAGGAGGCTGTGCAACATGCTCAGATTACAATGGATGTTGTATGTAAGCCCAGA
 CTATTTTGCTCTGGAAAGAATTGGCATGAAGCAGATTGGAGTATGTCTCTTCATGT
 CCAAGTGGATATTATGAACTCGATATCCAGATATAAAATAAGTGTACAAAGCT
 GACTGTGATAACCTGTTCAACAAAATTTCTGCACAAAATGTAAAAGTGGATTTACTTA
 CACCTTGGAAAGTGCCTTGACAATTGCCAGAAGGGTTGGAAGCCAACAACCATACTATG
 GAGTGTGTCAGTATTGCACTGTGAGGTCACTGAATGGAATCCTTGGAGTCCATGCACG
 AAGAAGGGAAAAACATGTGGCTTCAAAAGAGGGACTGAAACACGGGTCCGAGAAATAATA
 CAGCATCCTTCAGCAAAGGGTAACCTGTGCCCCAACAAATGAGACAAGAAAGTGTACA
 GTGCAAAGGAAGAAGTGTCAAGGGAGAACGAGGAAAAAGGAAGGGAGAGGAAAAGA
 AAAAAACCTAATAAAGGAGAAAGTAAAGAAGCAATACCTGACAGCAAAGTCTGGAATCC
 AGCAAAGAAATCCCAGAGCAACGAGAAAACAAACAGCAGCAGAAGAAGCGAAAAGTCCAA
 GATAAACAGAAATCGGTATCAGTCAGCACTGTACACTAG

5 Secuencia de la proteína RSPO3 humana (SEC ID Nº: 7):

MHLRLISWLFIIINFMLEYIGSQNASRGRRQRRMHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCKPR
 LFFALERIGMKQIGVCLSSCPSPGYGTRYPDINKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYL
 HLGKCLDNCPEGLEANNHTMECVSIVHCEVSEWNPSPCTKKGKTCGFKRGTETRVREII
 QHPSAKGNLCPPTRKCTVQRKKCQKGERKKRERKRKKPNKGESKEAIPDSKSLES
 SKEIPEQRENKQQQKQRKVQDKQKSVSVSTVH

Secuencia de ADN de la RSPO4 humana (SEC ID Nº: 8):

10 ATGCGGGCGCCACTCTGCCTGCTCCTGCTCGCCACGCCGTGGACATGCTGCCCTG
 AACCGAAGGAAGAAGCAAGTGGCAGTGGCTGGGGCAACTGCACAGGCTGTATCATC
 TGCTCAGAGGAGAACGGCTGTTCCACCTGCCAGCAGAGGCTTCTGTTCATCCGCCGG
 GAAGGCATCCGCCAGTACGGCAAGTGCCTGCACGACTGTCCCCCTGGGTACTTCGGCATH
 CGCGGCCAGGAGGTCAACAGGTCAAAATGTGGGCCACTTGTGAGAGCTGCTCAGC
 CAGGACTTCTGCATCCGGTCAAGAGGCAGTTTACTTGACAAGGGGAAGTGTCTGCC
 ACCTGCCGCCGGGACTTGGCCCACCAAGAACACACGGGAGTGCCAGGGGAGTGTGAA
 CTGGGTCCCTGGGGCGCTGGAGGCCCTGCACACACAATGGAAAGACCTGCGGCTGGCT
 TGGGGCCTGGAGAGGCCGGTACGAGAGGCTGGCCGGCTGGCATGAGGAGGCAGCCACC
 TGCCAGGTGCTTCTGAGTCAAGGAAATGTCCCATCCAGAGGCCCTGCCAGGAGAGG
 AGCCCCGGCCAGAAGAAGGGCAGGAAGGACCGGCCACGCAAGGACAGGAAGCTGGAC
 CGCAGGCTGGACGTGAGGCCGCCAGGCCGGCTGCAGGCCCTGA

Secuencia de la proteína RSPO4 humana (SEC ID Nº: 9):

MRAPLCLLLLVAHAVDMLALNRRKKQVGTGLGGNCTGCIICSEENGSTCQQRLFIFIRR
 EGIRQYGKCLHDCPPGYFGIRGQEVNRCKCGATCESCFSQDFCIRCKRQFYLYKGKCLP
 TCPPGTLAHONTRECQGECELGPGGGWSPCTHNGKTCGSAWGLESRVREAGRAGHEEAAT
 CQVLSESRKCPIQRPCPGERSPGQKKGRKDERRPRKDRKLDRRLDVRPRQPGLQP

5 Secuencia de la proteína LGR4 humana (NM_18490; SEC ID Nº: 10):

MPGPLGLLCFLALGLLGSAGPSGAAPPLCAAPCSCDGDRRVDCS
 GKGLTAVPEGLSAFTQALDISMNNITQLPEDAFKNFPFLEELQLAGNDLSFIHPKALS
 GLKELKVLTQNNQLKTVPSAIRGLSALQSLRLDANHITSVPEDSFEGLVQLRHLWL
 DDNSLTEVPVHPLSNLPTLQALTALANKISSIPDFAFTNSSLVVLHLHNNKIRSLSQ
 HCFDGLDNLETLDLNYYNNLGEFPQAIKALPSLKELGFSNSISVIPDGAFDGNPLLRT
 IHLYDNPLSFVGNSAFHNLSDLHSLVIRGASMVQQFPNLTGTVHLESLLTGTKISSI
 PNNLCQEOKMLRTLDLSYNNIRDLPSFNGCHALEEISLQRNQIYQIKEGTQGLISLR
 ILDLSRNLIHEIHSRAFATLGPITNLDVSFNELTSPTEGLNGLNQLKLVGNFKLKEA
 LAAKDFVNLRSLSPVYAYQCCAFWGCDSYANLNTEDNSLQDHSAQEKGTADAANVTS
 TLENEEHSQIIIHCTPSTGAFKPCEYLLGSMIRLTVWFIFLVALFFNLLVILTTFAS
 CTSLPSSKLFIGLISVSNLFMGIYTGILTFLDAVSWGFAEFGIWWETGSGCKVAGFL
 AVFSSESIAIFLLMLATVERSLSAKDIMKNGKSNHLKQFRVAALLAFLGATVAGCFPLF
 HRGEYSASPLCLPFPTGETPSLGFTVTLVLLNSLAFLMAVIYTKLYCNLEKEDLSEN
 SQSSMIKHVAWLIFTNCIFFCPVAFFSFAPLITAIISISPEIMKSVTLIFFPLPACLNP
 VLYVFFNPKFEDWKLKRRVTKKSGSVSVSISSQGGCLEQDFYYDCGMYSHLQGNLT
 VCDCCESFLTKPVSKHLIKSHSCPALAVASCQRPEGYWSDCGTQSAHSDYADEEDS
 FVSDSSDQVQACGRACFYQSRGFPLVRYAYNLPRVKD

Secuencia de la proteína LGR6 humana (BC047905; SEC ID Nº: 11):

10 MGRPRLTLVCQVSIIISARDLSMNNLTELQPGLFHHHLRFLEELR
 LSGNHLSHIPGQAFSGLYSLKILMLQNNQLGGI PAEALWELPSLQSLRLDANLISLVP
 ERSFEGLSSLRHLWDDNALTEIPVRALNNLPALQAMTLALNRISHIPDYAFQNLTS
 VVLHLHNNRIQHLGTHSFEGLHNLETLDLNYNKLQEFPVIAIRTLGRLQELGFHNNNIK
 AIPEKAFMGNPLLQTIHFYDNPIQFVGRSAFQYLPKLHTLSLNGAMDIQEFPDLKGTT
 SLEILTLTRAGIRLLPSGMQCQLPRLRVLELSHNQIEELPSLHRCQKLEEIGLQHNRI
 WEIGADTFSQLSSLQALDLSWNAIRSIHPEAFSTLHSLVKLDLTDNQLTTLPLAGLGG
 LMHLKLKGNLALSQAFSKDSFPKLRILEVPYAYQCCPYGMCASFFKASGQWEAEDLHL

DDEESSKRPLGLLARQAENHYDQDLDELQLEMEDSKPHPSVQCSPTPGPFKPCEYLFE
SWGIRLAVWAIVLLSVLCNGLVLTVFAGGPVPLPPVKFVGAIAGANTLTGISCGLL
ASVDALTFGQFSEYGARWETGLGRATGFLAVLGSEASVLLTLAAVQCSVSCVRA
YGKSPSLGSVRAGVLGCLALAGLAAALPLASVGEYGASPLCLPYAPPEGQPAALGFTV
ALVMMNSFCFLVVAGAYIKLYCDLPRGDFEAVWDCAMVRHVAWLIFADGLLYCPVAFL
SFASMLGLFPVTPEAVKSVLLVVLPLPACLNPLLYLLFNPFRDDLRLRPRAGDGP
LAYAAAGELEKSSCDSTQALVAFSDVDLILEASEAAGRPPGLETYGFPSTLISQQPG
APRLEGSHCVEPEGNHFGNPQPSMDGEPLLRAEGSTPAGGLSGGGFQPSGLAFASH
V

Secuencia de ADN de la LGR5 humana (SEC ID Nº: 12):

ATGGACACCTCCGGCTCGGTGTGCTCCTGTCCTGCCTGTGCTGCTGCAGCTGGCGACC
GGGGCAGCTCTCCCAGGTCTGGTGTGCTGAGGGGCTCCCCACACACTGTCATTGC
GAGCCCGACGGCAGGATGTTGCTCAGGGTGGACTGCTCCGACCTGGGGCTCTGGAGCTG
CCTTCCAACCTCAGCGTCTCACCTCCTACCTAGACCTCAGTATGAACAAACATCAGTCAG
CTGCTCCGAATCCCTGCCAGTCTCCGCTTGGAGGAGTTACGTCTGGGGAAAC
GCTCTGACATACATTCCAAGGGAGCATTCACTGGCCTTACAGTCTAAAGTTCTTATG
CTGCAGAATAATCAGCTAACGACACGTACCCACAGAAGCTCTGCAGAATTGCGAACCTT
CAATCCCTGCGTCTGGATGCTAACCATCAGCTATGTGCCCCAAGCTGTTCACTGGC
CTGCATTCCCTGAGGCACCTGTGGCTGGATGACAATGCGTTAACAGAAATCCCGTCCAG
GCTTTAGAAGTTATCGGCATTGCAAGCCATGACCTTGGCCCTGAACAAAATACACCAC
ATACCAAGACTATGCCCTGGAAACCTCTCCAGCTGGTAGTTCTACATCTCCATAACAAAT
AGAACCTCCACTCCCTGGAAAGAAATGCTTGATGGCTCCACAGCCTAGAGACTTGTAG
TTAAATTACAATAACCTTGATGAATTCCCCACTGCAATTAGGACACTCTCAAACCTTAA
GAACCTAGGATTTCATAGCAACAAATATCAGGTCGATACCTGAGAAAGCATTGTTAGGCAAC
CCTTCTCTTATTACAATACATTCTATGACAATCCCATCCAATTGTTGGAGATCTGCT
TTTCAACATTACCTGAACTAAGAACACTGACTCTGAATGGTGCCTCACAAATACTGAA
TTTCCCTGATTAACTGAACTGCAAACCTGGAGAGTCTGACTTTAACGGAGCACAGATC
TCATCTCTTCCCTCAAACCGTCTGCAATCAGTTACCTAACATCTCAAAGTGCCTAGATCTGCT
TACAACCTATTAGAAGATTACCCAGTTTCAGTCTGCCAAAGCTTCAGAAAATTGAC
CTAACAGACATAATGAAATCTACGAAATTAAAGTTGACACTTCCAGCAGTTGCTTAGCCTC
CGATCGCTGAATTGGCTTGGAAACAAAATTGCTATTATTACCCCCATGCATTTCACCT
TTGCCATCCCTAATAAGCTGGACCTATCGTCCAACCTCCTGCGTCTTCCATAACT
GGGTTACATGGTTAACTCACTAAAATTAAACAGGAAATCATGCCTTACAGAGCTTGATA
TCATCTGAAAACCTTCAGAACTCAAGGTTATAGAAATGCCTTATGCTTACCAAGTGC
GCATTGGAGTGTGAGAATGCCCTATAAGATTCTAATCAATGGAATAAGGTGACAAC

AGCAGTATGGACGACCTCATAAGAAAGATGCTGGAATGTTCAGGCTCAAGATGAACGT
 GACCTTGAAGATTCCTGCTTGACTTGAGGAAGACCTGAAAGCCCTCATTCACTGCAG
 TGTTCACCTCCCCAGGCCCTCAAACCTGTGAACACCTGCTGATGGCTGGCTGATC
 AGAATTGGAGTGTGGACCATAGCAGTCTGGCACTTAATTGTAATGCTTGGTACTTCA
 ACAGTTTCAGATCCCCTCTGTACATTCCCCATTAAACTGTTAATTGGGTACATCGCA
 GCAGTGAACATGCTCACGGGAGTCTCCAGTGCCTGGCTGGTGTGGATGCCTCACT
 TTTGCAGCTTGCACGACATGGCCTGGGGAGAATGGGGTGGTGCCTATGTCATT
 GGTTTTTGTCATTTGCTCAGAATCATCTGTTTCCTGCTTACTCTGGCAGCCCTG
 GAGCGTGGGTCTCTGTGAAATATTCTGAAAATTGAAACGAAAGCTCCATTCTAGC
 CTGAAAAGTAATCATTTGCTCTGTGCCCTGCTGGCCTTGACCATGGCCGAGTCCCCTG
 CTGGTGGCAGCAAGTATGGCCCTCCCCCTCTGCCTGCCTTGCCTTGGGGAGCC
 AGCACCATGGCTACATGGCGCTCATCTGCTCAATTCCCTTGCTTCATGATG
 ACCATTGCCTACACCAAGCTCTACTGCAATTGGACAAGGGAGACCTGGAGAATATTGG
 GACTGCTCTATGGTAAAACACATTGCCCTGTTGCTCTTACCAACTGCATCCTAAACTGC
 CCTGTCCTTCTGTCCTCTCCTCTTAATAAACCTTACATTATCAGTCCTGAAGTA
 ATTAAGTTATCCTCTGGTAGTCCACTCCTGCATGTCATCTCAATCCCCTCTAC
 ATCTTGTCAATCCTCACTTAAGGAGGATCTGGTAGCCTGAGAAAGCAAACCTACGTC
 TGGACAAGATCAAAACACCCAAAGCTTGATGTCAATTAACTCTGATGATGTCGAAAAACAG
 TCCTGTGACTCAACTCAAGCCTGGTAACTTACCAAGCTCCAGCATCACTTATGACCTG
 CCTCCCAGTTCCGTGCCATCACCAGCTTATCCAGTGACTGAGAGCTGCCATTTCCCTCT
 GTGGCATTGTCCCATGTCTCTAA

Secuencia de la proteína LGR5 humana (SEC ID Nº: 13):

MDTSLGVLLSLPVLLQLATGGSSPRSGVLLRGCPTHCHCEPDGRMLLRVDCSDLGLSEL
 PSNLSVFTSYLDLSMNNISQLLPNPLPSLRFLEELRLAGNALTYIPKGAFTGLYSLKVL
 LQNNQLRHVPTEALQNLRLQLSRLDANHISYVPPSCFSGLHSLRHLWLDDNALTEIPVQ
 AFRSLSALQAMTLALNKIHIPDYAFGNLSSLVVLHLHNNRIHSLGKKCFDGLHSLETLD
 LNYYNLDEFPTAIRTLSNLKELGFHSNNIRSIPEKAFVGNPSSLITIHFYDNPIQFVGRSA
 FQHLPELRTLTLNGASQITEFPDLTGTANLESLTILTGAQISSLPQTVCNQLPNLQVLDLS
 YNLLEDLPSFSVCQKLQKIDLRHNEIYEIKVDTFQQLLRLSLNLAWNKIAIIHPNAFST
 LPSLIKLDLSSNLLSSFPITGLHGLTHLKTGNHALQSLISSENFPELKVIEMPTYAYQCC
 AFGVCENAYKISNQWNKGDNSSMDDLHKKDAGMFQAQDERDLEDFLDFEEDLKA
 CSPSPGPFPKPCHELLDGWLIRIGVWTIAVLALTCNALVTSTVFRSPLYISPIKLLIGVIA
 AVNMLTGVSSAVLAGVDAFTFGSFARHGA
 WENGVGCHVIGFLSIFASESSVFL
 LTLAAL
 ERGFSVKYS
 AKFETKAPFSSLKVI
 ILLCALLALTMAAV
 PLLGGSKYGA
 SPLCLPLPFGE
 STMGYMVAL
 ILLNSLCFL
 MMTIAYTKLYCNLDKG
 DLENIWDC
 S
 MVK
 HIA
 LLFTNC
 ILNC

PVAFLSFSSLINLTFISPEVIKFILLVVVPLPACLNPLLYILFNPHFKEDLVS LRKQTYV
 WTRSKHPSLMSINSDDVEKQSCDSTQALVFTSSSITYDLPPSSVPSPAYPVTE SCHLSS
 VAFVPCL

Secuencia de ADN de LGR5-Fc (SEC ID Nº: 14):

ATGGACACCTCCGGCTGGTGTGCTCCTGCTGCCTGTGCTGCTGCAGCTGGCGACC
 GGGGGCAGCTCTCCCAGGTCTGGTGTGCTGAGGGGCTGCCCCACACACTGTCATTGC
 GAGCCCGACGGCAGGATGTTGCTCAGGGTGGACTGCTCCGACCTGGGCTCTGGAGCTG
 CCTTCCAACCTCAGCGTCTTCACCTCCTACCTAGACCTCAGTATGAACAAACATCAGTCAG
 CTGCTCCGAATCCCCTGCCCAGTCTCCGCTTGGAGGAGTTACGTCTTGCAGGGAAAC
 GCTCTGACATACATTCCAAGGGAGCATTCACTGGCCTTACAGTCTTAAAGTTCTTATG
 CTGCAGAATAATCAGCTAACGACACGTACCCACAGAAGCTCTGCAGAATTGCGAAGCCTT
 CAATCCCTGCGTCTGGATGCTAACCAACATCAGCTATGTGCCCAAGCTGTTAGTGGC
 CTGCATTCCCTGAGGCACCTGTGGCTGGATGACAATGCGTAACAGAAATCCCCGTCCAG
 GCTTTAGAAGTTATCGGCATTGCAAGCCATGACCTTGGCCCTGAACAAAATACACCAC
 ATACCAGACTATGCCTTGGAAACCTCTCCAGCTGGTAGTTCTACATCTCCATAACAAT
 AGAATCCACTCCCTGGAAAGAAATGCTTGATGGCTCCACAGCCTAGAGACTTGTAG
 TTAAATTACAATAACCTTGATGAATTCCCCACTGCAATTAGGACACTCTCCAAACCTTAAA
 GAACTAGGATTTAGCAACAATATCAGGTCGATACCTGAGAAAGCATTGAGGCAAC
 CCTTCTCTTATTACAATACATTCTATGACAATCCCCTCAATTGTTGGAGATCTGCT
 TTTCAACATTACCTGAACTAACAAACTGACTCTGAATGGTGCCTCACAAATAACTGAA
 TTTCCTGATTTAACTGGAACCTGCAAACCTGGAGAGTCTGACTTTAACTGGAGCACAGATC
 TCATCTCTCCTCAAACCGTCTGCAATCAGTTACCTAATCTCCAAAGTGCTAGATCTGTCT
 TACAACCTATTAGAAGATTACCCAGTTTCAGTCTGCCAAAGCTTCAGAAAATTGAC
 CTAAGACATAATGAAATCTACGAAATTAAAGTTGACACTTCCAGCAGTTGCTTAGCCTC
 CGATCGCTGAATTGGCTTGGAAACAAATTGCTATTATTCAACCCATGCATTTCAC
 TTGCCATCCCTAATAAAGCTGGACCTATCGTCAACCTCCTGTCGTTTTCTATAACT
 GGGTTACATGGTTAACTCACTAAAATAACAGGAAATCATGCCCTACAGAGCTTGATA
 TCATCTGAAAACCTTCAGAACTCAAGGTTATAGAAATGCCTTATGCTTACCAAGTGCTGT
 GCATTGGAGTGTGTGAGAATGCCATAAGATTCTAATCAATGGAATAAAGGTGACAAC
 AGCAGTATGGACGACCTTCATAAGAAAGATGCTGGAATGTTCAGGCTCAAGATGAACGT
 GACCTTGAAGATTCCCTGCTTGAATTGAGGAAGACCTGAAAGCCCTCATTCAAGTGCAAG
 TGTTCACCTTCCCCAGGCCCTCAACCCCTGTGAACACCTGCTTGATGGCTGGCTGATC
 AGAATTGGAGTGGGGCGCGCCGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA
 CTCCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATC
 TCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTC

AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAG
AAAACCATCTCCAAAGCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCTGCCCCA
TCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT
CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAACTACAAGACC
ACGCCTCCCCTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA

Secuencia de la proteína LGR5-Fc (SEC ID N°: 15):

MDTSRLGVLLSLPVLLQLATGGSSPRSGVLLRGCPTHCHCEPDGRMILLRVDCSDLGLSEL
PSNLSVFTSYLDLSMNNISQLLPNPLPSLRFLEELRLAGNALTYIPKGAFTGLYSLKVL
LQNNQLRHVPTEALQNLRLQSLRLDANHISYVPPSCFSGLHSLRHLWLDDNALTEIPVQ
AFRSLSALQAMTLALNKIHHIPDYAFGNLSSLVVLHLHNNRIHSLGKCFDGLHSLETLD
LNYYNLDEFPTAIRTLSNLKELGFHSNNIRSIPEKAFVGNPSSLITIHFYDNPIQFVGRSA
FQHLPELRTLTLNGASQITEFPDLTGTANLESLTLTGAQISSLPQTVCNQLPNLQVLDLS
YNLLEDLPSFSVCQKLQKIDLRHNEIYEIKVDTFQQLLRLSLNLAWNKIAIIPNAFST
LPSLIKLDLSSNLLSSFPITGLHGLTHLKLGNHALQSLISSENFPPELKVIEMPYAYQCC
AFGVCEENAYKISNQWNKGDNSSMDDLHKDAGMFQAQDERDLEDFLIDFEEDLKALHSVQ
CSPSPGPKPCEHLLDGWLIRIGVGRADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLM
SRTPEVTCVVVDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
5 NHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de ADN de RSPO1-Fc (SEC ID N°: 16):

ATGCGGCTTGGGCTGTGTGGTGGCCCTGGTTCTGAGCTGGACGCACCTCACCATCAGC
AGCCGGGGATCAAGGGAAAAGGCAGAGGCGGATCAGTGGCAGGGGAGCCAGGCCTGT
GCCAAAGGCTGTGAGCTCTGCTCTGAAGTCACGGCTGCCTCAAGTGCACCCAGCTG
TTCATCCTGCTGGAGAGGAACGACATCCGCCAGGTGGCGTCTGCTTGCCTGCC
CCTGGATACTTCGACGCCGCAACCCGACATGAACAAGTCATCAAATGCAAGATCGAG
CACTGTGAGGCCTGCTTCAGCCATAACTCTGCACCAAGTGTAAAGGAGGGCTTGTACCTG
CACAAGGCCGCTGCTATCCAGCTTGTCCGAGGGCTCCTCAGCTGCCAATGGCACCATG
GAGTGCAGTAGTCCTGCGCAATGTGAAATGAGCGAGTGGTCTCCGTGGGGCCCTGCTCC
AAGAAGCAGCAGCTCTGTGGTTCCGGAGGGCTCCGAGGAGCGGACACGCAGGGTGCTA

CATGCCCTGTGGGGACCATGCTGCCTGCTCTGACACCAAGGAGACCCGGAGGTGCACA
GTGAGGAGAGTGCCTGCTCTGAGGGGAGAAGAGGAGGAAGGGAGGCCAGGGCCGGCGG
GAGAATGCCAACAGGAACCTGGCCAGGAAGGAGAGCAAGGAGGCCAGTGGGCCACTCACATCTGCA
AGACGCAAGGGCAGCAACAGCAGCAGCAAGGGACAGTGGGCCACTCACATCTGCA
GGGCCTGCCGGCGCGCCGACAAAACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTC
CTGGGGGACCGTCAGTCTTCCTTCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCC
CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAG
CAGTACAACACGACGTACCGTGTGGTACCGTCCCTCACCGTCCGTGACCAGGACTGGCTG
AATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCCTGCCCATCC
CGGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTATCCC
AGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG
CCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAAC
CACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCTCGGGTAAATGA

Secuencia de la proteína RSPO1-Fc (SEC ID N°: 17):

MRLGLCVVALVLSWTHLTISRGIKGKRQRRIASAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKL
FILLERNDIQRQVCLPSCPPGYFDARNPDMNKCIKCKIEHCEACFSNFCKCKEGLYL
HKGRCPACPEGSSAANGTMECSSPAQCEMSEWSPWGPCSKQQLCGFRRGSEERTRRL
HAPVGDHAACSDTKETRRCTVRRVPCPEGQKRRKGQGRRENANRNLARKESKEAGAGSR
RRKGQQQQQQQGTVGPLTSAGPAGRADKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

5

Secuencia de ADN de RSPO2-Fc (SEC ID N°: 18):

ATGCAGTTCGCCTTCTCCTTGCCCTCATCATTCTGAAC TGCACTGGATTACAGCCAC
TGCCAAGGCAACCGATGGAGACGCAGTAAGCGAGCTAGTTATGTATCAAATCCCATTGC
AAGGGTTTTGTCTTGTCAAAGGACAATGGGTGAGCCGATGTCAACAGAAAGTTGTC
TTCTCCTCGAAGAGAAGGGATGCGCCAGTATGGAGAGTGCCTGCATTCCGCCATCC
GGGTACTATGGACACCGAGCCCCAGATATGAACAGATGTCAAGATGCAGAATAGAAAAC
TGTGATTCTGCTTAGCAAAGACTTTGTACCAAGTGCAGTAGGCTTTATTCAT
AGAGGCCGTTGCTTGATGAATGTCCAGATGGTTGCACCATTAGAAGAAACCATGGAA

10

TGTGTGGAAGGATGTGAAGTTGGCATTGGAGCGAATGGGAACCTGTAGCAGAAATAATCGCACATGTGGATTAAATGGGGCTGGAAACCAGAACACGGCAAATTGTTAAAAGCCA GTGAAAGACACAATACTGTGTCCAACCATTGCTGAATCCAGGAGATGCAAGATGACAATGAGGCATTGTCCAGGAGGAAAGAGAACACCAAAGGCGAAGGAGAAGAGGAACAAGAAAAAGAAAAGGAAGCTGATAGAAAGGGCCAGGAGCAACACAGCGTCTCCTAGCTACAGACAGAGCTAACCAAGGGCGCGCCGACAAAACACTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTATCCCAGCAGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTGGACTCCGACGGCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTATGCATGAGGCTCTGCACAAACCACTACACACAGAACAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

Secuencia de la proteína RSPO2-Fc (SEC ID N°: 19):

MQFRLFSFALIILNCMDYSHCQGNRWRSKRASYVSNPICKGCLSCSKDNGCSRQQKLF
FFLRREGMRQYGECLHSCPSPGYGHRAPDMNRCARCRIENCDSCFSKDFCTKCKVGFYLH
RGRCFDECPDGFAPLEETMECVGCEVGHSEWGTCSRNNRTCGFKWGLETRTRQIVKKP
VKDTILCPTIAESRRCKMTMRHCPGGKRTPKAKEKRNKKKRKLIERAQEHSVFLATDR
ANQGRADKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPQREPQVYTLPPSDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

Secuencia de ADN de RSPO3-Fc (SEC ID N°: 20):

ATGCACTTGCAGTGATTTCTGGCTTTATCATTTGAACCTTATGGAATACATCGCAGCCAAAACGCCCTCCGGGAAGGCGCCAGCGAAGAACATGCATCTAACGTTAGTCAAGGC
TGCCAAGGAGGCTGTGCAACATGCTCAGATTACAATGGATGTTGTATGTAAGCCAGA
CTATTTTGCTCTGGAAAGAATTGGCATGAAGCAGATTGGAGTATGTCTCTCTCATG
CCAAGTGGATATTATGGAACTCGATATCCAGATATAATAAGTGTACAAATGCAAAGCT
GACTGTGATACCTGTTCAACAAAATTCTGCACAAAATGTAAGTGGATTTACTTA
CACCTTGGAAAGTGCCTTGACAATTGCCAGAAGGGTTGGAAGCCAACAACCATACTATG

10

GAGTGTGTCAGTATTGTGCACTGTGAGGTAGTGAATGGAATCCTGGAGTCCATGCACG
AAGAAGGGAAAAACATGTGGCTCAAAAGAGGGACTGAAACACGGGTCGAGAAATAATA
CAGCATCCTCAGCAAAGGGTAACCTGTGTCCCCCAACAAATGAGACAAGAAAGTGTACA
GTGCAAAGGAAGAAGTGTAGAAGGGAGAACGAGGAAAAAGGAAGGGAGAGGAAAAGA
AAAAAACCTAATAAAGGAGAAAGTAAAGAAGCAATACCTGACAGCAGAAAAGTCTGGAATCC
AGCAAAGAAATCCCAGAGCAACGAGAAAACACAGCAGCAGAAGAAGCGAAAAGTCCAA
GATAAACAGAAATCGGTATCAGTCAGCACTGTACACGGGCGCCGACAAAACACAC
TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTCCCCCA
AAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGAC
GTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAAC
AAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACATCTCAAAGCAAAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGACTCCGACGGCTCTTCTC
CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTC
CTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCG
GGTAAATGA

Secuencia de la proteína RSPO3-Fc (SEC ID N°: 21):

MHLRLISWLFIILNFMEYIGSQNASRGRRQRRMHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCKPR
LFFALERIGMKQIGVCLSSCPGYYGTRYPDINKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYL
HLGKCLDNCPEGLEANNHTMECVSIVHCEVSEWNPWSPCTKKGKTCGFKRGTETRVREII
QHPSAKGNLCPPTRNTRKCTVQRKKCQKGERGKKRERKRKKPNKGESKEAI PDSKSLES
SKEIPEQRENKQQQKRKVQDKQKSVSVSTVHGRADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
5 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de ADN de RSPO4-Fc (SEC ID N°: 22):

ATGCGGGCGCCACTCTGCCTGCTCCTGCTCGTCCACGCCGTGGACATGCTCGCCCTG
AACCGAAGGAAGAAGCAAGTGGCACTGGCCTGGGGGGCAACTGCACAGGCTGTATCATC
TGCTCAGAGGAGAACGGCTGTTCCACCTGCCAGCAGAGGCTTCTGTTCATCCGCCGG
GAAGGCATCCGCCAGTACGGCAAGTGCCTGCACGACTGTCCCCCTGGGTACTCGGCATC

CGCGGCCAGGAGGTCAACAGGTGAAAAAATGTGGGCCACTTGTGAGAGCTGCTTCAGC
 CAGGACTTCTGCATCCGGTCAAGAGGCAGTTTACTTGTACAAGGGGAAGTGTCTGCC
 ACCTGCCGCCGGCACTTGGCCACCAGAACACACGGAGTGCCAGGGGGAGTGTGAA
 CTGGGTCCCTGGGGCGCTGGAGGCCCTGCACACACAATGAAAGACCTGCGGCTCGGCT
 TGGGCCTGGAGAGCCGGTACGAGAGGCTGGCCGGCTGGCATGAGGAGGCAGCCACC
 TGCCAGGTGCTTCTGAGTCAAGGAAATGTCCCCTCCAGAGGCCCTGCCAGGAGAGG
 AGCCCCGGCCAGAAGAAGGGCAGGAAGGACCGGCCACGCAAGGACAGGAAGCTGGAC
 CGCAGGCTGGACGTGAGGCCGCCAGCCGGCTGCAGCCGGCGCCGACAAA
 CACACATGCCACCAGTGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
 CCCCCAAAACCCAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG
 GTGGACGTGAGGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGGACGGCGTGGAG
 GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTC
 TCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCAAAGGGCAGCCC
 CGAGAACACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCGAGTC
 AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGC
 AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
 TTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTC
 TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACACACAGAAGAGCCTCTCCCTG
 TCTCCGGGTAAATGA

Secuencia de ADN de RSPO4-Fc (SEC ID Nº: 23):

MRAPLCLLLVAHAVDMLALNRRKKQVGTGLGGNCTGCIICSEENGSTCQQRLFLFIRR
 EGIRQYKCLHDCPPGYFGIRGQEVNRCKKGATCESCFSQDFCIRCKRQFYLYKGKCLP
 TCPPGTLAHQNTRECQGECELGPGWGGSPCTHNGKTCGSANGLESRVREAGRAGHEEAAT
 CQVLSESRKCPIQRPCPGERSPGQKKGRKDRRPRKDRKLDRRLDVRPRQPLQPGRADKT
 HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPPVLDSDGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Oncomed Pharmaceuticals, Inc.
 <120> Composiciones y métodos para el tratamiento y el diagnóstico del cáncer
 <130> NRS/FP7076151
 15 <140>
 <141> 02-07-2008

<150> 08779934.2
 <151> 02-07-2008

5 <150> PCT/US2008/008210
 <151> 02-07-2008

<150> 60/947.611
 <151> 02-07-2007

10 <160> 23

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1
 <211> 543
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

20 <223> ECD (dominio extracelular) que comprende los aminoácidos 22-564 de la proteína LGR5 sintética

<400> 1

Gly Ser Ser Pro Arg Ser Gly Val Leu Leu Arg Gly Cys Pro Thr His
 1 5 10 15

Cys His Cys Glu Pro Asp Gly Arg Met Leu Leu Arg Val Asp Cys Ser
 20 25 30

Asp Leu Gly Leu Ser Glu Leu Pro Ser Asn Leu Ser Val Phe Thr Ser
 35 40 45

Tyr Leu Asp Leu Ser Met Asn Asn Ile Ser Gln Leu Leu Pro Asn Pro
 50 55 60

Leu Pro Ser Leu Arg Phe Leu Glu Glu Leu Arg Leu Ala Gly Asn Ala
 65 70 75 80

Leu Thr Tyr Ile Pro Lys Gly Ala Phe Thr Gly Leu Tyr Ser Leu Lys
 85 90 95

Val Leu Met Leu Gln Asn Asn Gln Leu Arg His Val Pro Thr Glu Ala
 100 105 110

Leu Gln Asn Leu Arg Ser Leu Gln Ser Leu Arg Leu Asp Ala Asn His

115

120

125

Ile Ser Tyr Val Pro Pro Ser Cys Phe Ser Gly Leu His Ser Leu Arg
 130 135 140

His Leu Trp Leu Asp Asp Asn Ala Leu Thr Glu Ile Pro Val Gln Ala
 145 150 155 160

Phe Arg Ser Leu Ser Ala Leu Gln Ala Met Thr Leu Ala Leu Asn Lys
 165 170 175

Ile His His Ile Pro Asp Tyr Ala Phe Gly Asn Leu Ser Ser Leu Val
 180 185 190

Val Leu His Leu His Asn Asn Arg Ile His Ser Leu Gly Lys Lys Cys
 195 200 205

Phe Asp Gly Leu His Ser Leu Glu Thr Leu Asp Leu Asn Tyr Asn Asn
 210 215 220

Leu Asp Glu Phe Pro Thr Ala Ile Arg Thr Leu Ser Asn Leu Lys Glu
 225 230 235 240

Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Ile Arg Ser Ile Pro Glu Lys Ala Phe
 245 250 255

Val Gly Asn Pro Ser Leu Ile Thr Ile His Phe Tyr Asn Pro Ile
 260 265 270

Gln Phe Val Gly Arg Ser Ala Phe Gln His Leu Pro Glu Leu Arg Thr
 275 280 285

Leu Thr Leu Asn Gly Ala Ser Gln Ile Thr Glu Phe Pro Asp Leu Thr
 290 295 300

Gly Thr Ala Asn Leu Glu Ser Leu Thr Leu Thr Gly Ala Gln Ile Ser
 305 310 315 320

Ser Leu Pro Gln Thr Val Cys Asn Gln Leu Pro Asn Leu Gln Val Leu
 325 330 335

Asp Leu Ser Tyr Asn Leu Leu Glu Asp Leu Pro Ser Phe Ser Val Cys
 340 345 350

Gln Lys Leu Gln Lys Ile Asp Leu Arg His Asn Glu Ile Tyr Glu Ile
 355 360 365

Lys Val Asp Thr Phe Gln Gln Leu Leu Ser Leu Arg Ser Leu Asn Leu
 370 375 380

Ala Trp Asn Lys Ile Ala Ile Ile His Pro Asn Ala Phe Ser Thr Leu
 385 390 395 400

Pro Ser Leu Ile Lys Leu Asp Leu Ser Ser Asn Leu Leu Ser Ser Phe
 405 410 415

Pro Ile Thr Gly Leu His Gly Leu Thr His Leu Lys Leu Thr Gly Asn
 420 425 430

His Ala Leu Gln Ser Leu Ile Ser Ser Glu Asn Phe Pro Glu Leu Lys
 435 440 445

Val Ile Glu Met Pro Tyr Ala Tyr Gln Cys Cys Ala Phe Gly Val Cys
 450 455 460

Glu Asn Ala Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Trp Asn Lys Gly Asp Asn Ser
 465 470 475 480

Ser Met Asp Asp Leu His Lys Lys Asp Ala Gly Met Phe Gln Ala Gln
 485 490 495

Asp Glu Arg Asp Leu Glu Asp Phe Leu Leu Asp Phe Glu Glu Asp Leu
 500 505 510

Lys Ala Leu His Ser Val Gln Cys Ser Pro Ser Pro Gly Pro Phe Lys
 515 520 525

Pro Cys Glu His Leu Leu Asp Gly Trp Leu Ile Arg Ile Gly Val
 530 535 540

<210> 2

<211> 792

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

atgcggcttg ggctgtgtgt ggtggccctg gttctgagct ggacgcaccc caccatcagc 60

agccggggga tcaaggggaa aaggcagagg cggatcaagtg ccgaggggag ccaggcctgt 120

gccaaaggct gtgagctctg ctctgaagtc aacggctgcc tcaagtgctc acccaagctg 180

ttcatcctgc tggagagggaa cgacatccgc caggtggcg tctgcttgcc gtcctgccc 240

cctggatact tcgacgcccc caaccccgac atgaacaagt gcatcaaatg caagatcgag 300

cactgtgagg cctgcttcag ccataacttc tgcaccaagt gtaaggaggg cttgtacctg 360

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| cacaaggccc | gctgctatcc | agcttgtccc | gagggctcct | cagctgccaa | tggcaccatg | 420 |
| gagtgcagta | gtcctgcgca | atgtgaaatg | agcgagtgg | ctccgtgggg | gccctgctcc | 480 |
| aagaagcagc | agctctgtgg | tttccggagg | ggctccgagg | agcggacacg | cagggtgcta | 540 |
| catgccctg | tgggggacca | tgctgcctgc | tctgacacca | aggagacccg | gaggtgcaca | 600 |
| gtgaggagag | tgccgtgtcc | tgaggggcag | aagaggagga | aggaggcca | gggcccggcgg | 660 |
| gagaatgcca | acaggaacct | ggccaggaag | gagagcaagg | aggcgggtgc | tggctctcga | 720 |
| agacgcaagg | ggcagcaaca | gcagcagcag | caagggacag | tggggccact | cacatctgca | 780 |
| gggcctgcct | ag | | | | | 792 |

<210> 3

<211> 263

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Arg | Leu | Gly | Leu | Cys | Val | Val | Ala | Leu | Val | Leu | Ser | Trp | Thr | His |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | 15 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Arg | Gly | Ile | Lys | Gly | Lys | Arg | Gln | Arg | Arg | Ile |
| | | | | | | | | | | | | | | | 30 |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Ala | Glu | Gly | Ser | Gln | Ala | Cys | Ala | Lys | Gly | Cys | Glu | Leu | Cys | Ser |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | | | | | | | | | | | | | | | 45 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Asn | Gly | Cys | Leu | Lys | Cys | Ser | Pro | Lys | Leu | Phe | Ile | Leu | Leu |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 50 | | | | | | | | | | | | | | | 60 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Arg | Asn | Asp | Ile | Arg | Gln | Val | Gly | Val | Cys | Leu | Pro | Ser | Cys | Pro |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 65 | | | | | | | | | | | | | | | 80 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Gly | Tyr | Phe | Asp | Ala | Arg | Asn | Pro | Asp | Met | Asn | Lys | Cys | Ile | Lys |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 85 | | | | | | | | | | | | | | | 95 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Lys | Ile | Glu | His | Cys | Glu | Ala | Cys | Phe | Ser | His | Asn | Phe | Cys | Thr |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 100 | | | | | | | | | | | | | | | 110 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Cys | Lys | Glu | Gly | Leu | Tyr | Leu | His | Lys | Gly | Arg | Cys | Tyr | Pro | Ala |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 115 | | | | | | | | | | | | | | | 125 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Pro | Glu | Gly | Ser | Ser | Ala | Ala | Asn | Gly | Thr | Met | Glu | Cys | Ser | Ser |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 130 | | | | | | | | | | | | | | | 140 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Ala | Gln | Cys | Glu | Met | Ser | Glu | Trp | Ser | Pro | Trp | Gly | Pro | Cys | Ser |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 145 | | | | | | | | | | | | | | | 160 |

Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr
165 170 175

Arg Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp
180 185 190

Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro Glu
195 200 205

Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn
210 215 220

Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg
225 230 235 240

Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Thr Val Gly Pro
245 250 255

Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala
260

<210> 4

<211> 732

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

atgcaggttc gcctttctc ctttgcctc atcattctga actgcatgga ttacagccac 60
tgccaaaggca accgatggag acgcagtaag cgagctagtt atgtatcaaa tcccatttgc 120
aagggttgtt tgtcttgttc aaaggacaat gggtagtgc gatgtcaaca gaagttgttc 180
ttcttccttc gaagagaagg gatgcgccag tatggagagt gcctgcattc ctgccccatcc 240
gggtactatg gacaccggagc cccagatatg aacagatgtg caagatgcag aatagaaaaac 300
tgtgattctt gcttttagcaa agactttgtt accaagtgc aagttaggctt ttatggat 360
agaggccgtt gctttgatga atgtccagat ggtttgcac cattagaaga aaccatggaa 420
tgtgtgaaag gatgtgaagt tggtcattgg agcgaatggg gaacttgcag cagaaataat 480
cgcacatgtg gattttaaatg gggctggaa accagaacac ggcaaattgt taaaaagccaa 540
gtgaaagaca caataccgtg tccaaaccatt gctgaatcca ggagatgcaa gatgacaatgg 600
aggcattgtc caggagggaa gagaacacca aaggcgaagg agaagaggaa caagaaaaag 660
aaaaggaagc tgatagaaag ggcccaggag caacacagcg tcttccttagc tacagacaga 720
qctaaccat aa 732

1210-5

<210> 5
<211> 343

<211> 243
<212> PRT

ES 2 694 018 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Met Gln Phe Arg Leu Phe Ser Phe Ala Leu Ile Ile Leu Asn Cys Met
1 5 10 15

Asp Tyr Ser His Cys Gln Gly Asn Arg Trp Arg Arg Ser Lys Arg Ala
20 25 30

Ser Tyr Val Ser Asn Pro Ile Cys Lys Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
35 40 45

Asp Asn Gly Cys Ser Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Phe Leu Arg
50 55 60

Arg Glu Gly Met Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser
65 70 75 80

Gly Tyr Tyr Gly His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys
85 90 95

Arg Ile Glu Asn Cys Asp Ser Cys Phe Ser Lys Asp Phe Cys Thr Lys
100 105 110

Cys Lys Val Gly Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys
115 120 125

Pro Asp Gly Phe Ala Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu Gly
130 135 140

Cys Glu Val Gly His Trp Ser Glu Trp Gly Thr Cys Ser Arg Asn Asn
145 150 155 160

Arg Thr Cys Gly Phe Lys Trp Gly Leu Glu Thr Arg Thr Arg Gln Ile
165 170 175

Val Lys Lys Pro Val Lys Asp Thr Ile Pro Cys Pro Thr Ile Ala Glu
180 185 190

Ser Arg Arg Cys Lys Met Thr Met Arg His Cys Pro Gly Gly Lys Arg
195 200 205

Thr Pro Lys Ala Lys Glu Lys Arg Asn Lys Lys Lys Arg Lys Leu
210 215 220

Ile Glu Arg Ala Gln Glu Gln His Ser Val Phe Leu Ala Thr Asp Arg
 225 230 235 240

Ala Asn Gln

5 <210> 6
 <211> 819
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

atgcacttgc gactgatttc ttggctttt atcatttga actttatgga atacatggc 60
 agccaaaacg cctccgggg aaggcgccag cgaagaatgc atcctaacgt tagtcaaggc 120
 tgccaaaggag gctgtgcaac atgctcagat tacaatggat gtttgcatg taagcccaga 180
 ctatttttg ctctggaaag aattggcatg aagcagattg gagtatgtct ctcttcatgt 240
 ccaagtggat attatggaac tcgatatcca gatataaata agtgtacaaa atgcaaagct 300
 gactgtgata cctgtttcaa caaaaatttc tgcacaaaat gtaaaagtgg attttactta 360
 caccttggaa agtgccttga caattgccca gaagggtgg aagccaacaa ccataactatg 420
 gagtgtgtca gtattgtgca ctgtgaggc agtgaatgga atccttggag tccatgcacg 480
 aagaaggaa aaacatgtgg cttcaaaaga gggactgaaa cacgggtccg agaaataata 540
 cagcatcctt cagcaaaggg taacctgtgt ccccaacaa atgagacaag aaagtgtaca 600
 gtgcaaagga agaagtgtca gaaggagaa cgagaaaaa aaggaaggaa gagaaaaaga 660
 aaaaaaccta ataaaggaga aagtaaagaa gcaatacctg acagcaaaag tctggaatcc 720
 agcaaagaaa tcccagagca acgagaaaaac aaacagcagc agaagaagcg aaaagtccaa 780
 10 gataaacaga aatcggtatc agtcagcact gtacactag 819

15 <210> 7
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

Met His Leu Arg Leu Ile Ser Trp Leu Phe Ile Ile Leu Asn Phe Met
 1 5 10 15

Glu Tyr Ile Gly Ser Gln Asn Ala Ser Arg Gly Arg Arg Gln Arg Arg
 20 25 30

Met His Pro Asn Val Ser Gln Gly Cys Gln Gly Gly Cys Ala Thr Cys
 35 40 45

Ser Asp Tyr Asn Gly Cys Leu Ser Cys Lys Pro Arg Leu Phe Phe Ala
 50 55 60

Leu Glu Arg Ile Gly Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys
 65 70 75 80

Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr
 85 90 95

Lys Cys Lys Ala Asp Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr
 100 105 110

Lys Cys Lys Ser Gly Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn
 115 120 125

Cys Pro Glu Gly Leu Glu Ala Asn Asn His Thr Met Glu Cys Val Ser
 130 135 140

Ile Val His Cys Glu Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr
 145 150 155 160

Lys Lys Gly Lys Thr Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val
 165 170 175

Arg Glu Ile Ile Gln His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro
 180 185 190

Thr Asn Glu Thr Arg Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys Gln Lys
 195 200 205

Gly Glu Arg Gly Lys Lys Gly Arg Glu Arg Lys Arg Lys Lys Pro Asn
 210 215 220

Lys Gly Glu Ser Lys Glu Ala Ile Pro Asp Ser Lys Ser Leu Glu Ser
 225 230 235 240

Ser Lys Glu Ile Pro Glu Gln Arg Glu Asn Lys Gln Gln Gln Lys Lys
 245 250 255

Arg Lys Val Gln Asp Lys Gln Lys Ser Val Ser Val Ser Thr Val His
 260 265 270

<210> 8

<211> 705

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

atgcgggcgc cactctgcct gctcctgctc gtcgcccacg ccgtggacat gctcgccctg 60
 aaccgaagga agaagcaagt gggcactggc ctggggggca actgcacagg ctgtatcatc
 tgctcagagg agaacggctg ttccacactgc cagcagaggc tcttcctgtt catccgcgg 120
 gaaggcatcc gccagtagcgg caagtgcctg cacgactgtc cccctggta cttcggcatc 180
 cgcggccagg aggtcaacag gtgcaaaaaa tgtggggca cttgtgagag ctgcttcage 240
 caggacttct gcatccggtg caagaggcag ttttacttgt acaaggggaa gtgtctgccc 300
 acctgcccgc cgggcacttt ggcccaccag aacacacggg agtgcaggg ggagtgtgaa 360
 ctgggtccct ggggaggctg gagccctgc acacacaatg gaaagacctg cggatcggat 420
 tggggctgg agagccgggt acgagaggct ggccgggctg ggcattgagga ggcagccacc 480
 tgccaggtgc tttctgagtc aaggaaatgt cccatccaga ggcctgccc aggagagagg 540
 agccccggcc agaagaaggg caggaaggac cggcgcccac gcaaggacag gaagctggac 600
 cgcaggctgg acgtgaggcc gcccagccc ggcctgcagc cctga 660
 705

<210> 9
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Met Arg Ala Pro Leu Cys Leu Leu Leu Val Ala His Ala Val Asp
 1 5 10 15

Met Leu Ala Leu Asn Arg Arg Lys Lys Gln Val Gly Thr Gly Leu Gly
 20 25 30

Gly Asn Cys Thr Gly Cys Ile Ile Cys Ser Glu Glu Asn Gly Cys Ser
 35 40 45

Thr Cys Gln Gln Arg Leu Phe Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gly Ile Arg
 50 55 60

Gln Tyr Gly Lys Cys Leu His Asp Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Gly Ile
 65 70 75 80

Arg Gly Gln Glu Val Asn Arg Cys Lys Lys Cys Gly Ala Thr Cys Glu
 85 90 95

Ser Cys Phe Ser Gln Asp Phe Cys Ile Arg Cys Lys Arg Gln Phe Tyr
 100 105 110

Leu Tyr Lys Gly Lys Cys Leu Pro Thr Cys Pro Pro Gly Thr Leu Ala
 115 120 125

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

Gly Gly Trp Ser Pro Cys Thr His Asn Gly Lys Thr Cys Gly Ser Ala
 145 150 155 160

Trp Gly Leu Glu Ser Arg Val Arg Glu Ala Gly Arg Ala Gly His Glu
 165 170 175

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

Gln Arg Pro Cys Pro Gly Glu Arg Ser Pro Gly Gln Lys Lys Gly Arg
 195 200 205

Lys Asp Arg Arg Pro Arg Lys Asp Arg Lys Leu Asp Arg Arg Leu Asp
 210 215 220

Val Arg Pro Arg Gln Pro Gly Leu Gln Pro
 225 230

<210> 10

<211> 951

5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Met Pro Gly Pro Leu Gly Leu Leu Cys Phe Leu Ala Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Gly Ser Ala Gly Pro Ser Gly Ala Ala Pro Pro Leu Cys Ala Ala Pro
 20 25 30

Cys Ser Cys Asp Gly Asp Arg Arg Val Asp Cys Ser Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

Thr Ala Val Pro Glu Gly Leu Ser Ala Phe Thr Gln Ala Leu Asp Ile
 50 55 60

Ser Met Asn Asn Ile Thr Gln Leu Pro Glu Asp Ala Phe Lys Asn Phe
 65 70 75 80

Pro Phe Leu Glu Glu Leu Gln Leu Ala Gly Asn Asp Leu Ser Phe Ile
 85 90 95

His Pro Lys Ala Leu Ser Gly Leu Lys Glu Leu Lys Val Leu Thr Leu
 100 105 110

Gln Asn Asn Gln Leu Lys Thr Val Pro Ser Glu Ala Ile Arg Gly Leu
 115 120 125

Ser Ala Leu Gln Ser Leu Arg Leu Asp Ala Asn His Ile Thr Ser Val
 130 135 140

Pro Glu Asp Ser Phe Glu Gly Leu Val Gln Leu Arg His Leu Trp Leu
 145 150 155 160

Asp Asp Asn Ser Leu Thr Glu Val Pro Val His Pro Leu Ser Asn Leu
 165 170 175

Pro Thr Leu Gln Ala Leu Thr Leu Ala Leu Asn Lys Ile Ser Ser Ile
 180 185 190

Pro Asp Phe Ala Phe Thr Asn Leu Ser Ser Leu Val Val Leu His Leu
 195 200 205

His Asn Asn Lys Ile Arg Ser Leu Ser Gln His Cys Phe Asp Gly Leu
 210 215 220

Asp Asn Leu Glu Thr Leu Asp Leu Asn Tyr Asn Asn Leu Gly Glu Phe
 225 230 235 240

Pro Gln Ala Ile Lys Ala Leu Pro Ser Leu Lys Glu Leu Gly Phe His
 245 250 255

Ser Asn Ser Ile Ser Val Ile Pro Asp Gly Ala Phe Asp Gly Asn Pro
 260 265 270

Leu Leu Arg Thr Ile His Leu Tyr Asp Asn Pro Leu Ser Phe Val Gly
 275 280 285

Asn Ser Ala Phe His Asn Leu Ser Asp Leu His Ser Leu Val Ile Arg
 290 295 300

Gly Ala Ser Met Val Gln Gln Phe Pro Asn Leu Thr Gly Thr Val His
 305 310 315 320

Leu Glu Ser Leu Thr Leu Thr Gly Thr Lys Ile Ser Ser Ile Pro Asn
 325 330 335

Asn Leu Cys Gln Glu Gln Lys Met Leu Arg Thr Leu Asp Leu Ser Tyr
 340 345 350

Asn Asn Ile Arg Asp Leu Pro Ser Phe Asn Gly Cys His Ala Leu Glu
 355 360 365

Glu Ile Ser Leu Gln Arg Asn Gln Ile Tyr Gln Ile Lys Glu Gly Thr
 370 375 380

 Phe Gln Gly Leu Ile Ser Leu Arg Ile Leu Asp Leu Ser Arg Asn Leu
 385 390 395 400

 Ile His Glu Ile His Ser Arg Ala Phe Ala Thr Leu Gly Pro Ile Thr
 405 410 415

 Asn Leu Asp Val Ser Phe Asn Glu Leu Thr Ser Phe Pro Thr Glu Gly
 420 425 430

 Leu Asn Gly Leu Asn Gln Leu Lys Leu Val Gly Asn Phe Lys Leu Lys
 435 440 445

 Glu Ala Leu Ala Ala Lys Asp Phe Val Asn Leu Arg Ser Leu Ser Val
 450 455 460

 Pro Tyr Ala Tyr Gln Cys Cys Ala Phe Trp Gly Cys Asp Ser Tyr Ala
 465 470 475 480

 Asn Leu Asn Thr Glu Asp Asn Ser Leu Gln Asp His Ser Val Ala Gln
 485 490 495

 Glu Lys Gly Thr Ala Asp Ala Ala Asn Val Thr Ser Thr Leu Glu Asn
 500 505 510

 Glu Glu His Ser Gln Ile Ile His Cys Thr Pro Ser Thr Gly Ala
 515 520 525

 Phe Lys Pro Cys Glu Tyr Leu Leu Gly Ser Trp Met Ile Arg Leu Thr
 530 535 540

 Val Trp Phe Ile Phe Leu Val Ala Leu Phe Phe Asn Leu Leu Val Ile
 545 550 555 560

 Leu Thr Thr Phe Ala Ser Cys Thr Ser Leu Pro Ser Ser Lys Leu Phe
 565 570 575

 Ile Gly Leu Ile Ser Val Ser Asn Leu Phe Met Gly Ile Tyr Thr Gly
 580 585 590

 Ile Leu Thr Phe Leu Asp Ala Val Ser Trp Gly Arg Phe Ala Glu Phe
 595 600 605

 Gly Ile Trp Trp Glu Thr Gly Ser Gly Cys Lys Val Ala Gly Phe Leu

610

615

620

Ala Val Phe Ser Ser Glu Ser Ala Ile Phe Leu Leu Met Leu Ala Thr
 625 630 635 640

Val Glu Arg Ser Leu Ser Ala Lys Asp Ile Met Lys Asn Gly Lys Ser
 645 650 655

Asn His Leu Lys Gln Phe Arg Val Ala Ala Leu Leu Ala Phe Leu Gly
 660 665 670

Ala Thr Val Ala Gly Cys Phe Pro Leu Phe His Arg Gly Glu Tyr Ser
 675 680 685

Ala Ser Pro Leu Cys Leu Pro Phe Pro Thr Gly Glu Thr Pro Ser Leu
 690 695 700

Gly Phe Thr Val Thr Leu Val Leu Leu Asn Ser Leu Ala Phe Leu Leu
 705 710 715 720

Met Ala Val Ile Tyr Thr Lys Leu Tyr Cys Asn Leu Glu Lys Glu Asp
 725 730 735

Leu Ser Glu Asn Ser Gln Ser Ser Met Ile Lys His Val Ala Trp Leu
 740 745 750

Ile Phe Thr Asn Cys Ile Phe Phe Cys Pro Val Ala Phe Phe Ser Phe
 755 760 765

Ala Pro Leu Ile Thr Ala Ile Ser Ile Ser Pro Glu Ile Met Lys Ser
 770 775 780

Val Thr Leu Ile Phe Phe Pro Leu Pro Ala Cys Leu Asn Pro Val Leu
 785 790 795 800

Tyr Val Phe Phe Asn Pro Lys Phe Lys Glu Asp Trp Lys Leu Leu Lys
 805 810 815

Arg Arg Val Thr Lys Lys Ser Gly Ser Val Ser Val Ser Ile Ser Ser
 820 825 830

Gln Gly Gly Cys Leu Glu Gln Asp Phe Tyr Tyr Asp Cys Gly Met Tyr
 835 840 845

Ser His Leu Gln Gly Asn Leu Thr Val Cys Asp Cys Cys Glu Ser Phe
 850 855 860

Leu Leu Thr Lys Pro Val Ser Cys Lys His Leu Ile Lys Ser His Ser
 865 870 875 880

Cys Pro Ala Leu Ala Val Ala Ser Cys Gln Arg Pro Glu Gly Tyr Trp
 885 890 895

Ser Asp Cys Gly Thr Gln Ser Ala His Ser Asp Tyr Ala Asp Glu Glu
 900 905 910

Asp Ser Phe Val Ser Asp Ser Ser Asp Gln Val Gln Ala Cys Gly Arg
 915 920 925

Ala Cys Phe Tyr Gln Ser Arg Gly Phe Pro Leu Val Arg Tyr Ala Tyr
 930 935 940

Asn Leu Pro Arg Val Lys Asp
 945 950

<210> 11

<211> 914

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Met Gly Arg Pro Arg Leu Thr Leu Val Cys Gln Val Ser Ile Ile Ile
 1 5 10 15

Ser Ala Arg Asp Leu Ser Met Asn Asn Leu Thr Glu Leu Gln Pro Gly
 20 25 30

Leu Phe His His Leu Arg Phe Leu Glu Glu Leu Arg Leu Ser Gly Asn
 35 40 45

His Leu Ser His Ile Pro Gly Gln Ala Phe Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 50 55 60

Lys Ile Leu Met Leu Gln Asn Asn Gln Leu Gly Gly Ile Pro Ala Glu
 65 70 75 80

Ala Leu Trp Glu Leu Pro Ser Leu Gln Ser Leu Arg Leu Asp Ala Asn
 85 90 95

Leu Ile Ser Leu Val Pro Glu Arg Ser Phe Glu Gly Leu Ser Ser Leu
 100 105 110

Arg His Leu Trp Leu Asp Asp Asn Ala Leu Thr Glu Ile Pro Val Arg
 115 120 125

Ala Leu Asn Asn Leu Pro Ala Leu Gln Ala Met Thr Leu Ala Leu Asn
 130 135 140

Arg Ile Ser His Ile Pro Asp Tyr Ala Phe Gln Asn Leu Thr Ser Leu
 145 150 155 160

Val Val Leu His Leu His Asn Asn Arg Ile Gln His Leu Gly Thr His
 165 170 175

Ser Phe Glu Gly Leu His Asn Leu Glu Thr Leu Asp Leu Asn Tyr Asn
 180 185 190

Lys Leu Gln Glu Phe Pro Val Ala Ile Arg Thr Leu Gly Arg Leu Gln
 195 200 205

Glu Leu Gly Phe His Asn Asn Asn Ile Lys Ala Ile Pro Glu Lys Ala
 210 215 220

Phe Met Gly Asn Pro Leu Leu Gln Thr Ile His Phe Tyr Asp Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Gln Phe Val Gly Arg Ser Ala Phe Gln Tyr Leu Pro Lys Leu His
 245 250 255

Thr Leu Ser Leu Asn Gly Ala Met Asp Ile Gln Glu Phe Pro Asp Leu
 260 265 270

Lys Gly Thr Thr Ser Leu Glu Ile Leu Thr Leu Thr Arg Ala Gly Ile
 275 280 285

Arg Leu Leu Pro Ser Gly Met Cys Gln Gln Leu Pro Arg Leu Arg Val
 290 295 300

Leu Glu Leu Ser His Asn Gln Ile Glu Glu Leu Pro Ser Leu His Arg
 305 310 315 320

Cys Gln Lys Leu Glu Glu Ile Gly Leu Gln His Asn Arg Ile Trp Glu
 325 330 335

Ile Gly Ala Asp Thr Phe Ser Gln Leu Ser Ser Leu Gln Ala Leu Asp
 340 345 350

Leu Ser Trp Asn Ala Ile Arg Ser Ile His Pro Glu Ala Phe Ser Thr
 355 360 365

Leu His Ser Leu Val Lys Leu Asp Leu Thr Asp Asn Gln Leu Thr Thr
 370 375 380

Leu Pro Leu Ala Gly Leu Gly Gly Leu Met His Leu Lys Leu Lys Gly
 385 390 395 400

Asn Leu Ala Leu Ser Gln Ala Phe Ser Lys Asp Ser Phe Pro Lys Leu
 405 410 415

Arg Ile Leu Glu Val Pro Tyr Ala Tyr Gln Cys Cys Pro Tyr Gly Met
 420 425 430

Cys Ala Ser Phe Phe Lys Ala Ser Gly Gln Trp Glu Ala Glu Asp Leu
 435 440 445

His Leu Asp Asp Glu Glu Ser Ser Lys Arg Pro Leu Gly Leu Leu Ala
 450 455 460

Arg Gln Ala Glu Asn His Tyr Asp Gln Asp Leu Asp Glu Leu Gln Leu
 465 470 475 480

Glu Met Glu Asp Ser Lys Pro His Pro Ser Val Gln Cys Ser Pro Thr
 485 490 495

Pro Gly Pro Phe Lys Pro Cys Glu Tyr Leu Phe Glu Ser Trp Gly Ile
 500 505 510

Arg Leu Ala Val Trp Ala Ile Val Leu Leu Ser Val Leu Cys Asn Gly
 515 520 525

Leu Val Leu Leu Thr Val Phe Ala Gly Gly Pro Val Pro Leu Pro Pro
 530 535 540

Val Lys Phe Val Val Gly Ala Ile Ala Gly Ala Asn Thr Leu Thr Gly
 545 550 555 560

Ile Ser Cys Gly Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala Leu Thr Phe Gly Gln
 565 570 575

Phe Ser Glu Tyr Gly Ala Arg Trp Glu Thr Gly Leu Gly Cys Arg Ala
 580 585 590

Thr Gly Phe Leu Ala Val Leu Gly Ser Glu Ala Ser Val Leu Leu Leu
 595 600 605

Thr Leu Ala Ala Val Gln Cys Ser Val Ser Val Ser Cys Val Arg Ala
 610 615 620

Tyr Gly Lys Ser Pro Ser Leu Gly Ser Val Arg Ala Gly Val Leu Gly
 625 630 635 640

Cys Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ala Ala Ala Leu Pro Leu Ala Ser Val
 645 650 655

Gly Glu Tyr Gly Ala Ser Pro Leu Cys Leu Pro Tyr Ala Pro Pro Glu
 660 665 670

Gly Gln Pro Ala Ala Leu Gly Phe Thr Val Ala Leu Val Met Met Asn
 675 680 685

Ser Phe Cys Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Ile Lys Leu Tyr Cys
 690 695 700

Asp Leu Pro Arg Gly Asp Phe Glu Ala Val Trp Asp Cys Ala Met Val
 705 710 715 720

Arg His Val Ala Trp Leu Ile Phe Ala Asp Gly Leu Leu Tyr Cys Pro
 725 730 735

Val Ala Phe Leu Ser Phe Ala Ser Met Leu Gly Leu Phe Pro Val Thr
 740 745 750

Pro Glu Ala Val Lys Ser Val Leu Leu Val Val Leu Pro Leu Pro Ala
 755 760 765

Cys Leu Asn Pro Leu Leu Tyr Leu Leu Phe Asn Pro His Phe Arg Asp
 770 775 780

Asp Leu Arg Arg Leu Arg Pro Arg Ala Gly Asp Ser Gly Pro Leu Ala
 785 790 795 800

Tyr Ala Ala Ala Gly Glu Leu Glu Lys Ser Ser Cys Asp Ser Thr Gln
 805 810 815

Ala Leu Val Ala Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Leu Glu Ala Ser Glu
 820 825 830

Ala Gly Arg Pro Pro Gly Leu Glu Thr Tyr Gly Phe Pro Ser Val Thr
 835 840 845

Leu Ile Ser Cys Gln Gln Pro Gly Ala Pro Arg Leu Glu Gly Ser His
 850 855 860

Cys Val Glu Pro Glu Gly Asn His Phe Gly Asn Pro Gln Pro Ser Met
 865 870 875 880

Asp Gly Glu Leu Leu Leu Arg Ala Glu Gly Ser Thr Pro Ala Gly Gly

885

890

895

Gly Leu Ser Gly Gly Gly Phe Gln Pro Ser Gly Leu Ala Phe Ala
 900 905 910

Ser His

<210> 12
 <211> 2724

5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

| | |
|---|------|
| atggacacct cccggctcgg tgtgctcctg tccttgctg tgctgctgca gctggcgacc | 60 |
| gggggcagct ctcccaggc tcggtgttgc ctgaggggct gccccacaca ctgtcattgc | 120 |
| gagcccgacg gcaggatgtt gtcagggtg gactgctccg acctggggct ctggagctg | 180 |
| ccttccaacc tcagcgttcc cacctcctac ctagacctca gtatgaacaa catcagtcag | 240 |
| ctgctcccgat atcccctgcc cagtctccgc ttccctggagg agttacgtct tgccggaaac | 300 |
| gctctgacat acattcccaa gggagcattc actggccttt acagtcttaa agttcttatg | 360 |
| ctgcagaata atcagctaag acacgtaccc acagaagctc tgcagaattt gcgaagcctt | 420 |
| caatccctgc gtctggatgc taaccacatc agctatgtgc ccccaagctg tttcagtggc | 480 |
| ctgcattccc tgaggcacct gtggctggat gacaatgcgt taacagaaat ccccggtccag | 540 |
| gcttttagaa gtttatcggc attgcaagcc atgaccttgg ccctgaacaa aatacaccac | 600 |
| ataccagact atgcctttgg aaacctctcc agcttggtag ttctacatct ccataacaat | 660 |
| agaatccact ccctggaaaa gaaatgcttt gatgggctcc acagcctaga gacttttagat | 720 |
| ttaaattaca ataaccttga tgaattcccc actgcaatta ggacactctc caaccttaaa | 780 |
| gaactaggat ttcatagcaa caatatcagg tcgataacctg agaaagcatt tgtaggcaac | 840 |
| ccttctctta ttacaataca ttctatgac aatcccatcc aatttggtag gagatctgct | 900 |
| tttcaacatt tacctgaact aagaacactg actctgaatg gtgcctcaca aataactgaa | 960 |
| tttccctgatt taactggAAC tgcaaacctg gagagtctga cttaactgg agcacagatc | 1020 |
| tcatctttc ctcaaaccgt ctgcaatcag ttacctaatac tccaaagtgtct agatctgtct | 1080 |
| tacaacctat tagaagattt acccagtttt tcagtctgcc aaaagcttca gaaaattgac | 1140 |
| ctaagacata atgaaatcta cgaaattaaa gttgacactt tccagcagtt gcttagcctc | 1200 |
| cgatcgctga atttggcttgc gaacaaaatt gctattattc accccaatgc atttccact | 1260 |
| ttgccatccc taataaaagct ggacctatcg tccaaacctcc tgcgtcttt tcctataact | 1320 |
| gggttacatg gtttaactca cttaaaatta acaggaaatc atgccttaca gagcttgata | 1380 |

tcatctgaaa actttccaga actcaagggtt atagaaatgc cttatgctta ccagtgtgt 1440
 gcatttggag tgtgtgagaa tgcctataag atttctaatac aatgaaataa aggtgacaac 1500
 agcagtatgg acgacacctca taagaaagat gctggaatgt ttcaggctca agatgaacgt 1560
 gaccttgaag atttcctgtc tgacttttag gaagacctga aagcccttca ttcagtgca 1620
 tttcacctt ccccaggccc cttcaaacc cttcaacacc tgcattgtgg ctggctgatc 1680
 agaattggag tgtggaccat agcagttctg gcacttactt gtaatgctt ggtgacttca 1740
 acagtttca gatcccctct gtacatttcc cccattaaac tgttaattgg gtcatcgca 1800
 gcagtgaaca tgctcacggg agtctccagt gccgtgctgg ctgggtggta tgcgttca 1860
 tttggcagct ttgcacgaca tggtgctgg tgggagaatg gggttgggtt ccatgtcatt 1920
 gttttttgt ccattttgc ttcagaatca tctgtttcc tgcttactt ggcagccctg 1980
 gagcgtgggt tctctgtgaa atattctgca aaatttggaa cggaaagctcc attttctagc 2040
 ctgaaagtaa tcattttgtc ctgtgccctg ctggccttga ccatggccgc agttccctg 2100
 ctgggtggca gcaagtatgg cgaactccctt ctctgacttca ctttgcattt tggggagccc 2160
 agcaccatgg gctacatggt cgctctcatc ttgctcaatt cccttgctt cctcatgatg 2220
 accattgcctt acaccaagctt ctactgcaat ttggacaagg gagacctggaa gaatatttgg 2280
 gactgctcta tggtaaaaca cattgccctg ttgctttca ccaactgcat cctaaactgc 2340
 cctgtggctt tcttgcctt ctccctttta ataaacctta catttatacg tcctgaagta 2400
 attaagttta tccttctggg ggtagtccca cttccctgcat gtctcaatcc ctttctctac 2460
 atcttgccttca atcctcaactt taaggaggat ctggtgagcc tgagaaagca aacctacgtc 2520
 tggacaagat caaaacaccc aagcttgcatt tcaatttactt ctgatgtgtt cgaaaaacag 2580
 tcctgtgactt caactcaaggc cttggtaacc ttaccagctt ccagcatcac ttatgacctg 2640
 cctcccttgcctt ccgtgccatc accagcttccat ccagtgcattt agagctgcca tctttccctt 2700
 gtggcatttg tcccatgtct cttaa 2724

<210> 13
 <211> 907
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Asp | Thr | Ser | Arg | Leu | Gly | Val | Leu | Leu | Ser | Leu | Pro | Val | Leu | Leu |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | |

10

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Leu | Ala | Thr | Gly | Gly | Ser | Ser | Pro | Arg | Ser | Gly | Val | Leu | Leu | Arg |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | 20 | 25 | 30 | |

Gly Cys Pro Thr His Cys His Cys Glu Pro Asp Gly Arg Met Leu Leu
 35 40 45

Arg Val Asp Cys Ser Asp Leu Gly Leu Ser Glu Leu Pro Ser Asn Leu
 50 55 60

Ser Val Phe Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Ser Met Asn Asn Ile Ser Gln
 65 70 75 80

Leu Leu Pro Asn Pro Leu Pro Ser Leu Arg Phe Leu Glu Glu Leu Arg
 85 90 95

Leu Ala Gly Asn Ala Leu Thr Tyr Ile Pro Lys Gly Ala Phe Thr Gly
 100 105 110

Leu Tyr Ser Leu Lys Val Leu Met Leu Gln Asn Asn Gln Leu Arg His
 115 120 125

Val Pro Thr Glu Ala Leu Gln Asn Leu Arg Ser Leu Gln Ser Leu Arg
 130 135 140

Leu Asp Ala Asn His Ile Ser Tyr Val Pro Pro Ser Cys Phe Ser Gly
 145 150 155 160

Leu His Ser Leu Arg His Leu Trp Leu Asp Asp Asn Ala Leu Thr Glu
 165 170 175

Ile Pro Val Gln Ala Phe Arg Ser Leu Ser Ala Leu Gln Ala Met Thr
 180 185 190

Leu Ala Leu Asn Lys Ile His His Ile Pro Asp Tyr Ala Phe Gly Asn
 195 200 205

Leu Ser Ser Leu Val Val Leu His Leu His Asn Asn Arg Ile His Ser
 210 215 220

Leu Gly Lys Lys Cys Phe Asp Gly Leu His Ser Leu Glu Thr Leu Asp
 225 230 235 240

Leu Asn Tyr Asn Asn Leu Asp Glu Phe Pro Thr Ala Ile Arg Thr Leu
 245 250 255

Ser Asn Leu Lys Glu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Ile Arg Ser Ile
 260 265 270

Pro Glu Lys Ala Phe Val Gly Asn Pro Ser Leu Ile Thr Ile His Phe
 275 280 285

Tyr Asp Asn Pro Ile Gln Phe Val Gly Arg Ser Ala Phe Gln His Leu
 290 295 300

Pro Glu Leu Arg Thr Leu Thr Leu Asn Gly Ala Ser Gln Ile Thr Glu
 305 310 315 320

Phe Pro Asp Leu Thr Gly Thr Ala Asn Leu Glu Ser Leu Thr Leu Thr
 325 330 335

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

Asn Leu Gln Val Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Leu Leu Glu Asp Leu Pro
 355 360 365

Ser Phe Ser Val Cys Gln Lys Leu Gln Lys Ile Asp Leu Arg His Asn
 370 375 380

Glu Ile Tyr Glu Ile Lys Val Asp Thr Phe Gln Gln Leu Leu Ser Leu
 385 390 395 400

Arg Ser Leu Asn Leu Ala Trp Asn Lys Ile Ala Ile Ile His Pro Asn
 405 410 415

Ala Phe Ser Thr Leu Pro Ser Leu Ile Lys Leu Asp Leu Ser Ser Asn
 420 425 430

Leu Leu Ser Ser Phe Pro Ile Thr Gly Leu His Gly Leu Thr His Leu
 435 440 445

Lys Leu Thr Gly Asn His Ala Leu Gln Ser Leu Ile Ser Ser Glu Asn
 450 455 460

Phe Pro Glu Leu Lys Val Ile Glu Met Pro Tyr Ala Tyr Gln Cys Cys
 465 470 475 480

Ala Phe Gly Val Cys Glu Asn Ala Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Trp Asn
 485 490 495

Lys Gly Asp Asn Ser Ser Met Asp Asp Leu His Lys Lys Asp Ala Gly
 500 505 510

Met Phe Gln Ala Gln Asp Glu Arg Asp Leu Glu Asp Phe Leu Leu Asp
 515 520 525

Phe Glu Glu Asp Leu Lys Ala Leu His Ser Val Gln Cys Ser Pro Ser
 530 535 540

ES 2 694 018 T3

Pro Gly Pro Phe Lys Pro Cys Glu His Leu Leu Asp Gly Trp Leu Ile
545 550 555 560

Arg Ile Gly Val Trp Thr Ile Ala Val Leu Ala Leu Thr Cys Asn Ala
565 570 575

Leu Val Thr Ser Thr Val Phe Arg Ser Pro Leu Tyr Ile Ser Pro Ile
580 585 590

Lys Leu Leu Ile Gly Val Ile Ala Ala Val Asn Met Leu Thr Gly Val
595 600 605

Ser Ser Ala Val Leu Ala Gly Val Asp Ala Phe Thr Phe Gly Ser Phe
610 615 620

Ala Arg His Gly Ala Trp Trp Glu Asn Gly Val Gly Cys His Val Ile
625 630 635 640

Gly Phe Leu Ser Ile Phe Ala Ser Glu Ser Ser Val Phe Leu Leu Thr
645 650 655

Leu Ala Ala Leu Glu Arg Gly Phe Ser Val Lys Tyr Ser Ala Lys Phe
660 665 670

Glu Thr Lys Ala Pro Phe Ser Ser Leu Lys Val Ile Ile Leu Leu Cys
675 680 685

Ala Leu Leu Ala Leu Thr Met Ala Ala Val Pro Leu Leu Gly Gly Ser
690 695 700

Lys Tyr Gly Ala Ser Pro Leu Cys Leu Pro Leu Pro Phe Gly Glu Pro
705 710 715 720

Ser Thr Met Gly Tyr Met Val Ala Leu Ile Leu Leu Asn Ser Leu Cys
725 730 735

Phe Leu Met Met Thr Ile Ala Tyr Thr Lys Leu Tyr Cys Asn Leu Asp
740 745 750

Lys Gly Asp Leu Glu Asn Ile Trp Asp Cys Ser Met Val Lys His Ile
755 760 765

Ala Leu Leu Leu Phe Thr Asn Cys Ile Leu Asn Cys Pro Val Ala Phe
770 775 780

Leu Ser Phe Ser Ser Leu Ile Asn Leu Thr Phe Ile Ser Pro Glu Val

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 785 | 790 | 795 | 800 |
| Ile Lys Phe Ile Leu Leu Val Val Val Pro Leu Pro Ala Cys Leu Asn | | | |
| 805 | | 810 | 815 |
| Pro Leu Leu Tyr Ile Leu Phe Asn Pro His Phe Lys Glu Asp Leu Val | | | |
| 820 | | 825 | 830 |
| Ser Leu Arg Lys Gln Thr Tyr Val Trp Thr Arg Ser Lys His Pro Ser | | | |
| 835 | | 840 | 845 |
| Leu Met Ser Ile Asn Ser Asp Asp Val Glu Lys Gln Ser Cys Asp Ser | | | |
| 850 | | 855 | 860 |
| Thr Gln Ala Leu Val Thr Phe Thr Ser Ser Ser Ile Thr Tyr Asp Leu | | | |
| 865 | | 870 | 875 |
| Pro Pro Ser Ser Val Pro Ser Pro Ala Tyr Pro Val Thr Glu Ser Cys | | | |
| 885 | | 890 | 895 |
| His Leu Ser Ser Val Ala Phe Val Pro Cys Leu | | | |
| 900 | | 905 | |

<210> 14
 <211> 2385
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

| | |
|---|-----|
| atggacacct cccggctcgg tgtgctcctg tccttgccctg tgctgctgca gctggcgacc | 60 |
| gggggcagct ctcccaggc tcggtgtgtg ctgaggggct gccccacaca ctgtcattgc | 120 |
| gagcccgacg gcaggatgtt gctcagggtg gactgctccg acctggggct ctcggagctg | 180 |
| ccttccaacc tcagcgtctt caccccttac ctagacctca gtatgaacaa catcagtcag | 240 |
| ctgctcccgat atccccctgcc cagtcctccgc ttccctggagg agttacgtct tgccggaaac | 300 |
| gctctgacat acattcccaa gggagcatc actggccctt acagtctaa agttctttagt | 360 |
| ctgcagaata atcagctaag acacgtaccc acagaagctc tgccagaattt gcgaagcctt | 420 |
| caatccctgc gtctggatgc taaccacatc agctatgtgc ccccaagctg tttcagtgcc | 480 |
| ctgcattccc tgaggcacct gtggctggat gacaatgcgt taacagaaat ccccgatccag | 540 |
| gcttttagaa gtttatcggc attgcaagcc atgaccttgg ccctgaacaa aatacaccac | 600 |
| ataccagact atgcctttgg aaacctctcc agcttggtag ttctacatct ccataacaat | 660 |
| agaatccact ccctggaaa gaaatgcttt gatgggcctcc acagcctaga gacttttagat | 720 |
| ttaaattaca ataaccttga tgaattcccc actgcaatta ggacactctc caaccttaaa | 780 |

gaacttaggat ttcatagcaa caatatcagg tcgatacctg agaaagcatt tgtaggcaac 840
ccttctctta ttacaataca tttctatgac aatcccatcc aatttgttgg gagatctgct 900
tttcaacatt tacctgaact aagaacactg actctgaatg gtgcctcaca aataactgaa 960
tttcctgatt taactggaac tgcaaacctg gagagtctga cttaactgg agcacagatc 1020
tcatctttc ctcaaaccgt ctgcaatcag ttacctaattc tccaaagtgc agatctgtct 1080
tacaacctat tagaagattt acccagttt tcagtctgcc aaaagctca gaaaattgac 1140
ctaagacata atgaaatcta cgaaattaaa gttgacactt tccagcagtt gcttagcctc 1200
cgatcgctga atttggcttg gaacaaaatt gctattatc accccaatgc attttccact 1260
ttgccatccc taataaagct ggacctatcg tccaaacctcc tgtcgcttt tcctataact 1320
gggttacatg gttaactca cttaaaatta acaggaaatc atgccttaca gagcttgata 1380
tcatctgaaa actttccaga actcaagggtt atagaaatgc ctatgctta ccagtgcgt 1440
gcattttggag tgtgtgagaa tgcctataag atttctaattc aatggaataa aggtgacaac 1500
agcagtatgg acgaccttca taagaaagat gctggaatgt ttcaggctca agatgaacgt 1560
gaccttgaag atttctgtt tgactttgag gaagacctga aagcccttca ttcagtgcag 1620
tggcacctt cccaggcccc cttcaaaccctt tgtgaacacc tgcttgatgg ctggctgatc 1680
agaattggag tggggcgccgc cgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 1740
ctccctgggg gaccgtcagt cttccctttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 1800
tcccgaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgagggtc 1860
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gcccggggag 1920
gagcagtaca acagcacgtt ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1980
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaagggtc tccaaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 2040
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 2100
tcccggtatg agctgaccaa gaaccagggtc agcctgaccc gcctggtcaa aggcttctat 2160
cccaagcgaca tcgcccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 2220
acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctt acagcaagct caccgtggac 2280
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 2340
aaccactaca cacagaagag cctctccctg tctccgggtt aatga 2385

<210> 15

<211> 794

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Met Asp Thr Ser Arg Leu Gly Val Leu Leu Ser Leu Pro Val Leu Leu
 1 5 10 15

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

Gly Cys Pro Thr His Cys His Cys Glu Pro Asp Gly Arg Met Leu Leu
 35 40 45

Arg Val Asp Cys Ser Asp Leu Gly Leu Ser Glu Leu Pro Ser Asn Leu
 50 55 60

Ser Val Phe Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Ser Met Asn Asn Ile Ser Gln
 65 70 75 80

Leu Leu Pro Asn Pro Leu Pro Ser Leu Arg Phe Leu Glu Glu Leu Arg
 85 90 95

Leu Ala Gly Asn Ala Leu Thr Tyr Ile Pro Lys Gly Ala Phe Thr Gly
 100 105 110

Leu Tyr Ser Leu Lys Val Leu Met Leu Gln Asn Asn Gln Leu Arg His
 115 120 125

Val Pro Thr Glu Ala Leu Gln Asn Leu Arg Ser Leu Gln Ser Leu Arg
 130 135 140

Leu Asp Ala Asn His Ile Ser Tyr Val Pro Pro Ser Cys Phe Ser Gly
 145 150 155 160

Leu His Ser Leu Arg His Leu Trp Leu Asp Asp Asn Ala Leu Thr Glu
 165 170 175

Ile Pro Val Gln Ala Phe Arg Ser Leu Ser Ala Leu Gln Ala Met Thr
 180 185 190

Leu Ala Leu Asn Lys Ile His His Ile Pro Asp Tyr Ala Phe Gly Asn
 195 200 205

Leu Ser Ser Leu Val Val Leu His Leu His Asn Asn Arg Ile His Ser
 210 215 220

Leu Gly Lys Lys Cys Phe Asp Gly Leu His Ser Leu Glu Thr Leu Asp
 225 230 235 240

Leu Asn Tyr Asn Asn Leu Asp Glu Phe Pro Thr Ala Ile Arg Thr Leu
 245 250 255

Ser Asn Leu Lys Glu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Ile Arg Ser Ile
 260 265 270

Pro Glu Lys Ala Phe Val Gly Asn Pro Ser Leu Ile Thr Ile His Phe
 275 280 285

Tyr Asp Asn Pro Ile Gln Phe Val Gly Arg Ser Ala Phe Gln His Leu
 290 295 300

Pro Glu Leu Arg Thr Leu Thr Leu Asn Gly Ala Ser Gln Ile Thr Glu
 305 310 315 320

Phe Pro Asp Leu Thr Gly Thr Ala Asn Leu Glu Ser Leu Thr Leu Thr
 325 330 335

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

Asn Leu Gln Val Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Leu Leu Glu Asp Leu Pro
 355 360 365

Ser Phe Ser Val Cys Gln Lys Leu Gln Lys Ile Asp Leu Arg His Asn
 370 375 380

Glu Ile Tyr Glu Ile Lys Val Asp Thr Phe Gln Gln Leu Leu Ser Leu
 385 390 395 400

Arg Ser Leu Asn Leu Ala Trp Asn Lys Ile Ala Ile Ile His Pro Asn
 405 410 415

Ala Phe Ser Thr Leu Pro Ser Leu Ile Lys Leu Asp Leu Ser Ser Asn
 420 425 430

Leu Leu Ser Ser Phe Pro Ile Thr Gly Leu His Gly Leu Thr His Leu
 435 440 445

Lys Leu Thr Gly Asn His Ala Leu Gln Ser Leu Ile Ser Ser Glu Asn
 450 455 460

Phe Pro Glu Leu Lys Val Ile Glu Met Pro Tyr Ala Tyr Gln Cys Cys
 465 470 475 480

Ala Phe Gly Val Cys Glu Asn Ala Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Trp Asn
 485 490 495

Lys Gly Asp Asn Ser Ser Met Asp Asp Leu His Lys Lys Asp Ala Gly
 500 505 510

Met Phe Gln Ala Gln Asp Glu Arg Asp Leu Glu Asp Phe Leu Leu Asp
 515 520 525

Phe Glu Glu Asp Leu Lys Ala Leu His Ser Val Gln Cys Ser Pro Ser
 530 535 540

Pro Gly Pro Phe Lys Pro Cys Glu His Leu Leu Asp Gly Trp Leu Ile
 545 550 555 560

Arg Ile Gly Val Gly Arg Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 565 570 575

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 580 585 590

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 595 600 605

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 610 615 620

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 625 630 635 640

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 645 650 655

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 660 665 670

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 675 680 685

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 690 695 700

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 705 710 715 720

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 725 730 735

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 740 745 750

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

755

760

765

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr |
| 770 | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys |
| 785 | | | | | | | | | |

5
<210> 16
<211> 1482
<212> ADN
<213> Artificial

10
<220>
<223> Secuencia de ADN de RSPO1-Fc sintética
<400> 16

| | | | | | | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-------|------------|------|
| atgcggcttg | ggctgtgtgt | ggtggccctg | gttctgagct | ggacgcaccc | caccatcagc | 60 | | | |
| agccggggga | tcaaggggaa | aaggcagagg | cggatcagt | ccgaggggag | ccaggcctgt | 120 | | | |
| gccaaaggct | gtgagctctg | ctctgaagtc | aacggctgcc | tcaagtgc | accgaagctg | 180 | | | |
| ttcatcctgc | tggagagggaa | cgacatccgc | caggtggcgc | tctgcttgcc | gtcctgccc | 240 | | | |
| cctggatact | tcgacgcccc | caaccccgac | atgaacaagt | gcatcaaatg | caagatcgag | 300 | | | |
| cactgtgagg | cctgcttcag | ccataacttc | tgcaccaagt | gtaaggaggg | cttgcaccc | 360 | | | |
| cacaagggcc | gctgctatcc | agcttgc | gagggctcct | cagctgccaa | tggcaccatg | 420 | | | |
| gagtgcagta | gtcctgcgca | atgtgaaatg | agcgagtgg | ctccgtgggg | gcacctgc | 480 | | | |
| aagaagcagc | agctctgtgg | tttccggagg | ggctccgagg | agcggacacg | cagggtgcta | 540 | | | |
| catgcccctg | tggggacca | tgctgcctgc | tctgacacca | aggagaccc | gaggtgcaca | 600 | | | |
| gtgaggagag | tgccgtgtcc | tgagggcag | aagaggagga | aggaggc | ggccggccgg | 660 | | | |
| gagaatgcc | acaggaacct | ggccaggaag | gagagcaagg | aggcgggtgc | tggctctcga | 720 | | | |
| agacgcagg | ggcagcaaca | gcagcagcag | caagggacag | tggggccact | cacatctcga | 780 | | | |
| ggccatgc | ggcgcccg | caaaactcac | acatgcccac | cgtgccc | acactgaactc | 840 | | | |
| ctggggggac | cgtcagtctt | cctttcccc | ccaaaaccca | aggacaccc | catgatctcc | 900 | | | |
| cgacccctg | aggtcacatg | cgtggtggt | gacgtgagcc | acgaagaccc | tgaggtcaag | 960 | | | |
| ttcaactgg | acgtggacgg | cgtggaggt | cataatgcc | agacaaagcc | gcgggaggag | 1020 | | | |
| cagtacaaca | gcacgtaccg | tgtggtc | gtcctcaccc | tcctgcacca | ggactggctg | 1080 | | | |
| aatggcaagg | agtacaagt | caaggtctcc | aacaaagccc | tc | ccagcccc | catcgagaaa | 1140 | | |
| accatctcca | aagccaaagg | gcagcccc | gaaccacagg | tgtacacc | gc | ccccatcc | 1200 | | |
| cgggatgagc | tgaccaagaa | ccaggtc | agc | ctgaccc | tgg | tc | aaagg | cttctatccc | 1260 |

agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1320
 cctcccggtgc tggactccga cggctccttc ttccctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1380
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1440
 cactacacac agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga 1482

5 <210> 17

<211> 493

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Secuencia de la proteína RSPO1-Fc sintética

<400> 17

Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Ala Leu Val Leu Ser Trp Thr His
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile
 20 25 30

Ser Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser
 35 40 45

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

Glu Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro
 65 70 75 80

Pro Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys
 85 90 95

Cys Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr
 100 105 110

Lys Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala
 115 120 125

Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser
 130 135 140

Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser
 145 150 155 160

Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr
 165 170 175

Arg Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp
 180 185 190

Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro Glu
 195 200 205

Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn
 210 215 220

Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg
 225 230 235 240

Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Thr Val Gly Pro
 245 250 255

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 275 280 285

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 290 295 300

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 305 310 315 320

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 325 330 335

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 340 345 350

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 355 360 365

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 370 375 380

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 385 390 395 400

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 420 425 430

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460 465

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 18

<211> 1422

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de RSPO2-Fc estándar

10 <400> 18

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| atgcagtttc | gccttttctc | ctttgccttc | atcattctga | actgcattgga | ttacagccac | 60 |
| tgccaaaggca | accgatggag | acgcagtaag | cgagctagtt | atgtatcaaa | tcccatggc | 120 |
| aagggttgtt | tgtcttggtc | aaaggacaat | gggtgttagcc | gatgtcaaca | gaagttgttc | 180 |
| ttcttccttc | gaagagaagg | gatgcgccag | tatggagagt | gcctgcattc | ctgcccattcc | 240 |
| gggtactatg | gacaccgagc | cccagatatg | aacagatgtg | caagatgcag | aatagaaaaac | 300 |
| tgtgattctt | gtttagcaaa | agactttgt | accaagtgc | aaggtagctt | ttatggcat | 360 |
| agaggccgtt | gtttttagtga | atgtccagat | ggttttgcac | cattagaaga | aaccatggaa | 420 |
| tgtgttggaa | gatgtgaagt | tggtcattgg | agcgaatggg | gaactttag | cagaaataat | 480 |
| cgcacatgt | gatttaatg | gggtctggaa | accagaacac | ggcaaattgt | taaaaagcca | 540 |
| gtgaaagaca | caatactgt | tccaaaccatt | gctgaatcca | ggagatgcaa | gatgacaatg | 600 |
| aggcattgtc | caggaggaa | gagaacacca | aaggcgaagg | agaagaggaa | caagaaaaag | 660 |
| aaaaggaagc | tgatagaaag | ggcccaggag | caacacagcg | tcttcctagc | tacagacaga | 720 |
| gctaaccagg | ggcgcccgca | caaaactcac | acatgcccac | cgtgcccagc | acctgaactc | 780 |
| ctggggggac | cgtcagtctt | cctttcccc | ccaaaaccca | aggacaccct | catgatctcc | 840 |
| cgacccctg | aggcacatg | cgtgggtgg | gacgtgagcc | acgaagaccc | tgaggtcaag | 900 |
| ttcaacttgt | acgtggacgg | cgtggaggt | cataatgcca | agacaaagcc | gcgggaggag | 960 |
| cagtacaaca | gcacgtaccc | tgtggtcagc | gtcctcaccc | tcctgcacca | ggactggctg | 1020 |
| aatggcaagg | agtacaagt | caaggtctcc | aacaaagccc | tcccaagcccc | catcgagaaa | 1080 |

accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1140
 cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg ctttatccc 1200
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1260
 cctccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1320
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1380
 cactacacac agaagagcct ctccctgtct ccggtaaat ga 1422

<210> 19

<211> 473

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de la proteína RSPO2-Fc sintética

10 <400> 19

Met Gln Phe Arg Leu Phe Ser Phe Ala Leu Ile Ile Leu Asn Cys Met
 1 5 10 15

Asp Tyr Ser His Cys Gln Gly Asn Arg Trp Arg Arg Ser Lys Arg Ala
 20 25 30

Ser Tyr Val Ser Asn Pro Ile Cys Lys Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 35 40 45

Asp Asn Gly Cys Ser Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Phe Leu Arg
 50 55 60

Arg Glu Gly Met Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser
 65 70 75 80

Gly Tyr Tyr Gly His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys
 85 90 95

Arg Ile Glu Asn Cys Asp Ser Cys Phe Ser Lys Asp Phe Cys Thr Lys
 100 105 110

Cys Lys Val Gly Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys
 115 120 125

Pro Asp Gly Phe Ala Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu Gly
 130 135 140

Cys Glu Val Gly His Trp Ser Glu Trp Gly Thr Cys Ser Arg Asn Asn
 145 150 155 160

Arg Thr Cys Gly Phe Lys Trp Gly Leu Glu Thr Arg Thr Arg Gln Ile
 165 170 175

Val Lys Lys Pro Val Lys Asp Thr Ile Leu Cys Pro Thr Ile Ala Glu
 180 185 190

Ser Arg Arg Cys Lys Met Thr Met Arg His Cys Pro Gly Gly Lys Arg
 195 200 205

Thr Pro Lys Ala Lys Glu Lys Arg Asn Lys Lys Lys Arg Lys Leu
 210 215 220

Ile Glu Arg Ala Gln Glu Gln His Ser Val Phe Leu Ala Thr Asp Arg
 225 230 235 240

Ala Asn Gln Gly Arg Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 245 250 255

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 305 310 315 320

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 340 345 350

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 420 425 430

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 20

<211> 1509

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de RSPO3-Fc sintética

10 <400> 20

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------|
| atgcacttgc | gactgatttc | ttggcttttt | atcatttga | actttatgga | atacatcgcc | 60 |
| agccaaaacg | cctccgggg | aaggcgccag | cgaagaatgc | atcctaacgt | tagtcaaggc | 120 |
| tgc当地 | gctgtgcaac | atgctcagat | tacaatggat | gtttgtcatg | taagcccaga | 180 |
| ctat | ctctggaaag | aattggcatg | aagcagattg | gagtatgtct | ctcttcatgt | 240 |
| ccaa | attatggAAC | tcgatatacca | gatataaata | agtgtacaaa | atgcaaagct | 300 |
| gactgtgata | cctgtttcaa | caaaaatttc | tgcacaaaat | gtaaaagtgg | attttactta | 360 |
| cac | agtgccttga | caattgccc | gaagggttgg | aagccaaaca | ccatactatg | 420 |
| gagtgtgtca | gtattgtgca | ctgtgaggtc | agtgaatgg | atccttggag | tccatgcacg | 480 |
| aagaagg | aaacatgtgg | cttcaaaaga | gggactgaaa | cacgggtccg | agaaataata | 540 |
| cagcatc | cagcaaagg | taacctgtgt | cccccaacaa | atgagacaag | aaagtgtaca | 600 |
| gtgcaaa | agaagtgtca | gaagggagaa | cgaggaaaaaa | aaggaaggaa | gaggaaaaga | 660 |
| aaaaaa | ataaaggaga | aagtaaagaa | gcaatacctg | acagcaaaag | tctggaatcc | 720 |
| agcaaa | tcccagagca | acgagaaaac | aaacagcagc | agaagaagcg | aaaagtccaa | 780 |
| gataaa | aatcggtatc | agtca | gtacacgggc | gcccgcacaa | aactcacaca | 840 |
| tgcccac | gcccagcacc | tgaactcctg | gggggaccgt | cagtcttct | cttccccca | 900 |
| aaaccc | acaccctcat | gatctccgg | accctgagg | tcacatgcgt | ggtggtggac | 960 |
| gtgagg | ccacg | aagaccctga | ggtcaagtcc | aactggtacg | tggacggcgt | 1020 |
| aatgcca | aga | caaagcccg | ggaggagcag | tacaacagca | cgtaccgtgt | 1080 |

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcac ggtctccaac 1140
 aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaaggca gccccgagaa 1200
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1260
 acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1320
 cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc 1380
 ctctacagca agctcacctg ggacaagagc aggtggcagc agggaaacgt cttctcatgc 1440
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctccg 1500
 ggtaaatga 1509

<210> 21

<211> 502

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de la proteína RSPO3-Fc estándar

10 <400> 21

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | His | Leu | Arg | Ile | Ser | Trp | Leu | Phe | Ile | Ile | Leu | Asn | Phe | Met |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | 15 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Tyr | Ile | Gly | Ser | Gln | Asn | Ala | Ser | Arg | Gly | Arg | Arg | Gln | Arg | Arg |
| | | | | | | | | | | | | | 20 | 25 | 30 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | His | Pro | Asn | Val | Ser | Gln | Gly | Cys | Gln | Gly | Gly | Cys | Ala | Thr | Cys |
| | | | | | | | | | | | | | 35 | 40 | 45 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Asp | Tyr | Asn | Gly | Cys | Leu | Ser | Cys | Lys | Pro | Arg | Leu | Phe | Phe | Ala |
| | | | | | | | | | | | | | 50 | 55 | 60 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Leu | Glu | Arg | Ile | Gly | Met | Lys | Gln | Ile | Gly | Val | Cys | Leu | Ser | Ser | Cys | |
| | | | | | | | | | | | | | 65 | 70 | 75 | 80 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Ser | Gly | Tyr | Tyr | Gly | Thr | Arg | Tyr | Pro | Asp | Ile | Asn | Lys | Cys | Thr |
| | | | | | | | | | | | | | 85 | 90 | 95 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Cys | Lys | Ala | Asp | Cys | Asp | Thr | Cys | Phe | Asn | Lys | Asn | Phe | Cys | Thr |
| | | | | | | | | | | | | | 100 | 105 | 110 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Cys | Lys | Ser | Gly | Phe | Tyr | Leu | His | Leu | Gly | Lys | Cys | Leu | Asp | Asn |
| | | | | | | | | | | | | | 115 | 120 | 125 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Pro | Glu | Gly | Leu | Glu | Ala | Asn | Asn | His | Thr | Met | Glu | Cys | Val | Ser |
| | | | | | | | | | | | | | 130 | 135 | 140 |

Ile Val His Cys Glu Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr
 145 150 155 160

Lys Lys Gly Lys Thr Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val
 165 170 175

Arg Glu Ile Ile Gln His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro
 180 185 190

Thr Asn Glu Thr Arg Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys Gln Lys
 195 200 205

Gly Glu Arg Gly Lys Lys Gly Arg Glu Arg Lys Arg Lys Lys Pro Asn
 210 215 220

Lys Gly Glu Ser Lys Glu Ala Ile Pro Asp Ser Lys Ser Leu Glu Ser
 225 230 235 240

Ser Lys Glu Ile Pro Glu Gln Arg Glu Asn Lys Gln Gln Lys Lys
 245 250 255

Arg Lys Val Gln Asp Lys Gln Lys Ser Val Ser Val Ser Thr Val His
 260 265 270

Gly Arg Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 275 280 285

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 290 295 300

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 305 310 315 320

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 325 330 335

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 340 345 350

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 355 360 365

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 370 375 380

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 385 390 395 400

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 405 410 415

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 420 425 430

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 435 440 445

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 450 455 460

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 465 470 475 480

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 485 490 495

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 22
 <211> 1395
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de RSPO4-Fc sintética

<400> 22

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| atgcgggcgc | cactctgctt | gtctctgctc | gtcgccacag | cctgtggacat | gctcgccctg | 60 |
| aaccgaagga | agaagcaagt | gggcactggc | ctggggggca | actgcacagg | ctgtatcatc | 120 |
| tgctcagagg | agaacggctg | ttcccacctgc | cagcagaggc | tcttcctgtt | catccgcccgg | 180 |
| gaaggcattcc | gccagtacgg | caagtgcctg | cacgactgtc | cccctggta | cttcggcata | 240 |
| cgcggccagg | aggtaaacag | gtgaaaaaaaa | tgtggggcca | cttgtgagag | ctgcttcagc | 300 |
| caggacttct | gcatccggtg | caagaggcag | ttttacttgt | acaaggggaa | gtgtctgccc | 360 |
| acctgccccgc | cgggcacttt | ggcccaccag | aacacacggg | agtgccaggg | ggagtgtgaa | 420 |
| ctgggtccct | ggggcggctg | gagccctgc | acacacaatg | gaaagacctg | cggctcggct | 480 |
| tggggcctgg | agagccgggt | acgagaggct | ggccgggctg | ggcatgagga | ggcagccacc | 540 |
| tgccaggtgc | tttctgagtc | aaggaaatgt | cccateccaga | ggccctgccc | aggagagagg | 600 |
| agccccggcc | agaagaaggg | caggaaggac | cggcgcccac | gcaaggacag | gaagctggac | 660 |
| cgcaggctgg | acgtgaggcc | gcccagccc | ggcctgcagc | cggggcgcgc | cgacaaaact | 720 |

| | | | | | | |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| cacacatgcc | caccgtgcc | agcacctgaa | ctcctgggg | gaccgtcagt | cttcctttc | 780 |
| cccccaaaac | ccaaggacac | cctcatgatc | tcccgaccc | ctgaggtcac | atgcgtggtg | 840 |
| gtggacgtga | gccacgaaga | ccctgaggtc | aagttcaact | ggtacgtgga | cggcgtggag | 900 |
| gtgcataatg | ccaagacaaa | gccgcggag | gagcagtaca | acagcacgta | ccgtgtggtc | 960 |
| agcgtcctca | ccgtcctgca | ccaggactgg | ctgaatggca | aggagtacaa | gtgcaaggtc | 1020 |
| tccaacaaag | ccctccca | ccccatcgag | aaaaccatct | ccaaagccaa | agggcagccc | 1080 |
| cgagaaccac | aggtgtacac | cctgccccca | tcccggatg | agctgaccaa | gaaccaggtc | 1140 |
| agcctgacct | gcctggtcaa | aggcttctat | cccagcgaca | tcgccgtgga | gtggagagc | 1200 |
| aatgggcagc | cggagaacaa | ctacaagacc | acgcctcccg | tgctggactc | cgacggctcc | 1260 |
| ttcttcctct | acagcaagct | caccgtggac | aagagcaggt | ggcagcaggg | gaacgtttc | 1320 |
| tcatgtccg | tgatgcatga | ggctctgcac | aaccactaca | cacagaagag | ccttcctctg | 1380 |
| tctccgggtaaatga | | | | | | 1395 |

<210> 23

<211> 464

5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de RSPO4-Fc sintética

10 <400> 23

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Arg | Ala | Pro | Leu | Cys | Leu | Leu | Leu | Leu | Val | Ala | His | Ala | Val | Asp |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | 15 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Leu | Ala | Leu | Asn | Arg | Arg | Lys | Lys | Gln | Val | Gly | Thr | Gly | Leu | Gly |
| | | | | | | | | | | | | | | 30 | |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Asn | Cys | Thr | Gly | Cys | Ile | Ile | Cys | Ser | Glu | Glu | Asn | Gly | Cys | Ser |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | | | | | | | | | | | | 45 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Cys | Gln | Gln | Arg | Leu | Phe | Leu | Phe | Ile | Arg | Arg | Glu | Gly | Ile | Arg |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 50 | | | | | | | | | | | | 60 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Tyr | Gly | Lys | Cys | Leu | His | Asp | Cys | Pro | Pro | Gly | Tyr | Phe | Gly | Ile |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 65 | | | | | | | | | | | 75 | | | 80 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Gly | Gln | Glu | Val | Asn | Arg | Cys | Lys | Lys | Cys | Gly | Ala | Thr | Cys | Glu |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 85 | | | | | | | | | | | | 95 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Cys | Phe | Ser | Gln | Asp | Phe | Cys | Ile | Arg | Cys | Lys | Arg | Gln | Phe | Tyr |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 100 | | | | | | | | | | | 105 | | 110 | | |

ES 2 694 018 T3

Leu Tyr Lys Gly Lys Cys Leu Pro Thr Cys Pro Pro Gly Thr Leu Ala
115 120 125

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

Gly Gly Trp Ser Pro Cys Thr His Asn Gly Lys Thr Cys Gly Ser Ala
145 150 155 160

Trp Gly Leu Glu Ser Arg Val Arg Glu Ala Gly Arg Ala Gly His Glu
165 170 175

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

Gln Arg Pro Cys Pro Gly Glu Arg Ser Pro Gly Gln Lys Lys Gly Arg
195 200 205

Lys Asp Arg Arg Pro Arg Lys Asp Arg Lys Leu Asp Arg Arg Leu Asp
210 215 220

Val Arg Pro Arg Gln Pro Gly Leu Gln Pro Gly Arg Ala Asp Lys Thr
225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de inmunoglobulina aislada que se une específicamente a un dominio extracelular de una proteína humana de receptor acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina (LGR), o a una proteína R-espondina (RSPO) humana y que es capaz de inhibir el crecimiento de un tumor sólido alterando la unión de una proteína RSPO humana a una proteína LGR humana;
- 5 en donde la unión específica de la molécula de inmunoglobulina es a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de una región variable de la molécula de inmunoglobulina; y
- en donde la molécula de inmunoglobulina es monoclonal; y
- 10 en donde la proteína LGR es LGR4, LGR5 o LGR6.
2. Una molécula de inmunoglobulina aislada que se une específicamente a un dominio extracelular de al menos una proteína humana de receptor acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina (LGR), o a al menos una proteína R-espondina (RSPO) humana;
- 15 en donde la molécula de inmunoglobulina es capaz de inhibir la señalización de la beta-catenina en una célula tumoral; y
- en donde la molécula de inmunoglobulina altera la unión de una proteína RSPO humana a una proteína LGR humana y/o altera la activación de la señalización de LGR por RSPO y;
- 20 en donde la unión específica de la molécula de inmunoglobulina es a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de una región variable de la molécula de inmunoglobulina; y
- en donde la molécula de inmunoglobulina es monoclonal; y
- en donde la proteína LGR es LGR4, LGR5 o LGR6.
- 25 3. Una molécula de inmunoglobulina aislada según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la proteína LGR es LGR5.
4. Una molécula de inmunoglobulina aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el dominio extracelular comprende los aminoácidos 22-564 de la LGR5 humana (SEQ ID NO: 1).
- 30 5. Una molécula de inmunoglobulina aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proteína RSPO humana es RSPO1, RSPO2, RSPO3 o RSPO4.
6. Una molécula de inmunoglobulina aislada según la reivindicación 5, en donde la proteína RSPO humana es RSPO3.
- 35 7. Una molécula de inmunoglobulina aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la molécula de inmunoglobulina es: (a) quimérica; (b) humanizada; o (c) humana.
8. Una molécula de inmunoglobulina aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la molécula de inmunoglobulina es: (a) una molécula de inmunoglobulina biespecífica; o (b) un fragmento de molécula de inmunoglobulina.
- 40 9. Una línea celular que produce la molécula de inmunoglobulina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 45 10. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de inmunoglobulina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente una segunda molécula de inmunoglobulina contra el cáncer.
- 50 11. Una molécula de inmunoglobulina aislada para su uso en terapia;
- en donde la molécula de inmunoglobulina aislada se une específicamente a un dominio extracelular de una proteína humana de receptor acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina (LGR), o a una proteína R-espondina (RSPO) humana;
- 55 y en donde la unión específica de la molécula de inmunoglobulina es a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de una región variable de la molécula de inmunoglobulina; y en donde la proteína LGR es LGR4, LGR5 o LGR6.
- 60 12. Una molécula de inmunoglobulina aislada para uso en terapia;
- en donde la molécula de inmunoglobulina aislada se une específicamente a un dominio extracelular de al menos una proteína humana de receptor acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina (LGR), o a al menos una proteína R-espondina (RSPO) humana; y en donde la molécula de inmunoglobulina es capaz de inhibir la señalización de beta-catenina en una célula tumoral; y en donde la molécula de inmunoglobulina altera la unión de una proteína RSPO humana a una proteína LGR humana y/o altera la activación de la señalización de LGR por RSPO; y en donde la unión específica de la molécula de inmunoglobulina es a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de una región variable de la molécula de inmunoglobulina;
- 65 y en donde la proteína LGR es LGR4, LGR5 o LGR6.

13. La molécula de inmunoglobulina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 10, para su uso en terapia.

14. Una molécula de inmunoglobulina aislada para su uso en el tratamiento del cáncer;

5 en donde la molécula de inmunoglobulina aislada se une específicamente a un dominio extracelular de una proteína humana de receptor acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina (LGR), o a una proteína R-espondina (RSPO) humana y es capaz de inhibir el crecimiento de un tumor sólido alterando la unión de una proteína RSPO humana a una proteína LGR humana;
10 y en donde la unión específica de la molécula de inmunoglobulina es a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de una región variable de la molécula de inmunoglobulina; y en donde la proteína LGR es LGR4, LGR5 o LGR6.

15. Una molécula de inmunoglobulina aislada para su uso en el tratamiento del cáncer;

15 en donde la molécula de inmunoglobulina aislada se une específicamente a un dominio extracelular de al menos una proteína humana de receptor acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina (LGR) o al menos a una proteína R-espondina (RSPO) humana; y en donde la molécula de inmunoglobulina es capaz de inhibir la señalización de beta-catenina en una célula tumoral; y en donde la molécula de inmunoglobulina altera la unión de una proteína RSPO humana a una proteína LGR humana y/o altera la activación de la señalización de LGR por RSPO; y en donde la unión específica de la molécula de inmunoglobulina es a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de una región variable de la molécula de inmunoglobulina;
20 y en donde la proteína LGR es LGR4, LGR5 o LGR6.

16. La molécula de inmunoglobulina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento del cáncer.

25 17. La molécula de inmunoglobulina o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde el cáncer o el tumor son un cáncer o un tumor de colon, de mama, de pulmón o de páncreas.

30 18. La molécula de inmunoglobulina o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en donde el cáncer o el tumor sobreexpresan LGR5.

35 19. La molécula de inmunoglobulina o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en donde el tratamiento comprende además administrar una cantidad eficaz de un segundo agente contra el cáncer.

40 20. La molécula de inmunoglobulina o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 19, en donde el segundo agente contra el cáncer es un agente quimioterapéutico seleccionado de daunorrubicina, dactinomicina, doxorrubicina, bleomicina, mitomicina, mostaza nitrogenada, clorambucilo, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina (CA), 5-fluorouracilo (5-FU), floxuridina (5-FUDR), metotrexato (MTX), colchicina, vincristina, vinblastina, etopósido, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES), irinotecán o paclitaxel.

45 21. Un método *in vitro* para inhibir la señalización de la beta-catenina en una célula tumoral, que comprende poner en contacto dicha célula tumoral con una cantidad eficaz de una molécula de inmunoglobulina aislada como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

Figura 1

Datos de micromatriz de LGR5

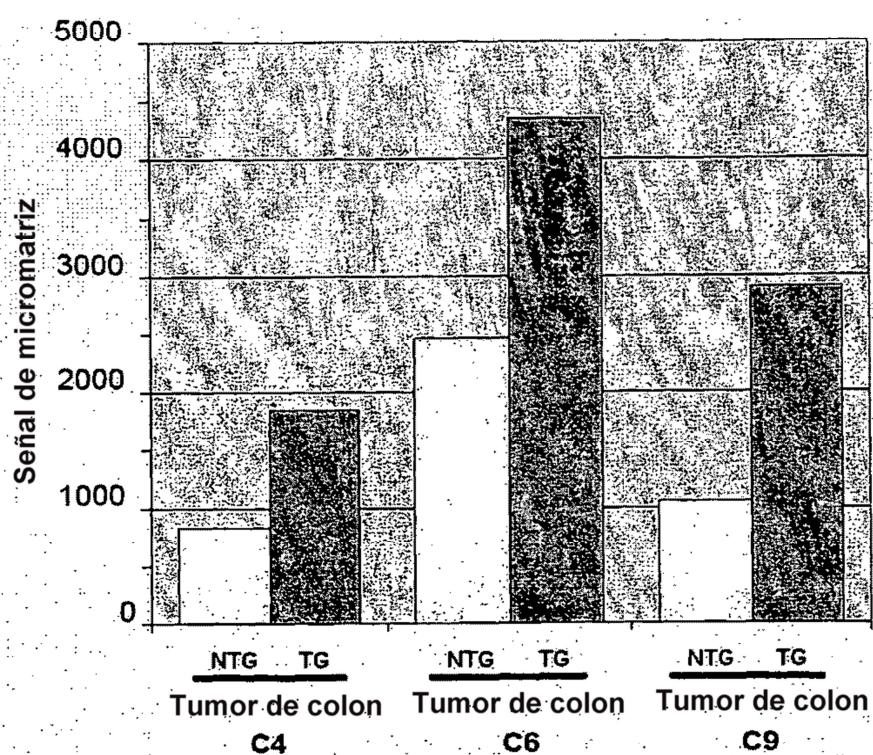


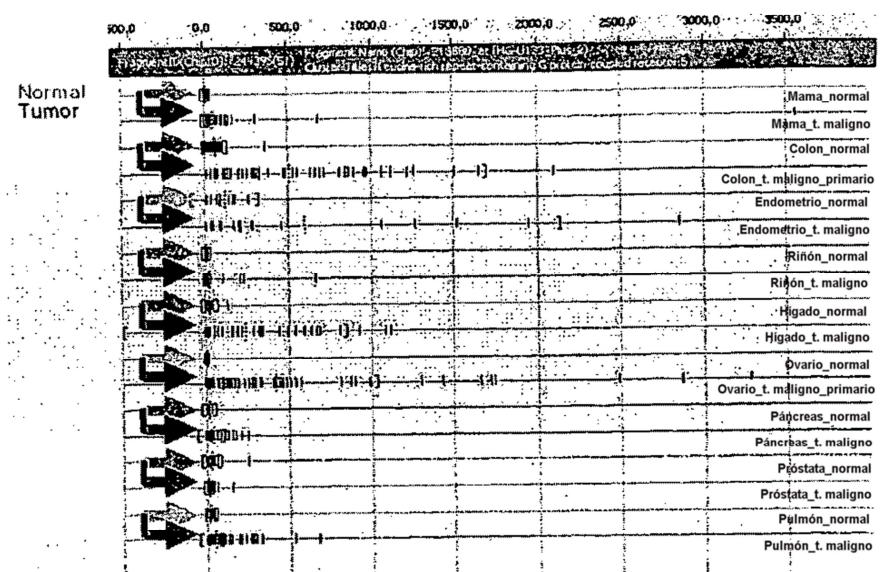
Figura 2

Figura 3

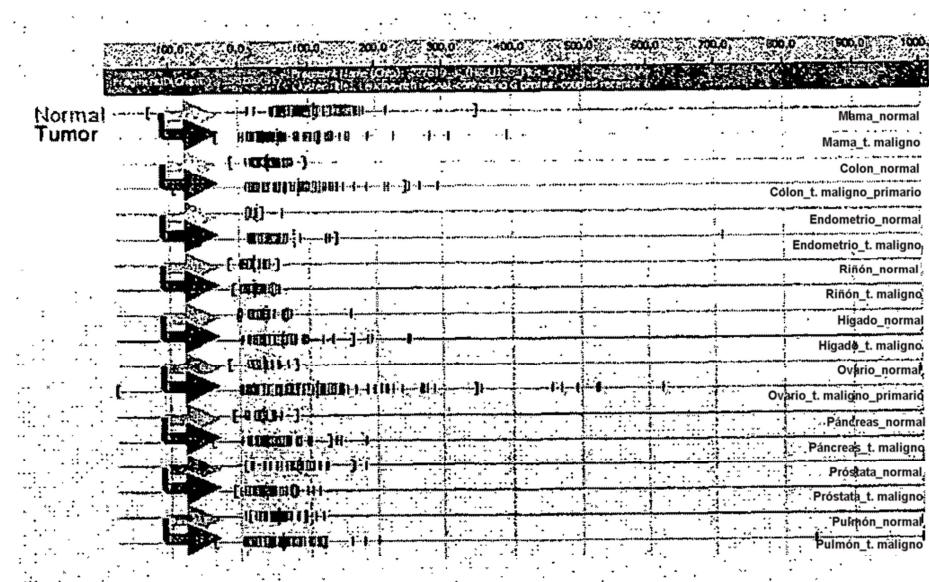


Figura 4

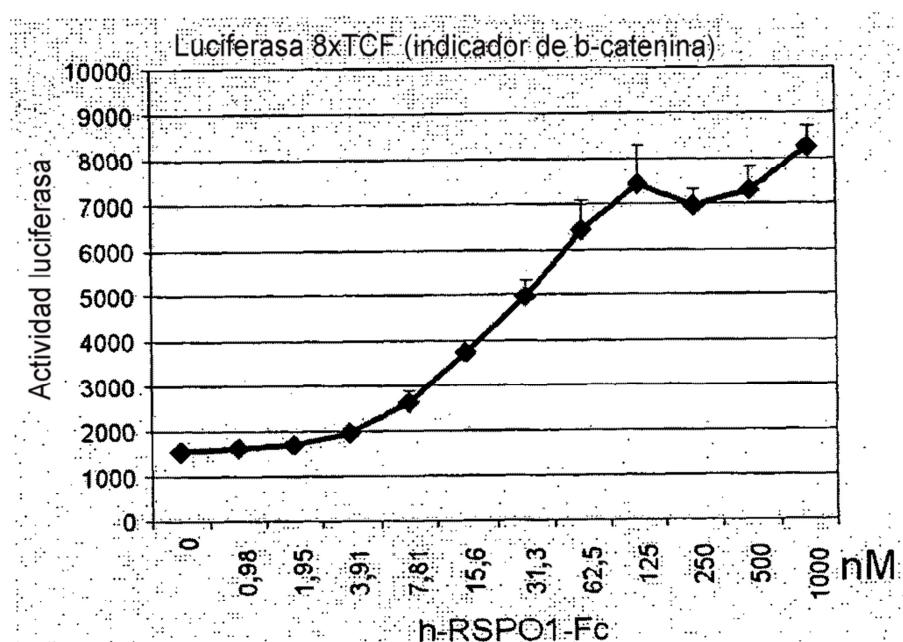


Figura 5

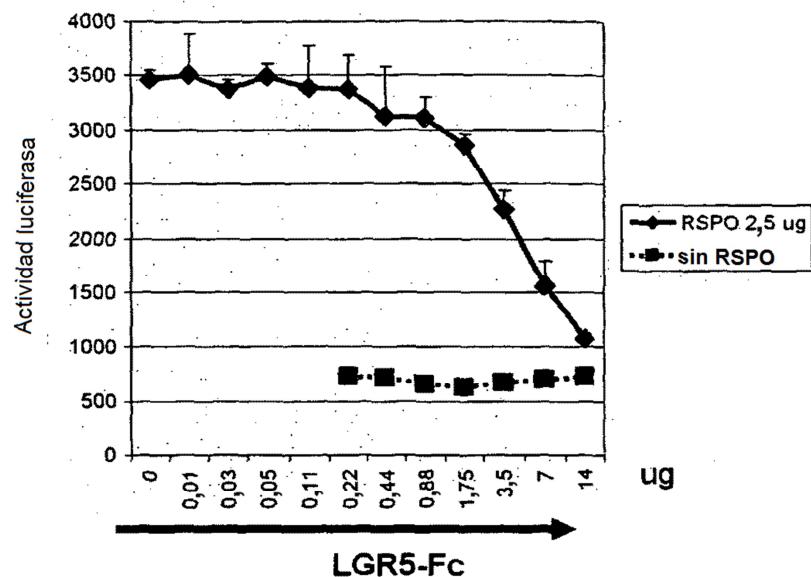


Figura 6A

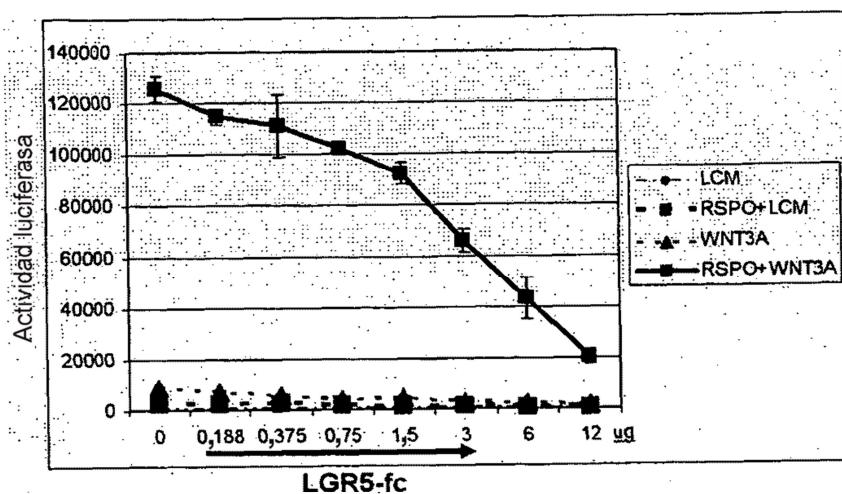


Figura 6B

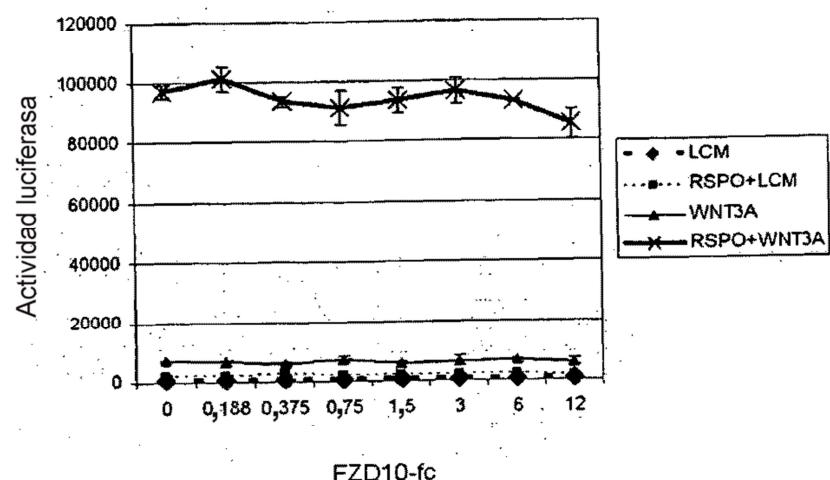


Figura 7A

Transfección transitoria con RSPO1-CD4TM+ GFP

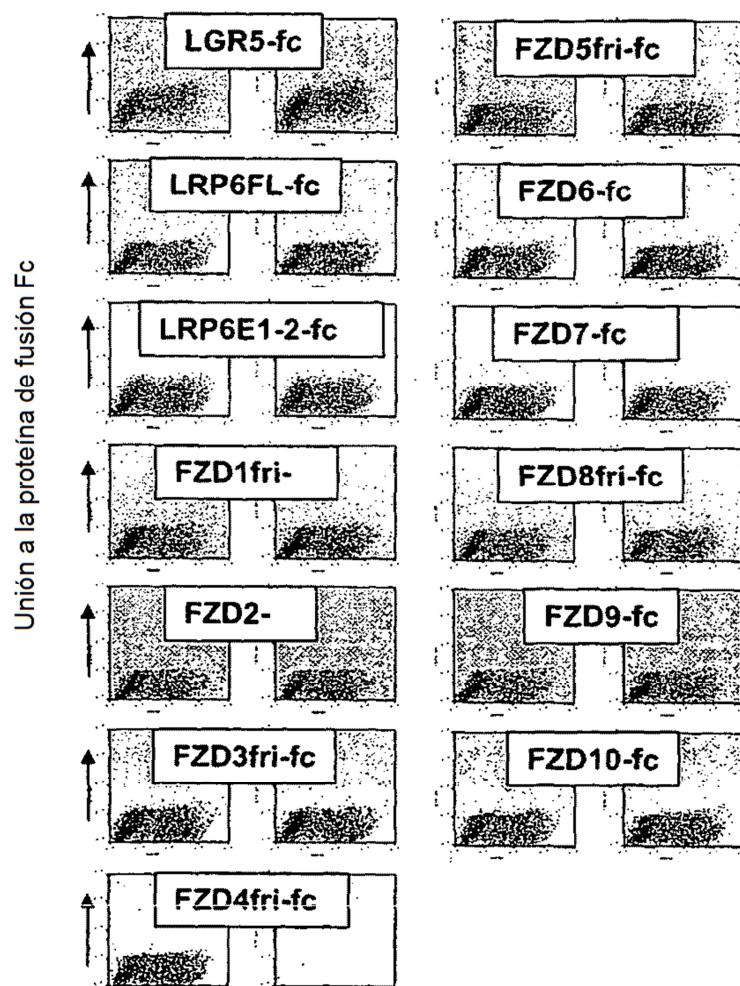


Figura 7B

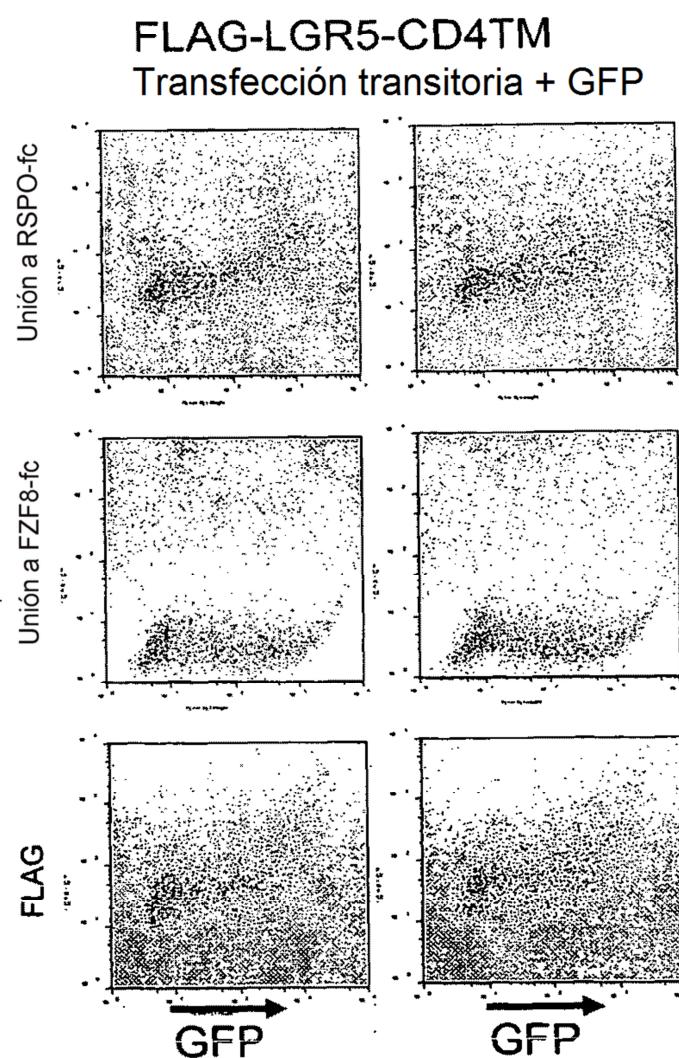


Figura 7C

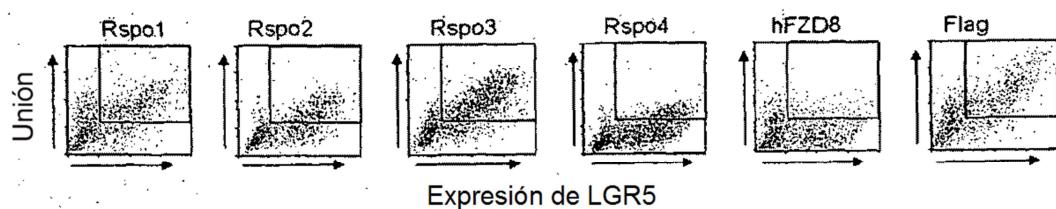


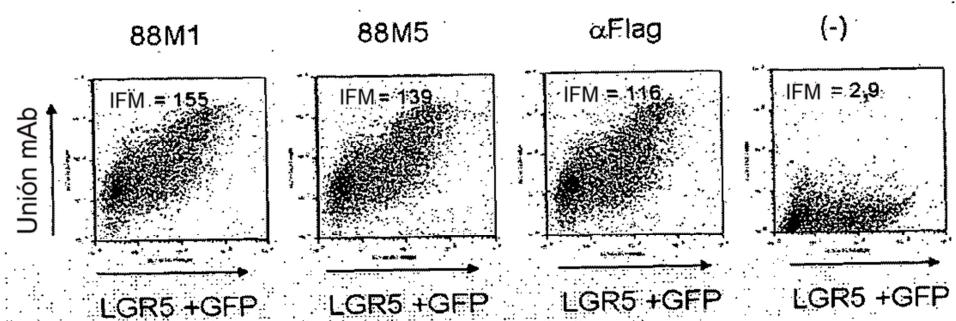
Figura 8

Figura 9