

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2006.10.31</b>	(73) Titular(es): <b>ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.</b> <b>800 CHESAPEAKE DRIVE REDWOOD CITY, CA</b> <b>94063-4748</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2005.10.31 US 731468 P</b> <b>2006.06.13 US 812966 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2012.09.19</b>	(72) Inventor(es): <b>JOHN LEWICKI</b> <b>US</b> <b>SANJEEV SATYAL</b> <b>US</b> <b>TIMOTHY HOEY</b> <b>US</b> <b>AUSTIN GURNEY</b> <b>US</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2015.08.05</b> <b>202/2015</b>	(74) Mandatário: <b>JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA</b> <b>RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO CANCRO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA CARACTERIZAR, DIAGNOSTICAR E TRATAR O CANCRO. EM PARTICULAR A INVENÇÃO PROPORCIONA OS MEIOS E MÉTODOS PARA O DIAGNÓSTICO, CARACTERIZAÇÃO, PROGNÓSTICO E TRATAMENTO DO CANCRO E ESPECIFICAMENTE VISANDO CÉLULAS ESTAMINAIS CANCEROSAS. A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA UM RECETOR FZD SOLÚVEL COMPREENDENDO UM DOMÍNIO EXTRACELULAR DE UM RECETOR FZD HUMANO QUE INIBE O CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS. A PRESENTE INVENÇÃO AINDA PROPORCIONA ADICIONALMENTE UM RECETOR SOLÚVEL COMPREENDENDO UM DOMÍNIO FRI DE UM RECETOR FZD HUMANO QUE SE LIGA A UM LIGANDO DE UM RECETOR FZD HUMANO E O DITO RECETOR SOLÚVEL É CAPAZ DE INIBIR O CRESCIMENTO TUMORAL. A PRESENTE INVENÇÃO AINDA PROPORCIONA ADICIONALMENTE UM MÉTODO DE TRATAMENTO DO CANCRO COMPREENDENDO ADMINISTRAR UM RECETOR FZD SOLÚVEL COMPREENDENDO POR EXEMPLO, OU UM DOMÍNIO EXTRACELULAR DE UM RECETOR FZD HUMANO OU UM DOMÍNIO FRI DE UM RECETOR FZD HUMANO, NUMA QUANTIDADE EFICAZ PARA INIBIR O CRESCIMENTO TUMORAL.

**RESUMO****COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO CANCRO**

A presente invenção refere-se a composições e métodos para caracterizar, diagnosticar e tratar o cancro. Em particular a invenção proporciona os meios e métodos para o diagnóstico, caracterização, prognóstico e tratamento do cancro e especificamente visando células estaminais cancerosas. A presente invenção proporciona um recetor FZD solúvel compreendendo um domínio extracelular de um recetor FZD humano que inibe o crescimento de células tumorais. A presente invenção ainda proporciona adicionalmente um recetor solúvel compreendendo um domínio Fri de um recetor FZD humano que se liga a um ligando de um recetor FZD humano e o dito recetor solúvel é capaz de inibir o crescimento tumoral. A presente invenção ainda proporciona adicionalmente um método de tratamento do cancro compreendendo administrar um recetor FZD solúvel compreendendo por exemplo, ou um domínio extracelular de um recetor FZD humano ou um domínio Fri de um recetor FZD humano, numa quantidade eficaz para inibir o crescimento tumoral.

## DESCRIÇÃO

### COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO CANCRO

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

##### Campo da Invenção

A presente invenção refere-se ao campo da oncologia e proporciona novas composições e métodos para diagnosticar e tratar o cancro. Em particular, a presente invenção proporciona antagonistas contra o cancro e em particular contra marcadores de células estaminais de cancro incluindo proteínas de fusão de recetor úteis para o estudo, diagnóstico e tratamento de tumores sólidos.

##### Antecedentes da Técnica

O cancro é uma das principais causas de morte no mundo desenvolvido, resultando em mais de 500.000 mortes por ano somente nos Estados Unidos. Mais de um milhão de pessoas são diagnosticadas com cancro nos Estados Unidos cada ano, e é globalmente estimado que mais de 1 em 3 pessoas desenvolverão alguma forma de cancro ao longo da sua vida. Embora existam mais de 200 tipos diferentes de cancro, quatro destes - mama, pulmão, colorretal e próstata - representam mais de metade dos novos casos totais (Jemal *et al.*, Cancer J. Clin. 53:5-26 (2003)).

O cancro da mama é o cancro mais comum em mulheres, com 12% estimado de mulheres em risco de desenvolver a doença ao longo da sua vida. Embora as taxas de mortalidade tenham diminuído devido a deteção mais precoce e tratamentos melhorados, o cancro da mama permanece uma causa principal de morte em mulheres de meia-idade. Além disso, o cancro de mama metastático é ainda uma doença incurável. Na apresentação, a maioria dos pacientes com cancro de mama metastático têm apenas um ou dois sistemas de órgãos afetados, mas à medida que a doença progride, várias zonas veem-se habitualmente envolvidas. As zonas mais comuns de envolvimento metastático são recorrências loco-regionais na pele e tecidos moles da parede torácica, bem

como nas axilas e áreas supraclaviculares. A zona mais comum de metástases distante é o osso (30-40% de metástases distantes), seguido de pulmões e fígado. E embora somente aproximadamente 1-5% das mulheres com cancro de mama recém-diagnosticado tenham metástases distantes no momento do diagnóstico, aproximadamente 50% dos pacientes com doença local eventualmente sofrem recaída com metástases no prazo de cinco anos. Atualmente a sobrevivência média a partir da manifestação de metástases distantes é de cerca de três anos.

Métodos atuais de diagnóstico e estadiamento do cancro da mama incluem o sistema de tumor-nódulo-metástase (TNM) que se baseia no tamanho do tumor, presença de tumor nos nódulos linfáticos e a presença de metástases distantes conforme descrito no American Joint Committee on Cancer, AJCC Cancer Staging Manual, Filadélfia, PA, Lippincott-Raven Publishers, 5ª ed. (1997), pp 171-180, e em Harris, J R: "Staging of breast carcinoma" in Harris, J. R., et al., eds., Breast Diseases, Filadélfia, Lippincott (1991). Estes parâmetros são utilizados para proporcionar um prognóstico e selecionar uma terapêutica adequada. A aparência morfológica do tumor pode também ser avaliada mas dado que tumores com aparência histopatológica semelhante podem exibir variabilidade clínica significativa, esta abordagem tem sérias limitações. Finalmente, podem ser utilizados ensaios para marcadores de superfície celular para dividir determinados tipos de tumores em subclasses. Por exemplo, um fator considerado no prognóstico e tratamento do cancro da mama é a presença do recetor de estrogénio (ER) já que cancros ER positivos respondem tipicamente mais prontamente a terapêuticas hormonais tais como tamoxifen ou inibidores da aromatase do que tumores ER negativos. No entanto, estas análises, embora úteis, somente preveem parcialmente o comportamento clínico dos tumores da mama, e existe muita diversidade fenotípica presente nos cancros da mama que as ferramentas de diagnóstico atuais não detetam e as terapêuticas atuais não são capazes de tratar.

O cancro da próstata é o cancro mais comum em homens no mundo desenvolvido, representando um valor estimado de 33% de todos os novos casos de cancro nos Estados Unidos, e é a segunda causa de morte mais frequente (Jemal *et al.*, CA Cancer J. Clin. 53:5-26 (2003)). Desde a introdução do teste sanguíneo para o antigénio específico da próstata (PSA), a deteção precoce do cancro da próstata melhorou dramaticamente as taxas de sobrevivência, e a taxa de sobrevivência de cinco anos para pacientes com cancros da próstata de estágio local e regional no momento do diagnóstico aproxima-se a 100%. Contudo, mais de 50% dos pacientes desenvolverão eventualmente doença localmente avançada ou metastática (Muthuramalingam *et al.*, Clin. Oncol. 16:505-516 (2004)).

Atualmente a prostatectomia e a terapêutica por radiação proporcionam tratamento curativo para a maioria dos tumores da próstata localizados. Contudo, as opções terapêuticas são muito limitadas para casos avançados. Para a doença metastática, a ablação de androgénios com agonista da hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH) por si só ou em combinação com anti-androgénios é o tratamento padrão. No entanto, apesar do bloqueio máximo de androgénios, a doença quase sempre progride com a maioria desenvolvendo doença independente de androgénios. Atualmente não existe um tratamento uniformemente aceite para o cancro da próstata refratário a hormonas, e são comumente utilizados regimes quimioterapêuticos (Muthuramalingam *et al.*, Clin. Oncol. 16:505-516 (2004); Trojan *et al.*, Anticancer Res. 25:551-561 (2005)).

O cancro colorretal é o terceiro cancro mais comum e a quarta causa de mortes por cancro mundial mais frequente (Weitz *et al.*, 2005, Lancet 365:153-65). Aproximadamente 5-10% de todos os cancros colorretais são hereditários sendo uma das formas principais a polipose adenomatosa familiar (FAP), uma doença autossómica dominante na qual cerca de 80% dos indivíduos afetados contêm uma mutação na linha germinal do

gene da polipose adenomatosa coli (APC). O carcinoma colorretal tem uma tendência para invadir localmente através de crescimento circunferencial e noutros lugares através de disseminação linfática, hematogénica, transperitoneal e perineural. O sítio mais comum de envolvimento extra-linfático é o fígado, sendo os pulmões o órgão extra-abdominal mais frequentemente afetado. Outros sítios de disseminação hematogénica incluem os ossos, rins, glândulas suprarrenais e cérebro.

O sistema atual de estadiamento para o cancro colorretal é baseado no grau de penetração tumoral através da parede intestinal e da presença ou ausência de envolvimento nodal. Este sistema de estadiamento é definido através de três principais classificações de Duke: a doença A de Duke está confinada às camadas da submucosa do cólon ou reto; a doença B de Duke tem tumores que invadem através da *muscularis propria* e podem penetrar a parede do cólon ou reto; e a doença C de Duke inclui qualquer grau de invasão da parede intestinal com metástases de nódulos linfáticos regionais. Enquanto a ressecção cirúrgica é altamente eficaz para os cancros colorretais de estágio precoce, proporcionando taxas de cura de 95% em pacientes A de Duke, a taxa é reduzida a 75% em pacientes B de Duke e a presença de nódulos linfáticos positivos na doença C de Duke prevê uma probabilidade de 60% de recorrência no prazo de cinco anos. O tratamento de pacientes C de Duke com um curso de quimioterapia pós-cirúrgico reduz a taxa de recorrência a 40-50%, e é atualmente o padrão de tratamento para estes pacientes.

O cancro pulmonar é o cancro mais comum mundialmente, o terceiro cancro mais comumente diagnosticado nos Estados Unidos, e de longe a causa mais frequente de mortes por cancro (Spiro et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166:1166-1196 (2002); Jemal et al., CA Cancer J. Clin. 53:5-26 (2003)). Acredita-se que o tabagismo é responsável por um valor estimado de 87% de todos os cancros pulmonares tornando-o a doença

evitável mais mortal. O cancro pulmonar é dividido em dois tipos principais que representam mais de 90% de todos os cancros pulmonares: cancro pulmonar de células pequenas (SCLC) e cancro pulmonar de células não pequenas (NSCLC). O SCLC representa 15-20% dos casos e é caracterizado através da sua origem em vias aéreas centrais de grande tamanho e da composição histológica de lâminas de células pequenas com pouco citoplasma. O SCLC é mais agressivo que o NSCLC, crescendo rapidamente e metastizando de forma precoce e frequente. O NSCLC representa 80-85% de todos os casos e é adicionalmente dividido em três principais subtipos com base na histologia: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide) e carcinoma indiferenciado de células grandes.

O cancro pulmonar apresenta-se tipicamente tardiamente no seu curso, e como tal tem uma sobrevivência média de apenas 6-12 meses após o diagnóstico e uma taxa geral de sobrevivência de 5 anos de apenas 5-10%. Embora a cirurgia ofereça a melhor oportunidade de uma cura, somente uma pequena fração de pacientes de cancro pulmonar são candidatos com a maioria dependendo de quimioterapia e radioterapia. Apesar das tentativas de manipular o momento e a intensidade da dose destas terapêuticas, as taxas de sobrevivência aumentaram pouco ao longo dos últimos 15 anos (Spiro *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166:1166-1196 (2002)).

O cancro origina-se a partir da desregulação dos mecanismos que controlam o desenvolvimento e a manutenção teciduais normais, e cada vez mais se acredita que as células estaminais desempenham um papel central (Beachy *et al.*, *Nature* 432:324 (2004)). Durante o desenvolvimento animal normal, as células de todos ou da maioria dos tecidos são derivadas a partir de precursores normais, chamados células estaminais (Morrison *et al.*, *Cell* 88:287-298 (1997); Morrison *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.* 9:216-221 (1997); Morrison *et al.*, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11:35-71 (1995)). As células estaminais são células que: (1) têm extensa capacidade proliferativa; (2)

são capazes de divisão celular assimétrica para gerar um ou mais tipos de progénie com potencial proliferativo e/ou de desenvolvimento reduzidos; e (3) são capazes de divisões celulares simétricas para autorrenovação ou auto-manutenção. O exemplo mais bem conhecido de renovação celular adulta através da diferenciação de células estaminais é o sistema hematopoiético em que precursores imaturos em termos de desenvolvimento (células estaminais e progenitoras hematopoiéticas) respondem a sinais moleculares para formar os tipos celulares linfóide e sanguíneo variados. Outras células, incluindo células do intestino, sistema ductal da mama e pele são constantemente reabastecidos a partir de uma pequena população de células estaminais em cada tecido, e estudos recentes sugerem que a maioria dos restantes tecidos adultos também alberga células estaminais, incluindo o cérebro.

Os tumores sólidos são compostos por populações celulares heterogêneas. Por exemplo, os cânceros da mama são uma mistura de células cancerosas e células normais, incluindo células mesenquimatosas (do estroma), células inflamatórias e células endoteliais. Modelos clássicos de cancro sustentam que populações celulares de cancro diferentes têm todas a capacidade de proliferar e originar um novo tumor. No modelo clássico, a heterogeneidade tumoral celular resulta a partir de fatores ambientais bem como de mutações em curso nas células cancerosas resultando numa população diversa de células tumorigénicas. Este modelo apoia-se na ideia de que todas as populações de células tumorais teriam algum grau de potencial tumorigénico. (Pandis *et al.*, Genes, Chromosomes & Cancer 12:122-129 (1998); Kuukasjrvi *et al.*, Cancer Res. 57:1597-1604 (1997); Bonsing *et al.*, Cancer 71:382-391 (1993); Bonsing *et al.*, Genes Chromosomes & Cancer 82:173-183 (2000); Beerman H. *et al.*, Cytometry. 12:147-154 (1991); Aubele M e Werner M, Analyt. Cell. Path. 19:53 (1999); Shen L *et al.*, Cancer Res. 60:3884 (2000)).

Um modelo alternativo para a heterogeneidade de tumores



sólidos observada é que os tumores sólidos resultam a partir de uma "célula estaminal de tumor sólido" (ou "célula estaminal cancerosa" a partir de um tumor sólido) que é subsequentemente submetida a desenvolvimento caótico através de rondas de divisão celular tanto simétricas como assimétricas. Neste modelo de células estaminais, os tumores sólidos contêm um subconjunto distinto e limitado (possivelmente inclusive raro) que partilham as propriedades de "células estaminais" normais, no sentido em que proliferam extensamente e dão eficazmente origem tanto a células estaminais de tumor sólido adicionais (autorrenovação) como à maioria das células tumorais de um tumor sólido que carece de potencial tumorigénico. Com efeito, mutações numa população de células estaminais duradoura podem iniciar a formação de células estaminais cancerosas que são subjacentes ao crescimento e manutenção de tumores e cuja presença contribui à falência das abordagens terapêuticas atuais.

A natureza de células estaminais do cancro foi inicialmente revelada no cancro sanguíneo, leucemia mieloide aguda (AML) (Lapidot *et al.*, Nature 17:645-648 (1994)). Mais recentemente foi demonstrado que tumores da mama humanos malignos albergam de forma semelhante uma pequena e distinta população de células estaminais cancerosas enriquecidas na sua capacidade de formar tumores em ratinhos imunodeficientes. Foi verificado que uma população de células Lin ESA+, CD44+, CD24-/baixo estava enriquecida 50 vezes em células tumorigénicas em comparação com células tumorais não fracionadas (Al-Hajj *et al.*, PNAS 100:3983-3988 (2003)). A capacidade de isolar prospetivamente as células cancerosas tumorigénicas permitiu a investigação de vias biológicas críticas, que são subjacentes à tumorigenicidade nestas células, e como tal promete o desenvolvimento de melhores ensaios de diagnóstico e terapêuticas para pacientes de cancro. É a esta finalidade que a presente invenção se dirige.

O documento US2002/0137129 divulga a utilização de FZD24

fusionado com Fc para terapêutica.

#### BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um recetor solúvel e um portador, excipiente e/ou estabilizador farmaceuticamente aceitável, em que a sequência de aminoácidos do recetor solúvel consiste nos resíduos 28 a 158 da SEQ ID NO: 7, ligados a uma sequência de recetor não FZD, em que a sequência do recetor não FZD compreende uma Fc humana.

A presente invenção também proporciona a composição reivindicada para utilização num método do corpo humano através de terapêutica, conforme estabelecido na reivindicação 4, e para utilização num método de tratamento do cancro conforme estabelecido em qualquer das reivindicações 5 a 7.

Exemplos de tumores sólidos que podem ser tratados utilizando uma composição terapêutica da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, sarcomas e carcinomas tais como, mas não limitados a: fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiossarcoma, endoteliossarcoma, linfangiossarcoma, linfangioendoteliossarcoma, sinovióma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, carcinoma de cólon, cancro pancreático, cancro da mama, cancro ovárico, cancro prostático, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basais, adenocarcinoma, carcinoma das glândulas sudoríparas, carcinoma das glândulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renais, hepatoma, carcinoma dos ductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilms, cancro do colo do útero, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células pequenas, carcinoma de bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma,

meningioma, melanoma, neuroblastoma e retinoblastoma. A invenção é aplicável a sarcomas e cânceros epiteliais, tais como cânceros do ovário e cânceros da mama.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS/FIGURAS

FIG. 1: Semivida dos Recetores Solúveis FZD.Fc. Foram administradas proteínas de fusão Fc purificadas por via i.p. a 2 ratinhos cada e foram obtidas amostras de sangue a vários tempos após a administração. As proteínas FZD4 Fri.Fc, FZD5 Fri.Fc, e FZD8 Fri.Fc ainda estão presentes no soro sanguíneo 72 horas após a injeção, e as proteínas FZD5 Fri.Fc e FZD8 Fri.Fc estão presentes no soro sanguíneo até 96 horas após a administração. Em contraste, FZD5 BCD.Fc não é detetável no soro sanguíneo após somente 24 horas (acima).

FIG. 2: Os Recetores Solúveis FZD Fc Inibem a Sinalização de Wnt3a. Foram incubadas concentrações crescentes (2 nM, 5 nM, e 60 nM) de proteínas de fusão FZD Fc incluindo FZD4 Fri.Fc, FZD5 ECD.Fc, FZD5 Fri.Fc e FZD8 Fri.Fc com células L na presença ou ausência de ligando Wnt3a e a estabilização da  $\beta$ -catenina foi determinada através de imunotransferência. Na ausência de ligando Wnt3a, a  $\beta$ -catenina não pôde ser detetada (LCM). Na presença de Wnt3a a  $\beta$ -catenina foi estabilizada, e esta estabilização foi bloqueada através do aumento dos níveis de proteína recetora solúvel FZD5, FZD8, e FZD4 mas não de uma proteína Fc de controlo (Con Fc).

FIG. 3: Os Recetores Solúveis FZD Fc Inibem a Sinalização de Wnt. Foram incubadas células Hek 293 estavelmente transfectadas com repórter 8xTCF-luciferase com concentrações crescentes de recetores solúveis FZD:Fc na presença de diferentes ligandos Wnt incluindo Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a e Wnt7b. As proteínas de fusão FZD4 Fc, FZD5 Fc e FZD8 Fc inibiram a sinalização por Wnt mediada por todos os 5 ligandos Wnt conforme mostrado através da perda de atividade de luciferase.

FIG. 4: Redução do Crescimento Tumoral por Proteínas de Recetor Solúvel FZDFc. Ratinhos NOD/SCID injetados por via

subcutânea com células tumorais de cólon dissociadas (10.000 células por animal; n=10) foram tratados dois dias depois com recetor solúvel FZD7ECD.Fc, recetor solúvel FZD10ECD.Fc, ou injeções controlo. O volume tumoral total é mostrado para os dias 21, 24, 28 e 30. A redução do volume tumoral por parte de FZD7ECD.Fc foi estatisticamente significativa no dia 28 e dia 30 (\*).

FIG. 5: Prevenção do Crescimento Tumoral Dependente de Wnt por Proteína de Recetor Solúvel FZD8 Fri.Fc. Ratinhos NOD/SCID injetados com 50.000 células derivadas de tumor MMTV WNT1 (n=10) foram tratados no dia seguinte com recetor solúvel FZD8 Fri.Fc ou PBS como um controlo. O crescimento tumoral foi monitorizado semanalmente até ser detetado crescimento e posteriormente o crescimento tumoral foi medido duas vezes por semana. O crescimento tumoral em animais tratados com FZD Fri.Fc (barra da esquerda) foi praticamente eliminado em comparação com o observado nos animais de controlo (barra da direita).

FIG. 6: Redução do Crescimento Tumoral de Xenoenxerto PE13 por Proteína de Recetor Solúvel FZD8 Fri.Fc. Ratinhos NOD/SCID injetados com 50.000 células tumorais da mama PE13 (n=10) foram tratados no dia seguinte com recetor solúvel FZD8 Fri.Fc ou PBS como um controlo. O crescimento tumoral foi monitorizado semanalmente até ser detetado crescimento, e posteriormente o crescimento tumoral foi medido duas vezes por semana. O crescimento tumoral em animais tratados com FZD Fri.Fc (barra da esquerda) foi significativamente reduzido em comparação com o observado nos animais de controlo (barra da direita).

FIG. 7: Tratamento do Crescimento Tumoral Dependente de Wnt por Proteína de Recetor Solúvel FZD Fri.Fc. Foram implantadas em ratinhos de duplo *knockout rag-2/cadeia γ* fêmea 50.000 células derivadas de tumor da mama MMTV WNT1. O tratamento com FZD8 Fri.Fc a 5 mg/kg reduziu o crescimento de tumores, conforme medido através do volume tumoral total ao longo do

tempo, relativamente a ratinhos tratados com PBS (barras brancas). O tratamento com FZD8 Fri.Fc a 10 mg/kg e 30 mg/kg foi ainda mais eficaz na redução do tamanho dos tumores pré-estabelecidos. Em contraste, FZD5 Fri.Fc não mostrou efeitos anti-tumorais em tumores da mama estabelecidos que requerem Wnt1 para o crescimento.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

##### Definições

O termo "antagonista" é utilizado no presente documento para incluir qualquer molécula que bloqueia, inibe, ou neutraliza parcialmente ou totalmente a expressão de ou a atividade biológica de um marcador de célula estaminal cancerosa divulgado no presente documento e tal atividade biológica inclui, mas não está limitada a, inibição do crescimento tumoral. O termo "antagonista" inclui qualquer molécula que bloqueia, inibe, ou neutraliza uma atividade biológica da via FZD. Moléculas antagonistas adequadas incluem, mas não estão limitadas a, fragmentos ou variantes de sequência de aminoácidos de proteínas de recetores nativos de FZD incluindo recetores FZD solúveis.

Os termos "isolado" e "purificado" referem-se ao material que está substancialmente ou essencialmente isento de componentes que normalmente o acompanham no seu estado nativo. A pureza e a homogeneidade dão tipicamente determinadas utilizando técnicas de química analítica tais como eletroforese por gel de poliacrilamida ou cromatografia líquida de alto desempenho. É substancialmente purificada uma proteína (por exemplo um recetor solúvel) ou ácido nucleico que é a espécie predominante presente numa preparação. Em particular, um ácido nucleico isolado é separado a partir de grelhas de leitura aberta que flanqueiam naturalmente o gene e codificam proteínas para além da proteína codificada pelo gene. Um anticorpo isolado é separado a partir de outras proteínas não imunoglobulinas e a partir de outras proteínas imunoglobulinas com diferente especificidade de ligação a

antigénio. Pode também significar que o ácido nucleico ou proteína é pelo menos 85% pura, pelo menos 95% pura, e nalgumas formas de realização pelo menos 99% pura.

Conforme utilizado no presente documento os termos "recetor solúvel" e "recetor solúvel FZD" referem-se a um fragmento extracelular N-terminal de uma proteína recetora FZD precedendo o primeiro domínio transmembranar do recetor que pode ser segregada a partir de uma célula numa forma solúvel. São previstos tanto recetores solúveis FZD compreendendo o domínio extracelular N-terminal completo (ECD) (referido no presente documento como "FZD EDC") bem como fragmentos de menor tamanho. São também divulgados recetores solúveis FZD compreendendo o domínio Fri (referidos no presente documento como "FZD Fri"). Recetor solúveis FZD Fri podem demonstrar atividade biológica alterada, (por exemplo semivida proteica aumentada) em comparação com recetores solúveis compreendendo o FZD ECD completo. A semivida proteica pode ser adicionalmente aumentada através de modificação covalente com poli(etilenoglicol) ou poli(óxido de etileno) (ambos referidos como PEG). Recetores solúveis FZD incluem domínios de FZD ECD ou Fri fusionados em estrutura a outras proteínas funcionais e estruturais incluindo, mas não limitadas a, uma Fc humana (por exemplo Fc humana derivada a partir de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM); etiquetas proteicas (por exemplo myc, FLAG, GST); outras proteínas endógenas ou fragmentos proteicos; ou qualquer outra sequência proteica útil incluindo qualquer região ligante entre um domínio FZD ECD ou Fri e uma proteína ligada. Em determinadas formas de realização o domínio Fri de um recetor FZD está ligado a Fc de IgG1 humana (referido no presente documento como "FZD Fri Fc"). Recetores solúveis FZD também incluem proteínas com inserções, deleções, substituições e variações conservativas de aminoácidos, etc.

Conforme utilizado no presente documento, os termos "cancro" e "canceroso" referem-se ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos na qual uma população de células é

caracterizada por crescimento celular não regulado. Exemplos de cancro incluem, mas não estão limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia. Exemplos mais particulares de tais cancros incluem cancro de células escamosas, cancro pulmonar de células pequenas, cancro pulmonar de células não pequenas, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma de células pequenas do pulmão, cancro do peritонеu, cancro hepatocelular, cancro gastrointestinal, cancro pancreático, glioblastoma, cancro do colo do útero, cancro ovárico, cancro do fígado, cancro da bexiga, hepatoma, cancro da mama, cancro do cólon, cancro colorretal, carcinoma do endométrio ou do útero, carcinoma das glândulas salivares, cancro renal, cancro do fígado, cancro prostático, cancro da vulva, cancro da tiroide, carcinoma hepático e vários tipos de cancro da cabeça e pescoço.

Os termos "distúrbio proliferativo" e "doença proliferativa" referem-se a distúrbios associados com proliferação celular anormal tal como o cancro.

"Tumor" e "neoplasma" conforme utilizados no presente documento referem-se a qualquer massa de tecido que resulta de crescimento ou proliferação celulares excessivos, tanto benignos (não cancerosos) como malignos (cancerosos) incluindo lesões pré-cancerosas.

"Metástase" conforme utilizado no presente documento refere-se ao processo através do qual um cancro se dissemina ou se transfere a partir do sítio de origem a outras regiões do corpo com o desenvolvimento de uma lesão cancerosa semelhante na nova localização. Uma célula "metastática" ou "metastizante" é uma que perde contactos adesivos com células vizinhas e migra através da corrente sanguínea ou linfa desde o sítio primário da doença para invadir estruturas corporais vizinhas.

Conforme utilizado no presente documento, o termo "sujeito" refere-se a qualquer animal (por exemplo, um mamífero), incluindo, mas não limitado a seres humanos,

primatas não humanos, roedores, e semelhantes, que se destina a ser o recetor de um tratamento particular. Tipicamente, os termos "sujeito" e "paciente" são utilizados indistintamente no presente documento em referência a um sujeito humano.

Os termos "célula estaminal cancerosa", "célula estaminal tumoral", ou "célula estaminal de tumor sólido" são utilizados indistintamente no presente documento e referem-se a uma população de células a partir de um tumor sólido que: (1) têm extensa capacidade proliferativa; (2) são capazes de divisão celular assimétrica para gerar um ou mais tipos de descendência diferenciada com potencial proliferativo ou de desenvolvimento reduzidos; e (3) são capazes de divisões celulares simétricas para autorrenovação ou auto-manutenção. Estas propriedades de "células estaminais cancerosas", "células estaminais tumorais" ou "células estaminais de tumor sólido" conferem a estas células estaminais cancerosas a capacidade de formar tumores palpáveis após transplante seriado num ratinho imunocomprometido em comparação com a maioria de células tumorais que não formam tumores. As células tumorais, isto é, células não tumorigénicas podem formar um tumor após transplante um número limitado de vezes (por exemplo uma ou duas vezes) após obter as células tumorais a partir de um tumor sólido mas não reterão a capacidade de formar tumores palpáveis em transplante seriado num ratinho imunocomprometido. As células estaminais cancerosas são submetidas a autorrenovação frente a diferenciação de uma forma caótica para formar tumores com tipos celulares anormais que se podem alterar ao longo do tempo à medida que ocorrem mutações. As células estaminais de tumor sólido da presente invenção diferem da "linha estaminal cancerosa" proporcionada pelo documento de patente U.S. N.º 6.004.528. Neste documento de patente, a "linha estaminal cancerosa" é definida como um tipo celular progenitor de crescimento lento que em si tem poucas mutações mas que é submetido a divisões celulares simétricas em vez de assimétricas como resultado de alterações tumorigénicas que



ocorrem no ambiente da célula. Esta hipótese de "linha estaminal cancerosa" propõe como tal que células tumorais altamente mutadas, de proliferação rápida se originam amplamente como resultado de um ambiente anormal, que faz com que células estaminais relativamente normais se acumulem e posteriormente sejam submetidas a mutações que causam a sua transformação em células tumorais. O documento de Patente U.S. N.º 6.004.528 propõe que um tal modelo pode ser utilizado para potenciar o diagnóstico de cancro. O modelo de células estaminais de tumor sólido é fundamentalmente diferente do modelo de "linha estaminal cancerosa" e como resultado exhibe utilidades não proporcionadas por parte do modelo de "linha estaminal cancerosa". Em primeiro lugar, as células estaminais de tumor sólido não se encontram "isentas de mutação". A "linha estaminal cancerosa isenta de mutação" descrita no documento de patente U.S. N.º 6.004.528 pode ser considerada uma lesão pré-cancerosa, enquanto as células estaminais de tumor sólido descritas nesta invenção são células cancerosas que contêm em si mesmas as mutações que são responsáveis pela tumorigénese. Isto é, as células estaminais de tumor sólido ("células estaminais cancerosas") da invenção estariam incluídas entre as células altamente mutadas que são distinguidas a partir da "linha estaminal cancerosa" do documento de patente U.S. N.º 6.004.528. Em segundo lugar, as mutações genéticas que conduzem ao cancro podem ser amplamente intrínsecas nas células estaminais de tumor sólido bem como ser ambientais. O modelo de células estaminais de tumor sólido prevê que células estaminais de tumor sólido isoladas podem dar origem a tumores adicionais após transplante (como tal explicando a metástase) enquanto o modelo de "linha estaminal cancerosa" preveria que as células da "linha estaminal cancerosa" não seriam capazes de dar origem a um novo tumor, já que foi o seu ambiente anormal o fator tumorigénico. Com efeito, a capacidade de transplantar células estaminais de tumor sólido humanas dissociadas e fenotipicamente isoladas em ratinhos (a um ambiente que é muito

diferente do ambiente tumoral normal), onde ainda formam novos tumores, distingue a presente invenção do modelo de "linha estaminal cancerosa". Em terceiro lugar, as células estaminais de tumor sólido são propensas a dividir-se tanto simetricamente como assimetricamente, de tal forma que a divisão celular simétrica não é uma propriedade obrigatória. Em quarto lugar, as células estaminais de tumor sólido podem dividir-se rapidamente ou lentamente, dependendo de uma série de variáveis, de tal forma que uma taxa de proliferação lenta não é uma característica definidora.

Os termos "célula cancerosa", "célula tumoral" e equivalentes gramaticais referem-se à população total de células derivadas a partir de um tumor incluindo tanto células não tumorigénicas, que compreendem a maior parte da população de células tumorais, como células estaminais tumorigénicas também referidas no presente documento como células estaminais cancerosas.

Conforme utilizado no presente documento "tumorigénico" refere-se às características funcionais de uma célula estaminal de tumor sólido incluindo as propriedades de autorrenovação (dando origem a células estaminais cancerosas tumorigénicas adicionais) e proliferação para gerar todas as restantes células tumorais (dando origem a células tumorais diferenciadas e como tal não tumorigénicas) que permitem que as células estaminais de tumor sólido formem um tumor. Estas propriedades de autorrenovação e proliferação para gerar todas as restantes células tumorais conferem às células estaminais cancerosas desta invenção a capacidade de formar tumores palpáveis após transplante seriado num ratinho imunocomprometido em comparação com a maioria de células tumorais que são incapazes de formar tumores após transplante seriado. As células tumorais, isto é, células tumorais não tumorigénicas, podem formar um tumor após transplante num ratinho imunocomprometido um número limitado de vezes (por exemplo uma ou duas vezes) após obter as células tumorais a

partir de um tumor sólido.

Conforme utilizado no presente documento, os termos "marcador(es) canceroso(s) de células estaminais", "marcador(es) de células estaminais cancerosas", "marcador(es) de células estaminais tumorais", ou "marcador(es) de células estaminais de tumor sólido" referem-se a um gene ou genes ou uma proteína, polipéptido, ou péptido expresso por parte do gene ou genes cujo nível de expressão, por si só ou em combinação com outros genes, está correlacionado com a presença de células cancerosas tumorigénicas em comparação com células não tumorigénicas. A correlação pode estar relacionada com uma expressão do gene tanto aumentada como diminuída (por exemplo níveis aumentados ou diminuídos de ARNm ou do péptido codificado pelo gene).

Conforme utilizado no presente documento, os termos "biópsia" e "tecido de biópsia" referem-se a uma amostra de tecido ou fluido que é removido a partir de um sujeito para a finalidade de determinar se a amostra contém tecido canceroso. Em algumas formas de realização, é obtido tecido de biópsia ou fluido devido à suspeita de que um sujeito padece de cancro. O tecido ou fluido de biópsia é então examinado quanto à presença ou ausência de cancro.

Conforme utilizado no presente documento um "portador farmacêuticamente aceitável" refere-se a qualquer material que, quando combinado com um ingrediente ativo de uma composição farmacêutica tal como um anticorpo, permite ao anticorpo, por exemplo, reter a sua atividade biológica. Adicionalmente, um "portador farmacêuticamente aceitável" não desencadeia uma resposta imunitária num sujeito recetor. Os exemplos incluem, mas não estão limitados a quaisquer dos portadores farmacêuticos padrão tais como uma solução salina de tampão fosfato, água, e várias emulsões óleo/água. Exemplos de diluentes para administração por via parentérica ou por aerossol são solução salina tamponada com fosfato ou solução salina normal (0,9%).

O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de um recetor solúvel, ou outro fármaco eficaz para "tratar" uma doença ou distúrbio num sujeito ou mamífero. No caso do cancro, a quantidade terapeuticamente eficaz do fármaco pode reduzir o número de células cancerosas; reduzir o tamanho do tumor; inibir ou deter a infiltração de células cancerosas em órgãos periféricos; inibir ou deter metástases tumorais; inibir ou deter o crescimento tumoral; e/ou aliviar em certa medida um ou mais dos sintomas associados com o cancro. Na medida em que o fármaco previne o crescimento e/ou mata as células cancerosas existentes, pode ser referido como citostático e/ou citotóxico.

Conforme utilizado no presente documento o termo "inibir o crescimento tumoral" refere-se a qualquer mecanismo através do qual o crescimento tumoral possa ser inibido. Em determinadas formas de realização o crescimento tumoral é inibido abrandando a proliferação de células tumorais. Em determinadas formas de realização o crescimento tumoral é inibido detendo a proliferação de células tumorais. Em determinadas formas de realização o crescimento tumoral é inibido matando as células tumorais. Em determinadas formas de realização o crescimento tumoral é inibido induzindo a apoptose das células tumorais. Em determinadas formas de realização o crescimento tumoral é inibido privando as células tumorais de nutrientes. Em determinadas formas de realização o crescimento tumoral é inibido prevenindo a migração das células tumorais. Em determinadas formas de realização o crescimento tumoral é inibido prevenindo a invasão das células tumorais.

Conforme utilizado no presente documento, "proporcionar um diagnóstico" ou "informação diagnóstica" refere-se a qualquer informação que é útil para determinar se um paciente tem uma doença ou condição e/ou para classificar a doença ou condição numa categoria fenotípica ou qualquer categoria tendo significado relativamente ao prognóstico ou resposta provável ao tratamento (tanto tratamento em geral como qualquer

tratamento em particular) da doença ou condição. De forma semelhante, diagnóstico refere-se a proporcionar qualquer tipo de informação diagnóstica, incluindo, mas não limitada a, se é provável que um sujeito tenha uma condição (tal como um tumor), informação relacionada com a natureza ou classificação de um tumor como por exemplo um tumor de alto risco ou um tumor de baixo risco, informação relacionada com o prognóstico e/ou informação útil para a seleção de um tratamento adequado. A seleção do tratamento pode incluir a eleição de um agente quimioterapêutico particular ou outra modalidade de tratamento tal como cirurgia ou radiação ou uma eleição sobre se administrar ou não terapêutica.

Conforme utilizado no presente documento, os termos "proporcionar um prognóstico", "informação prognóstica", ou "informação previsível" referem-se a proporcionar informação relativamente ao impacto da presença do cancro (por exemplo, conforme determinado através dos métodos diagnósticos da presente invenção) na saúde futura de um sujeito (por exemplo, morbidade ou mortalidade esperadas, a probabilidade de contrair cancro e o risco de metástase).

Termos tais como "tratando", "tratamento", "tratar", "aliviando", e "aliviar" referem-se tanto a 1) medidas terapêuticas que curam, abrandam, reduzem os sintomas de, e/ou detêm a progressão de uma condição ou distúrbio patológicos diagnosticados e 2) medidas profiláticas ou de prevenção que previnem ou abrandam o desenvolvimento de uma condição ou distúrbio patológicos visados. Como tal sujeitos com necessidade de tratamento incluem aqueles que já padecem do distúrbio; aqueles propensos a padecer do distúrbio; e aqueles nos quais é visada a prevenção do distúrbio. Um sujeito é "tratado" exitosamente de acordo com os métodos da presente invenção de o paciente mostra um ou mais dos seguintes: uma redução do número de ou ausência completa de células cancerosas; uma redução do tamanho do tumor; inibição ou ausência de infiltração de células cancerosas nos órgãos

periféricos incluindo a disseminação do cancro em tecido mole e osso; inibição de ou ausência de metástases tumorais; inibição de ou ausência de crescimento tumoral; alívio de um ou mais sintomas associados com o cancro específico; morbidade e mortalidade reduzidas; e melhoria da qualidade de vida.

Conforme utilizado no presente documento, os termos "polinucleótido" e "ácido nucleico" referem-se a um polímero composto por uma multiplicidade de unidades nucleotídicas (ribonucleótidos ou desoxirribonucleótidos ou variantes estruturais relacionadas) ligadas através de ligações fosfodiéster, incluindo mas não limitadas a, ADN ou ARN. O termo abrange sequências que incluem qualquer dos análogos de bases conhecidos do ADN e ARN incluindo, mas não limitados a, 4 acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5 (carboxiidroxilmetil) uracilo, 5-fluorouracilo, 5 bromouracilo, 5-carboximetilaminometil 2 tiouracilo, 5 carboximetilaminometiluracilo, diidrouacilo, inosina, N6 isopenteniladenina, 1 metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1 metilguanina, 1 metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2 metiladenina, 2 metilguanina, 3-metilcitosina, 5 metilcitosina, N6 metiladenina, 7 metilguanina, 5 metilaminometiluracilo, 5-metoxi-amino-metil 2 tiouracilo, beta D manosilqueosina, 5' metoxycarbonilmetiluracilo, 5 metoxiuracilo, 2 metiltio N6 isopenteniladenina, metiléster de ácido uracilo 5 oxiacético, ácido uracilo 5 oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2 tiocitosina, 5-metil-2 tiouracilo, 2-tiouracilo, 4 tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster de ácido N-uracilo 5 oxiacético, ácido uracilo 5 oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, e 2,6 diaminopurina.

O termo "gene" refere-se a uma molécula de ácido nucleico (por exemplo, ADN) que compreende codificar sequências necessárias para a produção de um polipéptido, precursor, ou

ARN (por exemplo, ARNr, ARNt). O polipéptido pode ser codificado por uma sequência codificante de comprimento completo ou por qualquer porção da sequência codificante desde que a atividade desejada ou propriedades funcionais (por exemplo, atividade enzimática, ligação a ligandos, transdução de sinais, imunogenicidade, etc.) do comprimento completo ou fragmento sejam retidas. O termo também abrange a região codificante de um gene estrutural e as sequências situadas em posição adjacente à região codificante nos terminais tanto 5' como 3' a uma distância de cerca de 1 kb ou mais em cada lado para que o gene corresponda ao comprimento do ARNm de comprimento completo. As sequências situadas a 5' da região codificante e presente no ARNm são referidas como sequências não traduzidas 5'. As sequências situadas a 3' ou a jusante da região codificante e presentes no ARNm são referidas como sequências não traduzidas 3'. O termo "gene" abrange tanto ADNc como formas genómicas de um gene. Uma forma genómica ou clone de um gene contém a região codificante interrompida com sequências não codificantes chamadas "intrões" ou "regiões intervenientes" ou "sequências intervenientes". Os intrões são segmentos de um gene que são transcritos em ARN nuclear (ARNhn); os intrões podem conter elementos de regulação tais como potenciadores. Os intrões são removidos ou separados por *splicing* a partir do transcrito nuclear ou primário; como tal os intrões estão ausentes no transcrito de ARN mensageiro (ARNm). O ARNm funciona durante a tradução para especificar a sequência ou ordem dos aminoácidos num polipéptido nascente. Adicionalmente a conter intrões, as formas genómicas de um gene podem também incluir sequências situadas nos extremos tanto 5' como 3' das sequências que estão presentes no transcrito de ARN. Estas sequências são referidas como sequências ou regiões "flanqueantes" (estas sequências flanqueantes estão situadas a 5' ou 3' das sequências não traduzidas presentes no transcrito de ARNm). A região flanqueante 5' pode conter sequências de regulação tais como promotores e potenciadores que controlam

ou influenciam a transcrição do gene. A região flanqueante 3' pode conter sequências que dirigem a terminação da transcrição, clivagem pós-transcricional e poliadenilação.

O termo "recombinante" quando utilizado em referência a uma célula, ácido nucleico, proteína ou vetor indica que a célula, ácido nucleico, proteína ou vetor foi modificado através da introdução de um ácido nucleico ou proteína heterólogos, a alteração de um ácido nucleico ou proteína nativos, ou que a célula é derivada de uma célula de tal forma modificada. Assim, por exemplo, as células recombinantes expressam genes que não são encontrados na forma nativa (não recombinante) da célula ou expressam genes nativos que são sobre-expressos ou de outra forma anormalmente expressos tal como, por exemplo, expressos como fragmentos de ocorrência não natural ou variantes de união. Através do termo "ácido nucleico recombinante" no presente documento significa ácido nucleico, originalmente formado *in vitro*, em geral, através da manipulação do ácido nucleico, por exemplo, utilizando polimerases e endonucleases, de uma forma não encontrada normalmente na natureza. Desta forma, é alcançada a ligação operativa de diferentes sequências. Como tal uma molécula de ácido nucleico isolada, numa forma linear, ou um vetor de expressão formado *in vitro* através da ligação de moléculas de ADN que não são normalmente ligadas, são ambos considerados recombinantes para os propósitos desta invenção. É entendido que uma vez fabricada uma molécula de ácido nucleico recombinante e introduzida numa célula ou organismo hospedeiro, irá replicar-se de forma não recombinante, isto é, utilizando a maquinaria celular *in vivo* do hospedeiro em vez de manipulações *in vitro*; no entanto, tais ácidos nucleicos, uma vez produzidos de forma recombinante, embora subsequentemente replicados de forma não recombinante, são ainda considerados recombinantes para os propósitos da invenção. De forma semelhante, uma "proteína recombinante" é uma proteína fabricada utilizando técnicas recombinantes, isto



é, através da expressão de uma molécula de ácido nucleico recombinante conforme ilustrado acima.

Conforme utilizado no presente documento, o termo "gene heterólogo" refere-se a um gene que não se encontra no seu ambiente natural. Por exemplo, um gene heterólogo inclui um gene a partir de uma espécie introduzido noutra espécie. Um gene heterólogo inclui também um gene nativo de um organismo que foi alterado de alguma forma (por exemplo, mutado, adicionado em cópias múltiplas, ligado a sequências de regulação não nativas, etc). Os genes heterólogos distinguem-se dos genes endógenos em que as sequências de genes heterólogos são tipicamente ligadas a sequências de ADN que não são encontradas naturalmente associadas com as sequências génicas no cromossoma ou estão associadas com porções do cromossoma não encontradas na natureza (por exemplo, genes expressos em *loci* onde o gene não é normalmente expresso).

Conforme utilizado no presente documento, o termo "vetor" é utilizado em referência a moléculas de ácido nucleico que transferem segmento(s) de ADN de uma célula a outra. O termo "veículo" é algumas vezes utilizando indistintamente com "vetor". Os vetores são frequentemente derivados a partir de plasmídeos, bacteriófagos, ou vírus vegetais ou animais.

"Ligação" refere-se ao processo de formar ligações fosfodiéster entre dois fragmentos de ácidos nucleicos de cadeia dupla. A menos que proporcionado de outra forma, a ligação pode ser alcançada utilizando tampões conhecidos e condições com 10 unidades a ADN T4 ligase ("ligase") por 0,5 ug de quantidades aproximadamente equimolares dos fragmentos de ADN a ser ligados. A ligação de ácidos nucleicos pode servir para ligar duas proteínas em estrutura para produzir uma única proteína, ou proteína de fusão.

Conforme utilizado no presente documento, o termo "expressão génica" refere-se ao processo de converter informação genética codificada num gene em ARN (por exemplo, ARNm, ARNr, ARNt, ou ARNsn) através da "transcrição" do gene

(por exemplo, através da ação enzimática de uma ARN polimerase), e para genes codificadores de proteínas, em proteínas através da "tradução" do ARNm. A expressão génica pode ser regulada em vários estádios do processo. A "regulação positiva" ou "ativação" refere-se a regulação que aumenta a produção de produtos de expressão génica (por exemplo, ARN ou proteínas), enquanto a "regulação negativa" ou "repressão" refere-se a regulação que diminui a produção. Moléculas (por exemplo, fatores de transcrição) que estão envolvidas na regulação positiva ou regulação negativa são frequentemente chamadas "ativadores" e "repressores", respetivamente.

Os termos "polipéptido", "péptido", "proteína", e "fragmento proteico" são utilizados indistintamente no presente documento para referir um polímero de resíduos de aminoácidos. Os termos aplicam-se a polímeros de aminoácidos nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos é um mimético químico artificial de um aminoácido de ocorrência natural correspondente, bem como polímeros de aminoácidos de ocorrência natural e polímeros de aminoácidos de ocorrência não natural.

O termo "aminoácido" refere-se a aminoácidos de ocorrência natural e sintéticos, bem como a análogos de aminoácidos e miméticos de aminoácidos que funcionam de maneira semelhante aos aminoácidos de ocorrência natural. Aminoácidos de ocorrência natural são aqueles codificados pelo código genético, bem como aqueles aminoácidos que são posteriormente modificados, por exemplo, hidroxiprolina, gama-carboxiglutamato, e O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos refere-se a compostos que tem a mesma estrutura química básica que um aminoácido de ocorrência natural, por exemplo, um carbono alfa que é ligado a um hidrogénio, um grupo carboxilo, um grupo amino, e um grupo R, por exemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfónio de metionina. Tais análogos podem ter grupos R modificados (por exemplo, norleucina) ou estruturas principais

modificadas, mas retêm a mesma estrutura química básica que um aminoácido de ocorrência natural. Miméticos de aminoácidos refere-se a compostos químicos que têm uma estrutura que é diferente da estrutura química geral de um aminoácido, mas que funciona de forma semelhante a um aminoácido de ocorrência natural.

"Variantes conservativamente modificadas" aplica-se a sequências tanto de aminoácidos como de ácidos nucleicos. "Variantes de aminoácido" refere-se a sequências de aminoácidos. Relativamente a sequências de ácidos nucleicos particulares, variantes conservativamente modificadas refere-se àqueles ácidos nucleicos que codificam sequências de aminoácidos idênticas ou essencialmente idênticas, ou onde o ácido nucleico não codifica uma sequência de aminoácidos, a sequências essencialmente idênticas ou associadas (por exemplo, naturalmente contíguas). Devido à degeneração do código genético, um grande número de ácidos nucleicos funcionalmente idênticos codificam a maioria das proteínas. Por exemplo, os codões GCA, GCC, GCG e GCU codificam todos o aminoácidos alanina. Assim, em cada posição onde uma alanina é especificada por parte de um codão, o codão pode ser alterado a outro dos codões correspondentes descritos sem alterar o polipéptido codificado. Tais variações de ácidos nucleicos são "variações silenciosas", que são uma espécie de variações conservativamente modificadas. Cada sequência de ácidos nucleicos no presente documento que codifica um polipéptido também descreve variações silenciosas do ácido nucleico. Um perito na especialidade reconhecerá que em determinados contextos cada codão num ácido nucleico (exceto AUG, que é habitualmente o único codão para a metionina, e TGG, que é habitualmente o único codão para o triptofano) podem ser modificados para proporcionar uma molécula funcionalmente idêntica. Consequentemente, as variações silenciosas de um ácido nucleico que codifica um polipéptido estão implícitas numa sequência descrita relativamente ao produto de expressão,

mas não relativamente a sequências de sonda. Como com as sequências de aminoácidos, um perito na especialidade reconhecerá que substituições individuais, deleções ou adições a um ácido nucleico, péptido, polipéptido, ou sequência proteica que altera, adiciona ou elimina um único aminoácido ou uma pequena percentagem de aminoácidos na sequência codificada é uma "variante conservativamente modificada" incluindo onde a alteração resulta na substituição de um aminoácido com um aminoácido quimicamente semelhante. Quadros de substituição conservativa proporcionando aminoácidos funcionalmente semelhantes são bem conhecidos na técnica. Tais variantes conservativamente modificadas são adicionais a e não excluem variantes polimórficas, homólogos interespecie, e alelos da invenção. Substituições tipicamente conservativas incluem: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); e 8) Cisteína (C), Metionina (M) (veja-se, por exemplo, Creighton, Proteins (1984)).

O termo "marcado com epítopo" conforme utilizado no presente documento refere-se a um polipéptido quimérico compreendendo uma proteína marcadora de célula estaminal, ou uma sequência de domínio ou porção da mesma, fusionada com uma "etiqueta de epítopo". O polipéptido de etiqueta de epítopo compreende resíduos de aminoácidos suficientes para proporcionar um epítopo para reconhecimento por parte de um anticorpo, no entanto é suficientemente curto de forma a não interferir com a atividade da proteína marcadora de células estaminais cancerosas. Etiquetas de epítopo adequadas têm geralmente seis resíduos de aminoácidos, habitualmente entre cerca de 8 até cerca de 50 resíduos de aminoácidos, ou cerca de 10 até cerca de 20 resíduos. Etiquetas de epítopo comumente utilizadas incluem etiquetas Fc, HA, His, e FLAG.

Conforme utilizado no presente documento, "cerca" refere-se a mais ou menos 1% do número indicado. Por exemplo, "cerca de 10%" indica um intervalo de 9% até 11%.

#### Descrição Detalhada

São descritos no presente documento composições e métodos para estudar, diagnosticar, caracterizar, e tratar o cancro. Em particular, são descritos antagonistas contra marcadores de células estaminais de tumores sólidos e métodos de utilização destes antagonistas para inibir o crescimento tumoral e tratar o cancro em pacientes humanos. Os antagonistas incluem proteínas recetoras solúveis compreendendo marcadores de células estaminais cancerosas.

Em certas formas de realização, a presente invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um recetor solúvel, conforme definido na reivindicação 1 anexa.

A composição pode ser proporcionada para utilização num método de tratamento do cancro conforme descrito no presente documento.

Um método de tratamento do cancro pode compreender administrar o recetor solúvel numa quantidade eficaz para inibir o crescimento de células tumorais.

Um método de tratamento do cancro pode compreender administrar o recetor solúvel numa quantidade eficaz para inibir o crescimento de células tumorais em combinação com terapêutica de radiação. Um método de tratamento do cancro pode compreender administrar o recetor solúvel numa quantidade eficaz para inibir o crescimento de células tumorais em combinação com quimioterapia. Um método de tratamento do cancro pode compreender administrar o recetor solúvel numa quantidade eficaz para inibir o crescimento de células tumorais a partir de um tumor da mama, tumor colorretal, tumor pulmonar, tumor pancreático, tumor da próstata, ou um tumor da cabeça e pescoço. Células Estaminais e Células Estaminais de Tumor Sólido

Os cancros comuns surgem em tecidos que contêm uma subpopulação de células proliferantes que são responsáveis

pelo reabastecimento das células maduras de vida curta. Em tais órgãos, o amadurecimento celular está organizado numa hierarquia na qual uma rara população de células estaminais tanto dá origem às células mais diferenciadas como se perpetua a si mesma através de um processo chamado autorrenovação (Akashi e Weissman, *Developmental Biology of Hematopoiesis*, Oxford Univ. Press, NY (2001); Spangrude *et al.*, *Science* 241:58-61 (1988); Baum *et al.*, *PNAS* 89:2804-2808 (1992); Morrison *et al.*, *PNAS* 92:10302-20306 (1995); Morrison *et al.*, *Immunity* 5:207-216 (1996); Morrison *et al.*, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:35-71 (1995); Morrison *et al.*, *Dev.* 124:1929-1939 (1997); Morrison e Weissman, *Immunity* 1:661. (1994); Morrison *et al.*, *Cell* 88:287-298 (1997); Uchida *et al.*, *PNAS* 97:14720-14725 (2000); Morrison *et al.*, *Cell* 101:499-510 (2000)). Embora seja provável que a maioria dos tecidos contenham células estaminais, devido à sua raridade estas células foram rigorosamente identificadas e purificadas para estudar as suas propriedades biológicas, moleculares, e bioquímicas em somente uns poucos tecidos. As células estaminais melhor caracterizadas são aquelas que dão origem ao sistema hematopoiético, chamadas células estaminais hematopoiéticas (HSCs). A utilidade das HSCs foi demonstrada na terapêutica do cancro com a sua utilização extensa em transplantes de medula óssea para regenerar o sistema hematolinfóide após protocolos de mieloablação (Baum *et al.*, *Bone Marrow Transplantation*, Blackwell Scientific Publications, Boston (1994)). Compreender a biologia celular dos tecidos nos quais surge o cancro, e especificamente das células estaminais residindo nesses tecidos, promete proporcionar novas visões na biologia do cancro.

Como os tecidos nos quais são originados, os tumores sólidos consistem numa população heterogénea de células. O fato de que a maioria destas células careça de tumorigenicidade sugeriu que o desenvolvimento e manutenção de tumores sólidos também se apoia numa população de células estaminais (isto é,

células cancerosas tumorigénicas) com a capacidade de proliferar e dar origem de forma eficiente tanto a células estaminais tumorais adicionais (autorrenovação) como à maioria das células tumorais mais diferenciadas que carecem de potencial tumorigénico (isto é, células cancerosas tumorigénicas). O conceito de células estaminais cancerosas foi primeiramente introduzido pouco depois da descoberta das HSCs e foi estabelecido experimentalmente na leucemia mieloide aguda (AML). (Park *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 46:411-422 (1971); Lapidot *et al.*, Nature 367:645-648 (1994); Bonnet e Dick, Nat. Med. 3:730-737 (1997); Hope *et al.*, Nat. Immunol. 5:738-743 (2004)). Foram mais recentemente isoladas células estaminais a partir de tumores sólidos com base na sua expressão de um padrão único de recetor de superfície celular e na avaliação das suas propriedades de autorrenovação e proliferação em cultura e em modelos animais de xenoenxerto. Foi descoberta uma população ESA+ CD44+ CD24-/baixo enriquecida mais de 50 vezes para a capacidade de formar tumores em relação a células tumorais não fracionadas (Al-Hajj *et al.*, PNAS 100:3983-3988 (2003)). A capacidade de isolar células estaminais cancerosas tumorigénicas a partir da maior parte de células tumorais não tumorigénicas levou à identificação de marcadores de células estaminais cancerosas, genes com expressão diferencial em células estaminais cancerosas em comparação com células tumorais não tumorigénicas ou epitélio mamário normal, utilizando análise de microarranjo. A presente invenção emprega o conhecimento destes marcadores de células estaminais cancerosas identificados para estudar, caracterizar, diagnosticar e tratar o cancro.

#### Proteína Marcadora de Células Estaminais Cancerosas

As células estaminais normais e as células estaminais cancerosas partilham a capacidade de proliferar e autorrenovar-se, como tal não é surpreendente que uma série de genes que regulam o desenvolvimento de células estaminais normais contribuam à tumorigénese (revisto em Reya *et al.*,

Nature 414:105-111 (2001) e Taipale e Beachy, Nature 411:349-354 (2001)). A presente invenção identifica recetores Fzd, incluindo por exemplo, Fzd4, Fzd5, e Fzd8 como marcadores de células estaminais cancerosas, implicando a via de sinalização por Wnt na manutenção de células estaminais cancerosas e como um alvo para o tratamento do cancro através da eliminação destas células tumorigénicas.

A via de sinalização por Wnt é um de vários reguladores críticos da formação de padrões embrionários, manutenção de tecidos pós-embrionários, e biologia de células estaminais. Mais especificamente, a sinalização por Wnt tem um papel importante na geração da polaridade celular e na especificação do destino celular incluindo autorrenovação por parte de populações de células estaminais. A ativação não regulada da via de Wnt está associada a numerosos cancros humanos onde pode alterar o destino do desenvolvimento de células tumorais para mantê-las num estado indiferenciado e não proliferativo. Como tal a carcinogénese pode proceder usurpando mecanismos homeostáticos que controlam o desenvolvimento normal e a reparação tecidual por parte das células estaminais (revisto em Reya & Clevers, Nature 434:843 (2005); Beachy *et al.*, Nature 432:324 (2004)).

A via de sinalização por Wnt foi primeiramente elucidada no mutante de desenvolvimento *wingless* (*wg*) de *Drosophila* e a partir do proto-oncogene *int-1*, de ratinho, agora *Wnt1* (Nusse e Varmus, Cell 31:99-109 (1982); Van Ooyen e Nusse, Cell 39:233-240 (1984); Cabrera *et al.*, Cell 50:659-663 (1987); Rijsewijk *et al.*, Cell 50:649-657 (1987)). Os genes *Wnt* codificam glicoproteínas modificadas por lípidos segregadas das quais 19 foram identificadas em mamíferos. Estes ligandos segregados ativam um complexo recetor consistindo num membro da família de recetores Frizzled (Fzd) e proteína relacionada com recetor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) 5 ou 6 (LPR5/6). Os recetores Fzd são sete proteínas de domínio transmembranar da superfamília de recetor acoplado a proteína



G (GPCR) e contém um domínio de ligação a ligando N-terminal extracelular de grande tamanho com 10 cisteínas conservadas, conhecido como domínio rico em cisteína (CRD) ou domínio Fri. Existem dez recetores Fzd humanos: FZD1-10. Diferentes CRDs de Fzd têm diferentes afinidades de ligação para Wnts específicos (Wu e Nusse, J. Biol. Chem. 277:41762-41769 (2002)), e os recetores Fzd foram agrupados naqueles que ativam a via da  $\beta$ -catenina canónica e aqueles que ativam vias não canónicas descritas abaixo (Miller et al., Oncogene 18:7860-7872 (1999)). LRP5/6 são proteínas transmembranares de passagem única com quatro domínios extracelulares de tipo EGF separados por seis repetições de aminoácidos YWTD que contribuem à ligação de Fzd e do ligando (Johnson et al., J. Bone Mineral Res 19:1749 (2004)).

A via de sinalização por Wnt canónica ativada após ligação ao recetor é mediada através da interação direta da proteína citoplásmica Dishevelled (Dsh) com o recetor Fzd e resulta na estabilização citoplásmica e acumulação de  $\beta$ -catenina. Na ausência de um sinal de Wnt, a  $\beta$ -catenina é localizada a um complexo de destruição citoplásmico que inclui as proteínas de supressão tumoral polipose adenomatosa coli (APC) e auxina. Estas proteínas funcionam como estruturas críticas para permitir que a glicogénio sintase cinase (GSK)-3 $\beta$  ligue e fosforile a  $\beta$ -catenina, marcando-a para degradação através da via da ubiquitina/proteossoma. A ativação de Dsh resulta na fosforilação de GSK3 $\beta$  e na dissociação do complexo de destruição. A  $\beta$ -catenina citoplásmica acumulada é então transportada para o núcleo onde interage com as proteínas de ligação de ADN da família Tcf/Lef para ativar a transcrição.

Em adição à via de sinalização canónica, os ligandos Wnt também ativam vias independentes da  $\beta$ -catenina (Veeman et al. Dev. Cell 5:367-377 (2003)). A sinalização por Wnt não canónica foi implicada em numerosos processos mas de forma mais convincente nos movimentos de gastrulação através de um mecanismo semelhante ao da via de polaridade celular planar

(PCP) de *Drosophila*. Outros mecanismos potenciais de sinalização por Wnt não canónica incluem fluxo de cálcio, JNK, e proteínas G tanto pequenas como heterotriméricas. É frequentemente observado antagonismo entre as vias canónicas e não canónicas, e alguma evidência indica que a sinalização não canónica pode suprimir a formação de cancro (Olson e Gibo, Exp. Cell Res. 241:134 (1998); Topol et al., J. Cell Biol. 162:899-908 (2003)).

As células estaminais hematopoiéticas (HSCs) são as células estaminais mais bem entendidas no corpo, e a sinalização por Wnt está implicada tanto na sua manutenção normal como na transformação leucémica (Reya e Clevers, 2005, Nature 434:843). As HSCs são uma população rara de células que residem num nicho estromal no interior da medula óssea adulta. Estas células são caracterizadas tanto por um perfil de expressão génica único como por uma capacidade de dar continuamente origem a células progenitoras mais diferenciadas para reconstituir o sistema hematopoiético inteiro. Tanto as HSCs como tal células do seu microambiente estromal expressam ligandos Wnt, e a ativação repórter de Wnt está presente nas HSCs *in vivo*. Além disso, tanto a  $\beta$ -catenina como Wnt3A purificado promovem a autorrenovação de HSGs de ratinho *in vitro* e potenciam a sua capacidade de reconstituir o sistema hematopoiético *in vivo* enquanto Wnt 5A promove a expansão dos progenitores hematopoiéticos humanos *in vitro* e a repopulação num modelo de xenotransplante NOD-SCID (Reya et al., Nature 423:409-414 (2003); Willert et al., Nature 423:448-452 (2003); Van Den Berg et al., Blood 92:3189-3202 (1998); Murdoch et al., PNAS 100:3422-3427 (2003)).

Mais recentemente foi constatado que a sinalização por Wnt tem um papel no crescimento oncogénico de linhagens tanto mieloides como linfoides. Por exemplo, progenitores de granulócitos e macrófagos (GMPs) a partir de leucemias mieloides crónicas mostraram sinalização por Wnt ativada da qual dependem para o crescimento e renovação (Jamieson et al.,

N. Engl. J. Med. 351:657-667 (2004)). E embora as leucemias não pareçam abranger mutações na via de Wnt, a sinalização autócrina e/ou parácrina de Wnt pode suportar autorrenovação cancerosa (Reya & Clevers, Nature 434:843 (2005)).

A via de sinalização por Wnt canónica também tem um papel central na manutenção das populações de células estaminais no intestino delgado e cólon, e a ativação inadequada desta via tem um papel proeminente nos cancros colorretais (Reya & Clevers, Nature 434:843 (2005)). O epitélio de absorção dos intestinos encontra-se organizado em vilosidades e criptas. As células estaminais residem nas criptas e dividem-se lentamente para produzir células de proliferação rápida que dão origem a todas as populações celulares diferenciadas que migram para fora das criptas para ocupar as vilosidades intestinais. A cascata de sinalização por Wnt tem um papel dominante no controlo dos destinos celulares ao longo do eixo cripta-vilosidade e é essencial para a manutenção da população de células estaminais. A perturbação da sinalização por Wnt tanto através de perda genética de Tcf7/2 através de recombinação homóloga (Korinek *et al.*, Nat. Genet. 19:379 (1998)) como da sobre-expressão de Dickkopf-1 (Dkk1), um potente antagonista de Wnt segregado (Pinto *et al.*, Genes Dev. 17:1709-1713 (2003); Kuhnert *et al.*, PNAS 101:266-271 (2004); resulta na depleção das populações de células estaminais intestinais.

O cancro colorretal é mais comumente iniciado através da ativação de mutações na cascata de sinalização de Wnt. Aproximadamente 5-10% de todos os cancros colorretais são hereditários sendo uma das formas principais a polipose adenomatosa familiar (FAP), uma doença autossómica dominante na qual cerca de 80% dos indivíduos afetados contêm uma mutação na linha germinal do gene da polipose adenomatosa coli (APC). Foram também identificadas mutações noutros componentes da via de Wnt incluindo auxinas e  $\beta$ -cateninas. Os adenomas individuais são excrescências clonais de células epiteliais contendo um

segundo alelo inativado, e o elevado número de adenomas FAP resulta inevitavelmente no desenvolvimento de adenocarcinomas através de mutações de adição em oncogenes e/ou genes de supressão tumoral. Além disso, a ativação da via de sinalização de Wnt, incluindo mutações de ganho de função em APC e  $\beta$ -cateninas, podem induzir desenvolvimento hiperplásico e crescimento tumoral em modelos de ratinho (Oshima *et al.*, Cancer Res. 57:1644-1649 (1997); Harada *et al.*, EMBO J. 18:5931-5942 (1999)).

Foi primeiramente descoberto um papel para a sinalização por Wnt no cancro com a identificação de *Wnt1* (originalmente *int1*) como um oncogene em tumores mamários transformado através da inserção próxima de um vírus de ratinho (Nusse e Varmus, Cell 31:99-109 (1982)). Foi acumulada desde então evidência adicional para o papel da sinalização por Wnt no cancro da mama. Por exemplo, a sobre-expressão transgênica da  $\beta$ -catenina nas glândulas mamárias resulta em hiperplasias e adenocarcinomas (Imbert *et al.*, J. Cell Biol. 153:555-568 (2001); Michaelson e Leder, Oncogene 20:5093-5099 (2001)) enquanto a perda da sinalização por Wnt perturba o desenvolvimento normal das glândulas mamárias (Tepera *et al.*, J. Cell Sc. 116:1137-1149 (2003); Hatsell *et al.*, J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 8:145-158 (2003)). Mais recentemente foi mostrado que as células estaminais mamárias são ativadas através de sinalização por Wnt (Liu *et al.*, PNAS 101:4158 (2004)). No cancro da mama humano, a acumulação de  $\beta$ -catenina implica sinalização por Wnt ativada em mais de 50% dos carcinomas, e embora não tenham sido identificadas mutações específicas, foi observada regulação positiva da expressão do recetor Frizzled (Brennan e Brown, J. Mammary Gland Neoplasia 9:119-131 (2004); Malovanovic *et al.*, Int. J. Oncol. 25:1337-1342 (2004)).

FZD10, FZD8, FZD7, FZD4, e FZD5 são cinco dos dez recetores Wnt humanos identificados. No embrião de ratinho, Fzd10 é expresso com Wnt7a no tubo neural, botões dos membros, e duto de Muller (Nunnally e Parr, Dev. Genes Evol. 214:144-148

(2004)) e pode atuar como um recetor para Wnt7a durante o desenvolvimento dos membros (Kawakami *et al.*, *Dev. Growth Differ.* 42:561-569 (2000)). Fzd10 é co-expresso com Wnt7b nos pulmões, e estudos de transfeção celular mostraram que o co-recetor Fzd10/LRP5 ativa a via de sinalização por Wnt não canónica como resposta a Wnt7b (Wang *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 25:5022-5030 (2005)). O RNAm de FZD10 é regulado positivamente em várias linhas celulares cancerosas, incluindo linhas celulares cervicais, gástricas, e de glioblastoma, e em cancros primários incluindo aproximadamente 40% dos cancros gástricos primários, cancros do cólon, e sarcomas sinoviais (Saitoh *et al.*, *Int. J. Oncol.* 20:117-120 (2002); Terasaki *et al.*, *Int. J. Mol. Med.* 9:107-112 (2002); Nagayama *et al.*, *Oncogene* 1-12 (2005)). FZD8 é regulado positivamente em várias linhas celulares cancerosas humanas, cancros gástricos primários, e carcinomas renais (Saitoh *et al.*, *Int. J. Oncol.* 18:991-996 (2001); Kirikoshi *et al.*, *Int. J. Oncol.* 19:111-115 (2001); Janssens *et al.*, *Tumor Biol.* 25:161-171 (2004)). FZD7 é expresso ao longo do trato gastrointestinal e é regulado positivamente em um de cada seis casos de cancro gástrico primário humano (Kirikoshi *et al.*, *Int. J. Oncol.* 19:111-115 (2001)). A expressão do ectodomínio de FZD7 por parte de uma linha celular de cancro do cólon induziu alterações morfológicas e diminuiu o crescimento tumoral num modelo de xenoenxerto (Vincan *et al.*, *Differentiation* 73:142-153 (2005)). FZD5 tem um papel essencial na angiogénese do saco vitelino e da placenta (Ishikawa *et al.*, *Dev.* 128:25-33 (2001)) e é regulado positivamente em carcinomas renais em associação com a ativação da sinalização por Wnt/ $\beta$ -catenina (Janssens *et al.*, *Tumor Biology* 25:161-171 (2004)). FZD4 é altamente expresso em células epiteliais da cripta intestinal e é um de vários fatores que exibem expressão diferencial em tecido normal frente a neoplásico (Gregorieff *et al.*, *Gastroenterology* 129:626-638 (2005)). A identificação de FZD4, 5, 7, 8, e 10 como marcadores de células estaminais cancerosas

torna como estas estas proteínas em alvos ideais para as terapêuticas do cancro.

Antagonistas de Marcadores de Células Estaminais Cancerosas

No contexto da presente divulgação, um agente adequado é um agente que pode ter um ou mais dos seguintes efeitos, por exemplo: interferir com a expressão de um marcador de células estaminais cancerosas; interferir com a ativação de uma via de transdução de sinal de células estaminais cancerosas através de, por exemplo, inibição estérica de interações entre um marcador de células estaminais cancerosas e o seu ligando, recetor ou co-recetores, ou ligação a um marcador de células estaminais cancerosas e disparo da morte celular ou inibição da proliferação tumoral.

Os antagonistas contra um marcador de células estaminais cancerosas atuam extracelularmente para afetar ou inibir a função de um marcador de células estaminais cancerosas.

O antagonista é um recetor de proteína de células estaminais cancerosas ou proteína de recetor solúvel. A ligação extracelular de um antagonista contra um marcador de células estaminais cancerosas pode inibir a sinalização de uma proteína marcadora de células estaminais cancerosas inibindo a ativação intrínseca (por exemplo, atividade cinase) de um marcador de células estaminais cancerosas e/ou inibindo estericamente a interação, por exemplo, de um marcador de células estaminais cancerosas com o seu ligando, de um marcador de células estaminais cancerosas com o seu recetor, de um marcador de células estaminais cancerosas com um co-recetor, ou de um marcador de células estaminais cancerosas com a matriz extracelular. Além disso, A ligação extracelular de um antagonista contra um marcador de células estaminais cancerosas pode regular negativamente a expressão na superfície celular de um marcador de células estaminais cancerosas tal como, por exemplo, através da internalização de uma proteína marcadora de células estaminais cancerosas e/ou diminuindo o tráfego na superfície celular de um marcador de

células estaminais cancerosas.

Os antagonistas de um marcador de células estaminais cancerosas podem disparar a morte celular indiretamente inibindo a angiogénese. A angiogénese é o processo através do qual novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos preexistentes e é um processo fundamental requerido para o crescimento normal, por exemplo, durante o desenvolvimento embrionário, cura de lesões e como resposta à ovulação. O crescimento de um tumor sólido maior que 1-2 mm também requer angiogénese para proporcionar nutrientes e oxigénio sem os quais as células tumorais morrem. Como tal um antagonista de um marcador de células estaminais cancerosas pode visar células vasculares que expressam o marcador de células estaminais cancerosas incluindo, por exemplo, células endoteliais, células do músculo liso ou componentes da matriz extracelular requeridas para a montagem vascular. Um antagonista de um marcador de células estaminais cancerosas pode inibir a sinalização de fatores de crescimento requerida para o recrutamento de células vasculares, montagem, manutenção ou sobrevivência.

Polinucleótidos

Também são descritos no presente documento polinucleótidos isolados codificando os polipéptidos compreendendo as SEQ ID NOS: 1-9. Os polinucleótidos podem estar na forma de ARN ou na forma de ADN com ADN incluindo ADNc, ADN genómico, e ADN sintético. O ADN pode ser de cadeia dupla ou cadeia simples, e se é de cadeia simples pode ser a cadeia codificante ou a cadeia não codificante (anti-sentido). Assim, o termo "polinucleótido codificando um polipéptido" abrange um polinucleótido que inclui somente sequências codificantes para o polipéptido bem como um polinucleótido que inclui sequências codificantes e/ou não codificantes adicionais.

São também descritas variantes dos polinucleótidos descritos acima no presente documento que codificam, por exemplo, fragmentos, análogos, e derivados. A variante do

polinucleótido pode ser uma variante alélica de ocorrência natural do polinucleótido ou uma variante de ocorrência não natural do polinucleótido. Conforme indicado acima no presente documento, o polinucleótido pode ter uma sequência codificante que é uma variante alélica de ocorrência natural da sequência codificante de um polipéptido divulgado. Conforme é conhecido na técnica, uma variante alélica é uma forma alternativa de uma sequência polinucleotídica que tem uma substituição, deleção, ou adição de um ou mais nucleótidos, e que não altera substancialmente a função do polipéptido codificado.

São descritos polinucleótidos onde a sequência codificante para o polipéptido maduro pode ser fusionada na mesma grelha de leitura com um polinucleótido que auxilia em, por exemplo, expressão, secreção, estabilidade proteica de um polipéptido a partir de uma célula hospedeira incluindo, por exemplo, uma sequência líder que funciona como uma sequência secretora para controlar o transporte de um polipéptido a partir da célula. O polipéptido tendo uma sequência líder é uma pré-proteína e pode ter a sequência líder clivada por parte da célula hospedeira para formar a forma madura do polipéptido. Os polinucleótidos podem também codificar para uma pró-proteína que é a proteína madura mais resíduos de aminoácidos 5' adicionais. Uma proteína madura tendo uma pró-sequência é uma pró-proteína e é uma forma inativa da proteína. Uma vez clivada a pró-sequência permanece uma proteína madura ativa. Assim, por exemplo, o polinucleótido pode codificar para uma proteína madura, ou para uma proteína tendo uma pró-sequência ou para uma proteína tendo tanto uma pró-sequência e pré-sequência (sequência líder).

Os polinucleótidos podem também ter a sequência codificante fusionada em grelha com uma sequência de marcador que permite a purificação do polipéptido da presente invenção. A sequência de marcador pode ser uma etiqueta de hexa-histidina proporcionada por um vetor pQE-9 para proporcionar purificação do polipéptido madura fusionado com o marcador no caso de um



hospedeiro bacteriano, ou, por exemplo, a sequência de marcador pode ser uma etiqueta de hemaglutinina (HA) quando um hospedeiro mamífero, por exemplo células COS-7, é utilizado. A etiqueta HA corresponde a um epítipo derivado a partir da proteína de hemaglutinina da gripe (Wilson, I., et al., Cell 37:767 (1984)).

Moléculas de ácidos nucleicos isoladas podem compreender um polinucleótido tendo uma sequência nucleotídica pelo menos 90% idêntica, 95% idêntica, e nalgumas formas de realização, pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a um nucleótido que codifica as sequências divulgadas.

As variantes polinucleotídicas podem conter alterações nas regiões codificantes, regiões não codificantes, ou ambas. As variantes polinucleotídicas podem conter alterações que produzem substituições, adições, ou deleções silenciosas, mas não alteram as propriedades ou atividades do polipéptido codificado. As variantes nucleotídicas podem ser produzidas através de substituições silenciosas devido à degeneração do código genético. As variantes polinucleotídicas podem ser produzidas por uma série de motivos, por exemplo, para otimizar a expressão dos codões para um hospedeiro particular (alterar codões no ADN humano pelos preferidos por parte de um hospedeiro bacteriano tal como *E. coli*).

#### Polipéptidos de Recetor Solúvel

São descritos no presente documento polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturais, ou polipéptidos sintéticos tendo a sequência da SEQ ID NO: 1-9. Será reconhecido na técnica que algumas sequências de aminoácidos podem ser variadas sem efeito significativo na estrutura ou função da proteína. Se tais diferenças de sequência são contempladas, deve ser recordado que haverá áreas críticas na proteína que determinam a atividade. São descritas no presente documento variações dos polipéptidos que mostram atividade substancial ou que incluem regiões de proteína FZD tais como as porções proteicas discutidas no presente documento. Tais mutantes

incluem eliminações, inserções, inversões, repetições, e substituições de tipo. Conforme indicado abaixo, pode ser encontrada orientação relativa às alterações de aminoácidos com probabilidade de ser fenotipicamente silenciosas em Bowie, *et al.*, Science 247:1306-1310 (1990).

Assim, os fragmentos, derivados, ou análogos dos polipéptidos podem ser: (i) um em que um ou mais dos resíduos de aminoácidos são substituídos com um resíduo de aminoácido conservado ou não conservado e tal resíduo de aminoácido substituído pode ou não ser um codificado pelo código genético; ou (ii) ou em que um ou mais dos resíduos de aminoácidos incluem um grupo substituído; ou (iii) um em que o polipéptido maduro se encontra fusionado com outro composto, tal como um composto para aumentar a semivida do polipéptido (por exemplo, polietilenoglicol); ou (iv) um em que os aminoácidos adicionais se encontram fusionados com o polipéptido maduro, tal como uma sequência líder ou secretora ou uma sequência que é empregue para purificação do polipéptido maduro ou uma sequência de pró-proteína. Tais fragmentos, derivados, e análogos são considerados como estando dentro do âmbito dos peritos na especialidade a partir dos ensinamentos no presente documento.

De particular interesse são substituições de aminoácidos com carga com outro aminoácido com carga e com aminoácidos com carga neutra ou negativa. Esta última resulta em proteínas com carga positiva reduzida para melhorar as características da proteína de recetor solúvel. A prevenção da agregação é altamente desejável, já que a agregação de proteínas não só resulta numa perda da atividade mas pode também ser problemática ao preparar formulações farmacêuticas, já que podem ser imunogénicas. (Pinckard *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 2:331-340 (1967); Robbins *et al.*, Diabetes 36:838-845 (1987); Cleland *et al.* Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377 (1993)).

Conforme indicado, as alterações são tipicamente de natureza menor, tais como substituições de aminoácidos

conservativas que não afetam significativamente a dobragem ou atividade da proteína (veja-se Quadros 1 e 2).

QUADRO 1. Substituições de Aminoácidos Conservativas

Aromáticos	Fenilalanina
	Triptofano
	Tirosina
Hidrofóbicos	Leucina
	Isoleucina
	Valina
Polares	Glutamina
	Asparagina
Básicos	Arginina
	Lisina
	Histidina
Ácidos	Ácido Aspártico
	Ácido Glutâmico
Pequenos	Alanina
	Serina
	Treonina
	Metionina
	Glicina

Quadro 2. Substituições de Aminoácidos

Resíduo Original	Substituições	Substituições Exemplares
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser

Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina
Leu (L)	Ile	norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Leu	Leu; Val; Ile; Ala
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina

Naturalmente, o número de substituições de aminoácidos que um perito na especialidade realizaria dependem de vários fatores, incluindo aqueles descritos acima. Geralmente, o número de substituições para qualquer polipéptido de recetor solúvel determinado não serão mais de 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5 ou 3.

Encontram-se divulgados no presente documento os polipéptidos das SEQ ID NOS: 1-9 bem como polipéptidos que têm algumas vezes pelo menos 90% de semelhança com os polipéptidos das SEQ ID NOS: 1-9, e algumas vezes pelo menos 95% de semelhança com os polipéptidos das SEQ ID NOS: 1-9, e algumas vezes pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99% de semelhança com os polipéptidos das SEQ ID NOS: 1-9. Conforme conhecido na técnica a "semelhança" entre dois polipéptidos é determinada através da comparação da sequência de aminoácidos e dos seus substitutos de aminoácidos de um polipéptido com a sequência de um segundo

polipéptido.

Fragmentos ou porções dos polipéptidos podem ser empregues para produzir o polipéptido de comprimento completo correspondente através de síntese peptídica; como tal, os fragmentos podem ser empregues como intermediários para produzir os polipéptidos de comprimento completo. Fragmentos ou porções dos polinucleótidos podem ser utilizados para sintetizar polinucleótidos de comprimento completo da presente invenção.

Um fragmento das proteínas é uma porção ou a totalidade de uma proteína que é capaz de ligar a uma proteína marcadora de células estaminais cancerosas ou parceiro de ligação de proteína de células estaminais cancerosas (por exemplo um recetor, co-recetor, ligando, ou co-ligando). Este fragmento tem uma elevada afinidade para uma proteína marcadora de células estaminais cancerosas ou parceiro de ligação de proteína de células estaminais cancerosas (por exemplo um recetor, co-recetor, ligando, ou co-ligando). Alguns fragmentos de proteínas de fusão são fragmentos proteicos compreendendo pelo menos parte da porção extracelular de uma proteína marcadora de células estaminais cancerosas ou parceiro de ligação de proteína de células estaminais cancerosas ligado a pelo menos parte de uma região constante de uma imunoglobulina. A afinidade pode encontrar-se no intervalo de cerca de  $10^{-11}$  a  $10^{-12}$  M, embora a afinidade possa variar consideravelmente com fragmentos de diferentes tamanhos, variando desde  $10^{-7}$  até  $10^{-13}$  M. Um fragmento pode ser de cerca de 10-255 aminoácidos em comprimento e compreende o sítio de ligação de proteína marcadora de células estaminais cancerosas ligado a pelo menos parte de uma região constante de uma imunoglobulina.

Os polipéptidos e análogos podem ser adicionalmente modificados para conter frações químicas adicionais não normalmente parte da proteína. Essas frações derivadas podem melhorar a solubilidade, a semivida biológica ou a absorção da

proteína. As frações podem também reduzir ou eliminar quaisquer efeitos secundários indesejáveis das proteínas e semelhantes. Uma visão geral para essas frações pode ser encontrada em Remington's Pharmaceutical Sciences, 20<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

As frações químicas mais adequadas para derivação incluem polímeros hidrossolúveis. Um polímero hidrossolúvel é desejável porque a proteína à qual se encontra unido não precipita num meio aquoso, tal como um meio fisiológico. Nalgumas formas de realização, o polímero será farmacologicamente aceitável para a preparação de um produto ou composição terapêuticos. Um perito na especialidade será capaz de selecionar o polímero desejado com base em tais considerações sobre se o conjugado de polímero/proteína será utilizado terapêuticamente, e se assim for, a dosagem desejada, tempo de circulação, resistência à proteólise, e outras considerações. A eficácia da derivação pode ser verificada através da administração do derivado, na forma desejada (isto é, através de bomba osmótica, ou através de injeção ou infusão, ou, adicionalmente formulado para vias de administração oral, pulmonar ou outras), e determinando a sua eficácia. Polímeros hidrossolúveis adequados incluem, mas não estão limitados a, polietilenoglicol (PEG), copolímeros de etilenoglicol/propilenoglicol, carboximetilcelulose, dextrano, álcool polivinílico, polivinil pirrolidona, poli 1,3 dioxolano, poli 1,3,6 trioxano, copolímero de etileno/anidrido maleico, poliaminoácidos (tanto homopolímeros como copolímeros aleatórios), e dextrano ou polietilenoglicol de poli(n-vinil pirrolidona), homopolímeros de propilenoglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polióis poli-oxietilados (por exemplo, glicerol, álcool polivinílico, e misturas dos mesmos. O propionaldeído de polietilenoglicol pode ter vantagens no fabrico devido à sua estabilidade em água.

O número de moléculas de polímero unidas desta forma pode

variar, e um perito na especialidade será capaz de verificar o efeito na função. Pode ser monoderivada, ou pode ser proporcionada uma di-, tri, tetra- ou qualquer combinação de derivação, com as mesmas ou diferentes frações químicas (por exemplo, polímeros, tais como diferentes massas de polietilenoglicóis). A proporção de moléculas de polímero para moléculas de proteína (ou péptido) irá variar, bem como as suas concentrações na mistura de reação. Em geral, a relação ótima (em termos de eficácia de reação na medida em que não haja proteína ou polímero sem reagir em excesso) será determinada através de fatores tais como o grau desejado de derivação (por exemplo, mono, di, tri, etc.), a massa molecular do polímero selecionado, se o polímero é ou não ramificado, e as condições de reação.

As moléculas de polietilenoglicol (ou outras frações químicas) devem estar unidas à proteína considerando os efeitos nos domínios funcionais ou antigénicos da proteína. Existem uma série de métodos de união disponíveis para os peritos na especialidade. Veja-se por exemplo, EP 0 401 384, (acoplar PEG a G-CSF), veja-se também Malik *et al.*, Exp. Hematol 20:1028-1035 (1992) (relatando a peguilação de GM-CSF utilizando cloreto de tresilo). Por exemplo, o polietilenoglicol pode ser covalentemente ligado através de resíduos de aminoácidos através de um grupo reativo, tal como, um grupo amino ou carboxilo livre. Grupos reativos são aqueles aos quais pode ser ligada uma molécula de polietilenoglicol ativada. Os resíduos de aminoácidos tendo um grupo amino livre podem incluir resíduos de lisina e o resíduo de aminoácido N-terminal. Aqueles tendo um grupo carboxilo livre podem incluir resíduos de ácido aspártico, resíduos de ácido glutâmico, e o resíduo de aminoácido C-terminal. Podem também ser utilizados grupos sulfidrido como um grupo reativo para unir as moléculas de polietilenoglicol. Para fins terapêuticos, pode ser realizada união num grupo amino tal como união no terminal N ou grupo lisina. Deve ser evitada união em

resíduos importantes para ligação a recetores se é desejada ligação aos recetores.

Pode ser especificamente desejada uma proteína com grupo amino terminal quimicamente modificado. Utilizando polietilenoglicol como uma ilustração das presentes composições, pode ser selecionada a partir de uma variedade de moléculas de polietilenoglicol (através de massa molecular, ramificação, etc.), a proporção de moléculas de polietilenoglicol para moléculas de proteína (ou péptido) na mistura de reação, o tipo de reação de peguilação a ser realizada, e o método de obtenção da proteína peguilada em N-terminal. O método de obtenção da preparação peguilada em N-terminal (isto é, separando esta fração de outras frações monopeguiladas se necessário) pode ser através da purificação do material peguilado em N-terminal a partir de uma população de moléculas proteicas peguiladas. Pode ser alcançada modificação química de N-terminal seletiva através de alquilação redutiva que explora a reatividade diferencial de diferentes tipos de grupos amino primários (lisina frente ao N-terminal) disponíveis para derivação numa proteína particular. Sob as condições de reação adequadas, é alcançada derivação substancialmente seletiva da proteína no terminal N com um grupo carbonilo contendo o polímero. Por exemplo, a proteína pode ser seletivamente N peguilada levando a cabo a reação a um pH que permite tirar partido das diferenças de pKa entre o grupo amino épsilon dos resíduos de lisina e o do grupo amino alfa do resíduo N-terminal da proteína. Através de tal derivação seletiva, é controlada a união de um polímero hidrossolúvel a uma proteína: a conjugação com o polímero tem lugar predominantemente no terminal N da proteína e não ocorre qualquer modificação significativa de outros grupos reativos, tais como os grupos amino de cadeia lateral de lisina. Utilizando alquilação redutiva, o polímero hidrossolúvel pode ser do tipo descrito acima, e deve ter um único aldeído reativo para acoplar à proteína. Pode ser utilizado propionaldeído de



polietilenoglicol, contendo um único aldeído reativo.

A peguilação pode ser levada a cabo através de qualquer das reações de peguilação conhecidas na técnica. Veja-se, por exemplo: Focus on Growth Factors, 3(2): 4-10 (1992); documento EP 0 154 316,

documento EP 0 401 384; e as outras publicações citadas no presente documento que estão relacionadas com a peguilação. A peguilação pode levada a cabo através de uma reação de acilação ou uma reação de alquilação com uma molécula de polietilenoglicol reativa (ou um polímero hidrossolúvel reativo análogo).

Assim, é contemplado que os polipéptidos recetores solúveis a ser utilizados de acordo com a presente invenção podem incluir proteínas recetoras solúveis peguiladas ou variantes, em que o(s) grupo(s) PEG está(ão) unido(s) através de grupos acilo ou alquilo. Tais produtos podem ser monopeguilados ou polipeguilados (por exemplo, contendo 2, 6, e tipicamente 2, 5, grupos PEG). Os grupos PEG estão geralmente unidos à proteína nos grupos amino a ou e de aminoácidos, mas é também contemplado que os grupos PEG possam estar unidos a qualquer grupo amino unido à proteína, que seja suficientemente reativo para se unir a um grupo PEG sob condições de reação adequadas.

As moléculas de polímeros utilizadas nas abordagens tanto de acilação como de alquilação podem ser seleccionadas de entre polímeros hidrossolúveis conforme descrito acima. O polímero seleccionado deve ser modificado para ter um único grupo reativo, tal como um éster ativo para acilação ou um aldeído para alquilação, para que o grau de polimerização possa ser controlado conforme proporcionado nos presentes métodos. Um aldeído de PEG reativo exemplar é o propionaldeído de polietilenoglicol, que é estável em água, ou derivados mono C1-C10 alcoxi or ariloxi do mesmo (veja-se o documento de Patente U.S. Nº. 5.252.714). O polímero pode ser ramificado ou não ramificado. Para as reações de acilação, o(s) polímero(s)

selecionado(s) deve(m) ter um único grupo éster reativo. Para a presente alquilação redutiva, o(s) polímero(s) selecionado(s) deve(m) ter um único grupo aldeído reativo. Geralmente, o polímero hidrossolúvel não será selecionado a partir de resíduos de glicosilo de ocorrência natural já que estes são normalmente fabricados mais convenientemente através de sistemas de expressão recombinante de mamíferos. O polímero pode ser de qualquer massa molecular, e pode ser ramificado ou não ramificado. Um polímero hidrossolúvel para utilização no presente documento é o polietilenoglicol. Conforme utilizado no presente documento, polietilenoglicol pretende englobar qualquer uma das formas de PEG que foram utilizadas para derivar outras proteínas, tais como mono (C1-C10) alcoxi- ou ariloxi-polietilenoglicol.

Outros parâmetros de reação, tais como solvente, tempos de reação, temperaturas, etc., e meios de purificação de produtos, podem ser determinados caso a caso com base na informação publicada referente à derivação de proteínas com polímeros hidrossolúveis (veja-se as publicações citadas no presente documento).

Os polipéptidos descritos no presente documento podem ser produzidos através de qualquer método adequado conhecido na técnica. Tais métodos variam desde métodos de síntese direta de proteínas até à construção de uma sequência de ADN codificando sequências polipeptídicas isoladas e à expressão dessas sequências num hospedeiro transformado adequado. Por exemplo, pode ser obtido ADNc através de rastreio de uma biblioteca de ADN humano com um fragmento de ADN etiquetado codificando o polipéptido da SEQ ID NO: 1 e identificação de clones positivos através de autorradiografia. São realizadas rondas adicionais de purificação e hibridação de placas utilizando métodos convencionais.

Nalgumas formas de realização de um método recombinante, é construída uma sequência de ADN isolando ou sintetizando uma sequência de ADN codificando uma proteína de interesse de tipo

selvagem. Opcionalmente, a sequência pode ser mutagenizada através de mutagênese específica de sítio para proporcionar análogos funcionais da mesma. Veja-se, por exemplo Zoeller *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5662-5066 (1984) e o documento de patente U.S. N.º 4.588.585. Outro método de contruir uma sequência de ADN codificando um polipéptido de interesse seria através de síntese química utilizando um sintetizados de oligonucleótidos. Tais oligonucleótidos podem ser desenhados com base na sequência de aminoácidos do polipéptido desejado e selecionando os códons que são favorecidos na célula hospedeira nos quais será produzido o polipéptido recombinante de interesse.

Podem ser aplicados métodos padrão para sintetizar uma sequência polinucleotídica isolada codificando um polipéptido isolado de interesse. Por exemplo, pode ser utilizada uma sequência de aminoácidos completa para construir um gene traduzido inversamente. Além disso, pode ser sintetizado um oligómero de ADN contendo uma sequência nucleotídica codificando para o polipéptido isolado particular. Por exemplo, vários oligonucleótidos pequenos codificando para porções do polipéptido desejado podem ser sintetizados e posteriormente ligados. Os oligonucleótidos individuais contêm tipicamente saliências a 5' ou 3' para montagem complementar.

Uma vez montadas (através de síntese, mutagênese sítio-dirigida ou outro método), as sequências de ADN mutante codificando um polipéptido isolado particular de interesse serão inseridas num vetor de expressão e ligadas operativamente a uma sequência de controlo da expressão adequada para a expressão da proteína num hospedeiro desejado. Pode ser confirmada a montagem adequada através de sequenciação de nucleótidos, mapeamento de restrição, e expressão de um polipéptido biologicamente ativo num hospedeiro adequado. Tal como é bem conhecido na técnica, de forma a obter níveis elevados de expressão de um gene transfetado num hospedeiro,

o gene deve estar operativamente ligado a sequência de controlo da expressão transcricional e traducional que são funcionais no hospedeiro de expressão eleito.

Podem ser utilizados vetores de expressão recombinantes para amplificar e expressar o ADN codificando as fusões polipeptídicas de marcador de células estaminais cancerosas. Os vetores de expressão recombinantes são construções de ADN replicáveis que têm fragmentos de ADN sintético ou derivado de ADNc codificando uma fusão polipeptídica de marcador de células estaminais cancerosas ou um análogo bioequivalente ligado operativamente a elementos de regulação transcricionais ou traducionais derivados a partir de genes de mamíferos, micróbios, virais ou de insetos. Uma unidade transcricional compreende geralmente uma montagem de (1) um elemento ou elementos genético(s) tendo um papel regulador na expressão génica, por exemplo, promotores ou potenciadores transcricionais, (2) uma sequência estrutural ou codificante que é transcrita em ARNm e traduzida em proteínas. e (3) sequências de iniciação e terminação de transcrição e tradução adequadas, conforme descrito detalhadamente abaixo. Tais elementos de regulação podem incluir uma sequência de operador para controlar a transcrição. A capacidade de replicação num hospedeiro, habitualmente conferida por parte de uma origem de replicação, e um gene de seleção para facilitar o reconhecimento de transformantes podem adicionalmente ser incorporados. As regiões de ADN estão operativamente ligadas quando estão funcionalmente relacionadas entre si. Por exemplo, o ADN para um péptido de sinal (líder de secreção) está operativamente ligado ao ADN para um polipéptido se for expresso como um precursor que participa na secreção do polipéptido; um promotor está operativamente ligado a uma sequência codificadora se controla a transcrição da sequência; ou um sítio de ligação a ribossomas está operativamente ligado a uma sequência codificadora se está posicionado de forma a permitir a tradução. Geralmente, operativamente ligado

significa contíguo e, no caso de líderes de secreção, significa contíguo e em grelha de leitura. Elementos estruturais destinados à utilização em sistemas de expressão de leveduras podem incluir uma sequência líder permitindo a secreção extracelular da proteína traduzida por parte de uma célula hospedeira. Alternativamente, onde a proteína recombinante é expressa sem uma sequência líder ou de transporte, pode incluir um resíduo de metionina N-terminal. Este resíduo pode opcionalmente ser subsequentemente clivado a partir da proteína recombinante expressa para proporcionar um produto final.

A eleição da sequência de controlo da expressão e do vetor de expressão irá depender da eleição do hospedeiro. Pode ser empregue uma ampla variedade de combinações de hospedeiro/vetor de expressão. Vetores de expressão para hospedeiros eucarióticos, incluem, por exemplo, vetores compreendendo sequências de controlo da expressão a partir de SV40, papilomavírus bovino, adenovírus e citomegalovírus. Vetores de expressão úteis para hospedeiros bacterianos incluem plasmídeos bacterianos conhecidos, tais como plasmídeos a partir de *Escherichia coli*, incluindo pCR1, pBR322, pMB9 e os seus derivados, plasmídeos com gama de hospedeiros mais ampla, tais como M13 e fagos de ADN de cadeia simples filamentosa.

Células hospedeiras adequadas para a expressão de uma proteína marcadora de células estaminais cancerosas incluem procariotas, leveduras, insetos ou células eucarióticas superiores sob o controlo de promotores adequados. Procariotas incluem organismos gram-negativos ou gram-positivos, por exemplo *E. coli* ou bacilos. Células eucarióticas superiores incluem linhas celulares estabelecidas de origem mamífera conforme descrito abaixo. Poderiam também ser empregues sistemas de tradução isentos de células. São descritos vetores de expressão e clonagem adequados para utilização com hospedeiros celulares bacterianos, fúngicos, leveduras, e

mamíferos por Pouwels et al., *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y. (1985).

São também vantajosamente empregues vários sistemas de cultura celular de mamíferos ou de insetos para expressar proteínas recombinantes. A expressão de proteínas recombinantes em células de mamíferos pode ser levada a cabo devido a que tais proteínas estão geralmente corretamente dobradas, adequadamente modificadas e completamente funcionais. Exemplos de linhas celulares hospedeiras de mamíferos adequadas incluem as linhas COS-7 de células renais de macaco, descritas por Gluzman, *Cell* 23:175 (1981), e outras linhas celulares capazes de expressar um vetor adequado incluindo, por exemplo, células L, C127, 3T3, linhas celulares de ovário de hamster chinês (CHO), HeLa e BHK. Os vetores de expressão de mamíferos podem compreender elementos não transcritos tais como uma origem de replicação, um promotor e potenciador adequados ligados ao gene a ser expresso, e outras sequências não transcritas flanqueantes em 5' ou 3', e sequências não traduzidas em 5' ou 3', tais como sítios de ligação a ribossomas necessários, um sítio de poliadenilação, sítios de acetor e dador de união, e sequências de terminação transcricional. Sistemas de baculovírus para produção de proteínas heterólogas em células de insetos são revistos por Luckow e Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988).

As proteínas produzidas por um hospedeiro transformado podem ser purificadas de acordo com qualquer método adequado. Tais métodos padrão incluem cromatografia (por exemplo, permuta iónica, cromatografia de coluna por afinidade e tamanho), centrifugação, solubilidade diferencial, ou através de qualquer outra técnica padrão para a purificação de proteínas. Etiquetas de afinidade tais como a hexahistidina, domínio de ligação à maltose, sequência de revestimento da gripe e glutathione-S-transferase podem ser unidos à proteína para permitir purificação fácil através de passagem sobre uma coluna de afinidade adequada. As proteínas isoladas podem

também ser caracterizadas fisicamente utilizando técnicas tais como proteólise, ressonância magnética nuclear e cristalografia por raios X.

Por exemplo, os sobrenadantes a partir de sistemas que segregam proteínas recombinantes em meios de cultura podem ser primeiramente concentrados utilizando um filtro de concentração de proteínas comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Após a etapa de concentração, o concentrado pode ser aplicado a uma matriz de purificação adequada. Alternativamente, pode ser empregue uma resina de permuta aniônica, por exemplo, uma matriz ou substrato tendo grupos dietilaminoetil (DEAE) pendentes. As matrizes podem ser de acrilamida, agarose, dextrano, celulose ou outros tipos comumente empregues na purificação de proteínas. Alternativamente, pode ser empregue uma etapa de permuta catiónica. Permutadores catiónicos adequados incluem várias matrizes insolúveis compreendendo grupos sulfopropilo ou carboximetilo. Finalmente, podem ser empregues uma ou mais etapas de cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RP-HPLC) empregando meios de RP HPLC hidrofóbicos, por exemplo, gel de sílica tendo grupos metilo ou outros grupos alifáticos pendentes, para purificar adicionalmente uma composição de proteína de célula estaminal cancerosa-Fc. Algumas ou todas as etapas de purificação anteriores, em várias combinações, podem também ser empregues para proporcionar uma proteína recombinante homogênea.

A proteína recombinante produzida em cultura bacteriana é habitualmente isolada através de extração inicial a partir de sedimentos celulares, seguida de uma ou mais etapas de concentração, salificação, cromatografia de exclusão iônica aquosa ou de exclusão de tamanho. A cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) pode ser empregue para as etapas de purificação finais. As células microbianas empregues na expressão de uma proteína recombinante podem ser interrompidas

através de qualquer método conveniente, incluindo ciclos de congelamento e descongelamento, sonicação, interrupção mecânica, ou utilização de agentes de lise celular.

#### Inibição do Crescimento Celular Tumoral

São também descritos no presente documento métodos para inibir o crescimento de células tumorigênicas expressando um marcador de células estaminais cancerosas utilizando os antagonistas de um marcador de células estaminais cancerosas descrito no presente documento. O método de inibição do crescimento de células tumorigênicas expressando um marcador de células estaminais cancerosas pode compreender contatar a célula com um antagonista contra um marcador de células estaminais cancerosas *in vitro*. Por exemplo, uma linha celular imortalizada ou uma linha celular cancerosa que expressa um marcador de células estaminais cancerosas é cultivada em meio ao qual é adicionado um antagonista do marcador de células estaminais cancerosas expresso para inibir o crescimento celular. Alternativamente são isoladas células tumorais e/ou células estaminais tumorais a partir de uma mostra de um paciente tal como, por exemplo, uma biópsia de tecido efusão pleural, ou amostra de sangue e cultivadas em meio ao qual é adicionado um antagonista de um marcador de células estaminais cancerosas para inibir o crescimento celular. O antagonista pode ser uma fusão de proteínas marcadoras de células estaminais cancerosas que liga especificamente a uma proteína marcadora de células estaminais cancerosas ou proteína de ligação a marcador de células estaminais cancerosas (por exemplo recetor, co-recetor, ligando, ou co-ligando). Por exemplo, uma fusão de proteínas marcadoras de células estaminais cancerosas é adicionada ao meio de cultura de células estaminais cancerosas isoladas para inibir o crescimento celular.

Um método de inibir o crescimento de células tumorigênicas expressando um marcador de células estaminais cancerosas pode compreender contatar a célula com um antagonista contra um



marcador de células estaminais cancerosas *in vivo*. Contatar uma célula tumorigénica com um antagonista de um marcador de células estaminais cancerosas pode ser levado a cabo num modelo animal. Por exemplo, xenoenxertos expressando um marcador de células estaminais cancerosas crescem em ratinhos imunocomprometidos (por exemplo ratinhos NOD/SCID) aos quais é administrado um antagonista de um marcador de células estaminais cancerosas para inibir o crescimento tumoral. Alternativamente, são isoladas células estaminais cancerosas que expressam um marcador de células estaminais cancerosas a partir de uma amostra de um paciente tal como, por exemplo, uma biópsia de tecido efusão pleural, ou amostra de sangue e injetadas em ratinhos imunocomprometidos aos quais é então administrado um antagonista contra o marcador de células estaminais cancerosas para inibir o crescimento celular. O antagonista de um marcador de células estaminais cancerosas pode ser administrado ao mesmo tempo ou pouco depois da introdução de células tumorigénicas no animal para prevenir o crescimento tumoral. O antagonista de um marcador de células estaminais cancerosas pode ser administrado como uma terapêutica após as células tumorigénicas terem crescido até um tamanho especificado. O antagonista pode ser uma fusão de proteínas marcadoras de células estaminais cancerosas que liga especificamente a uma proteína marcadora de células estaminais cancerosas ou proteína de ligação a marcador de células estaminais cancerosas (por exemplo recetor, co-recetor, ligando, ou co-ligando). Contatar uma célula tumorigénica com um antagonista de um marcador de células estaminais cancerosas pode ser levado a cabo num paciente humano diagnosticado com cancro.

#### Composições Farmacêuticas

Composições farmacêuticas compreendendo antagonistas que visam um marcador de células estaminais cancerosas têm utilidade na inibição do crescimento celular tumoral e no tratamento do cancro em pacientes humanos.

São preparadas formulações para armazenamento e utilização combinando um antagonista purificado (por exemplo anticorpo) da presente invenção com um portador, excipiente, e/ou estabilizador farmacêuticamente aceitável como um pó liofilizado estéril, solução aquosa, etc (Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª Edição, Mack Publishing (2000)). Portadores, excipientes, ou estabilizadores adequados compreendem tampões não tóxicos tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; sais tais como cloreto de sódio; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (por exemplo como cloreto de octadecildimetilbenzilamónio; cloreto de hexametónio; cloreto de benzalcónio; cloreto de benzetónio; fenol, butilo ou álcool benzílico; parabenos de alquilo, tais como parabeno de metilo ou propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptidos de baixa massa molecular (tais como menos de cerca de 10 resíduos de aminoácidos); proteínas tais como albumina sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; hidratos de carbono tais como monossacarídeos, dissacarídeos, glucose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íões formadores de sais tais como sódio; complexos metálicos (por exemplos, complexos Zn-proteína); e/ou tensioativos não iónicos tais como TWEEN ou polietilenoglicol (PEG).

A composição farmacêutica da presente invenção pode ser administrada em qualquer número de formas para tratamento tanto local como sistémico. A administração pode ser tópica (tal como a membranas mucosas incluindo administração vaginal e retal) tal como adesivos transdérmicos, pomadas, loções, cremes, géis, gotas, supositórios, pulverizações, líquidos e pós; pulmonar (por exemplo, através de inalação ou insuflação de pós ou aerossóis, incluindo através de nebulizador; intratraqueal,

intranasal, epidérmica ou transdérmica); oral; ou parentérica incluindo injeção ou infusão intravenosa, intra-arterial, subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular; ou administração intracraniana (por exemplo, intratecal ou intraventricular).

A formulação terapêutica pode estar em forma de dosagem unitária. Tais formulações incluem comprimidos, pílulas, cápsulas, pós, grânulos, soluções ou suspensões em água ou meios não aquosos, ou supositórios para administração oral, parentérica, ou retal ou para administração através de inalação. Em composições sólidas tais como comprimidos o ingrediente ativo principal é misturado com um portador farmacêutico. Ingredientes de fabricação de comprimidos convencionais incluem amido de milho, lactose, sacarose, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio, fosfato de dicálcio ou gomas, e outros diluentes (por exemplo água) para formar uma composição de pré-formulação sólida contendo uma mistura homogênea de um composto da presente invenção, ou um sal farmaceuticamente aceitável não tóxico do mesmo. A composição de pré-formulação sólida da mesma é então subdividida em formas de dosagem unitária do tipo descrito acima. Os comprimidos, pílulas, etc da composição inovadora podem ser revestidos ou de outro modo compostos para proporcionar uma forma farmacêutica que propicia a vantagem de ação prolongada. Por exemplo, o comprimido ou pílula pode compreender uma composição interna revestida por um componente externo. Além disso, os dois componentes podem ser separados através de uma camada entérica que serve para resistir à desintegração e permite que o componente interno passe intacto através do estômago ou que se atrase a sua libertação. Uma variedade de materiais pode ser utilizada para tais camadas entéricas ou revestimentos, tais materiais incluindo um número de ácidos poliméricos e misturas de ácidos poliméricos com tais materiais como goma-laca, álcool cetílico e acetato de celulose.

Formulações farmacêuticas incluem antagonistas da presente invenção complexados com lipossomas (Epstein, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); e documentos de patente U.S. N.ºs 4.485.045 e 4.544.545). Lipossomas com tempo de circulação potenciado são divulgados no documento de patente U.S. N.º 5.013.556. Os lipossomas podem ser gerados através da evaporação de fase reversa com uma composição lipídica compreendendo fosfatidilcolina, colesterol, e fosfatidiletanolamina (PEG-PE) derivada de PGB. Os lipossomas são extrudidos através de filtros de tamanho de poro definido para proporcionar lipossomas com o diâmetro desejado.

O antagonista pode também estar aprisionado em microcápsulas. Tais microcápsulas são preparadas, por exemplo, através de técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou de gelatina e microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de distribuição de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microsferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões conforme descrito em Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª Ed. Mack Publishing (2000).

Adicionalmente podem ser preparadas preparações de libertação prolongada. Exemplos adequados de preparações de libertação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo, cujas matrizes estão sob a forma de artigos moldados (por exemplo películas, ou microcápsulas). Exemplos de matrizes de libertação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis tais como poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) ou álcool polivinílico, poliláctidos (documento de patente U.S. N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e 7 etil-L-glutamato, vinilo acetato de etileno não degradável, copolímeros degradáveis de ácido glicólico-ácido láctico tais como o LUPRON DEPOT™

(microesferas injetáveis compostas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), isobutirato de acetato de sacarose, e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Tratamento com Antagonistas

É previsto que os antagonistas da presente invenção possam ser utilizados para tratar várias condições caracterizadas pela expressão e/ou responsividade aumentada de células a um marcador de células estaminais cancerosas. É particularmente previsto que os antagonistas (por exemplo anticorpos) contra um marcador de células estaminais cancerosas sejam utilizados para tratar distúrbios proliferativos incluindo mas não limitados a tumores benignos ou malignos do rim, fígado, bexiga, mama, estômago, ovário, cólon, reto, próstata, pulmão, vulva, tiroide, cabeça e pescoço, cérebro (glioblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, etc.), sangue e linfa (leucemias e linfomas).

Os antagonistas são administrados como uma composição farmacêutica adequada a um paciente humano de acordo com métodos conhecidos. Métodos de administração adequados incluem administração por via intravenosa como um bolus ou através de infusão contínua durante um período de tempo incluem, mas não estão limitados a vias intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intracerebrospinal, subcutânea, intra-articular, intrassinovial, intratecal, oral, tópica, ou por inalação.

Em certas formas de realização, o tratamento envolve a administração combinada de um antagonista da presente invenção e um agente quimioterapêutico ou *cocktail* de múltiplos agentes quimioterapêuticos diferentes. O tratamento com um antagonista pode ocorrer anteriormente a, simultaneamente com, ou subsequentemente à administração de quimioterapias. Quimioterapias contempladas pela invenção incluem substâncias químicas ou fármacos que são conhecidos na técnica e estão comercialmente disponíveis, tais como Doxorubicina, 5-Fluorouracilo; Arabinósido de citosina ("Ara-C"),

Ciclofosfamida, Tiotepa, Bussulfan, Citoxina, Taxol, Metotrexato, Cisplatina, Melfalan, Vimblastina e Carboplatina. A administração combinada pode incluir coadministração, tanto numa formulação farmacêutica única ou utilizando formulações separadas, ou administração consecutiva em qualquer ordem mas preferentemente num período de tempo tal que todos os agentes ativos possam exercer as suas atividades biológicas simultaneamente. A preparação e os regimes de dosagem para tais agentes quimioterapêuticos podem ser utilizados de acordo com as instruções do fabricante ou conforme determinado empiricamente por parte do perito na especialidade. São também descritos a preparação e os regimes de dosagem para tal quimioterapia em *Chemotherapy Service*, M.C. Perry, ed., Williams e Wilkins, Baltimore, MD (1992).

Em certas formas de realização, o tratamento envolve a administração combinada de um antagonista da presente invenção e terapêutica de radiação. O tratamento com um antagonista pode ocorrer anteriormente a, simultaneamente com, ou subsequentemente à administração de terapêutica de radiação. Quaisquer regimes de dosagem para tal terapêutica de radiação podem ser utilizados conforme determinado por parte do perito na especialidade.

Em certas formas de realização, o tratamento pode envolver a administração combinada de antagonistas da presente invenção com anticorpos contra antigénios associados com tumores adicionais incluindo, mas não limitados a, anticorpos que ligam a EFGR, HER2, e VEGF. Além disso, o tratamento pode incluir administração de uma ou mais citocinas, pode ser acompanhado por remoção cirúrgica de células cancerosas ou qualquer outra terapia considerada necessária por parte de um médico assistente.

Para o tratamento da doença, a dosagem adequada de um antagonista da presente invenção depende do tipo de doença a ser tratada, da gravidade e curso da doença, da responsividade da doença, se o antagonista é administrado para fins

terapêuticos ou preventivos, terapêutica prévia, historial clínico do paciente, e assim por diante totalmente à descrição do médico assistente. O antagonista pode ser administrado uma vez ou durante uma série de tratamentos durando desde vários dias até vários meses, ou até ser efetuada uma cura ou alcançada uma diminuição do estado da doença (por exemplo redução do tamanho tumoral). Podem ser calculados regimes de dosagem ótima a partir de medidas de acumulação do fármaco no corpo do paciente e variarão dependendo da potência relativa de um antagonista individual. O médico administrador pode facilmente determinar as dosagens ótimas, metodologias de dosagem e taxas de repetição. Em geral, a dosagem é desde 0,01µg até 100 mg por quilo de peso corporal, e pode ser administrada uma vez ou mais por dia, por semana, por mês ou por ano. O médico assistente pode estimar as taxas de repetição para a dosagem com base nos tempos de residência e nas concentrações do fármaco medidos nos fluidos ou tecidos corporais.

#### *Kits*

Podem ser utilizados *kits* para levar a cabo os métodos descritos no presente documento. Um *kit* pode compreender um recetor solúvel de marcador de células estaminais cancerosas num ou mais recipientes. Os *kits* podem conter todos os componentes necessários e/ou suficientes para realizar um ensaio de deteção, incluindo todos os controlos, direções para elaborar ensaios, e qualquer *software* necessário para análise e apresentação de resultados.

É descrito um *kit* de compartimento no qual os reagentes se encontram contidos em recipientes separados. Tais recipientes permitem que os reagentes sejam transferidos de um compartimento a outro compartimento de tal forma que as amostras e reagentes não se contaminam cruzadamente, e os agentes ou soluções de cada recipiente podem ser adicionados de uma forma quantitativa de um compartimento a outro. Tais recipientes incluirão um recipiente que aceitará a amostra de teste, um recipiente que contém o recetor solúvel utilizado nos

métodos, recipientes que contêm reagentes de lavagem (tais como solução salina de tampão fosfato, tampões Tris, etc.), e recipientes que contêm os reagentes utilizados para detectar o anticorpo ou sonda ligado. Um perito na especialidade reconhecerá prontamente que os polinucleótidos, polipéptidos e anticorpos divulgados podem ser prontamente incorporados num dos formatos de *kit* estabelecidos que são bem conhecidos na técnica.

#### EXEMPLOS

##### Exemplo 1

##### Produção de Proteínas Recetoras Solúveis FZD Fc e Determinação da Semivida *In Vivo*

Versões solúveis do domínio extracelular N-terminal (ECD) dos recetores FZD humanos ligam a ligandos Wnt e atuam como antagonistas da sinalização pela via Wnt (He *et al.*, (1997) *Science* 275:1652-54; Tanaka *et al.*, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:10164-69; Holmen *et al.*, (2002) *JBC* 277:34727-35; Vincan *et al.*, (2005) *Differentiation* 73:142-53). Os recetores FZD solúveis foram gerados ligando 1) o ECD ou 2) o domínio Fri de FZD10, FZD7, FZD5, FZD4, ou FZD8 em grelha a Fc de IgG<sub>1</sub> humana isolada a partir de uma biblioteca de células B humanas (SEQ ID NO: 4) num vetor para expressão em células de insetos e células HEK 293. Foi utilizada tecnologia de ADN recombinante padrão para isolar polinucleótidos codificando ECDs de recetor FZD incluindo: aminoácidos aproximadamente 21 a 227 de FZD10 (FZD10 ECD.Fc); aminoácidos aproximadamente 32 a 255 de FZD7 (FZD7 ECD.Fc); aminoácidos aproximadamente 27 a 233 de FZD5 (FZD5 ECD.Fc); e aminoácidos aproximadamente 237 a 224 de FZD4 (FZD4 ECD.Fc) bem como domínios de recetor FZD incluindo: aminoácidos aproximadamente 21 a 154 de FZD10 (FZD10 ECD.Fc); aminoácidos aproximadamente 32 a 171 de FZD7 (FZD7 ECD.Fc); aminoácidos aproximadamente 27 a 157 de FZD5 (FZD5 ECD.Fc); aminoácidos aproximadamente 37 a 170 de FZD4 (FZD4 ECD.Fc); e aminoácidos aproximadamente 28 a 158 de FZD8 (FZD8 ECD.Fc); As proteínas recetoras solúveis foram purificadas sobre uma



coluna de proteína A.

Para determinar a semivida dos recetores FZD solúveis, foram realizadas experiências *in vivo*. Especificamente, foram administrados 200 ug de FZD4 Fri.Fc, FZD8 Fri.Fc, FZD5 Fri.Fc, e FZD5 ECD.Fc purificados, por via i.p. a ratinhos (n=3) e foram obtidas amostras de sangue em pontos de tempo indicados (Fig. 1). Foram separadas proteínas séricas retidas em esferas de agarose de Proteína A num gel SDS-PAGE, transferidas a membrana de nitrocelulose, e sondadas com HRP conjugado com fragmento Fc de IgG anti-humana de cabra para detetar as proteínas de fusão. FZD4 Fri.Fc, FZD5 Fri.Fc, e FZD8 Fri.Fc estão presentes no soro sanguíneo 72 horas após a injeção, e FZD5 Fri.Fc and FZD8 Fri.Fc estão presentes no soro sanguíneo 96 horas após a injeção (Fig. 1). Em contraste, FZD5 ECD.Fc não é detetável após 24 horas (Fig. 1).

#### Exemplo 2

Ensaio *In Vitro* para Avaliar a Proteína Recetora Solúvel FZD Fc

Este exemplo descreve métodos para ensaios *in vitro* para testar a atividade do recetor FZD Fc na proliferação celular e ativação de vias.

#### Ensaio de Proliferação

A expressão de um recetor FZD por parte de diferentes linhas celulares cancerosas é quantificada utilizando análise Taqman. Linhas celulares identificadas como expressando um recetor FZD são colocadas em placas a uma densidade de  $10^4$  células por poço em microplacas de cultura tecidual de 96 poços e deixadas disseminar durante 24 horas. Subsequentemente as células são cultivadas durante 12 horas adicionais em DMEM fresco com FCS a 2% em cujo momento é adicionada proteína recetora FZD Fc frente a proteína controlo ao meio de cultura em presença de BrdU a 10  $\mu\text{mol/l}$ . Após etiquetagem com BrdU, o meio de cultura é removido, e as células são fixadas à temperatura ambiente durante 3 min em etanol e deixadas reagir com anticorpo anti-BrdU monoclonal conjugado com peroxidase

(clone BMG 6H8, fragmentos Fab). O substrato é desenvolvido numa solução contendo tetrametilbenzidina e interrompido após 15 min com 25  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 1 mol/l. É medida a cor da reação com um leitor de placa ELISA automático utilizando um filtro de 450 nm (UV Microplate Reader; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Todas as experiências são realizadas em triplicado. É determinada a capacidade da proteína recetora solúvel FZD Fc de inibir a proliferação celular comparada.

#### Ensaio de Ativação de Vias

É determinada a capacidade da proteína recetora FZD Fc solúvel de bloquear a ativação da via de sinalização por Wnt *in vitro*. Numa forma de realização, células HEK 293 cultivadas em DMEM suplementado com antibióticos e FCS a 10% são cotransfetadas com 1) vetores de expressão de Wnt7B e FZD10 para ativar a via de sinalização por Wnt; 2) um vetor repórter de tipo selvagem ou mutante contendo três cópias do domínio de ligação a TCF a montante de um gene repórter de luciferase de pirilampo para medir os níveis de sinalização de Wnt canónicos (Gazit *et al.*, 1999, Oncogene 18:5959-66); e 3) em repórter de luciferase de *Renilla* (Promega; Madison, WI) como um controlo interno para a eficácia da transfeção. É então adicionada proteína FZD Fc ao meio de cultura celular. Quarenta e oito horas após a transfeção, são medidos os níveis de luciferase utilizando um *kit* de ensaio de luciferase duplo (Promega; Madison, WI) com a atividade luciferase de pirilampo normalizada a atividade luciferase de *Renilla*. Três experiências independentes são realizadas em triplicado. A capacidade da proteína FZD10 Fc solúvel de inibir a ativação da via Wnt é como tal determinada.

Nalgumas formas de realização, quantidades crescentes de proteínas de fusão FZD Fc foram incubadas com células L em presença ou ausência de ligando Wnt3a e a estabilização da  $\beta$ -catenina induzida por Wnt3a foi determinada através de imunotransferência. Somente em presença de Wnt3a foi detetável a  $\beta$ -catenina, e esta estabilização foi bloqueada através do

aumento dos níveis de proteína recetora solúvel FZD5 ECD.Fc, FZD8 Fri.Fc e FZD4 Fri.Fc (Fig. 2) demonstrando que as proteínas recetoras solúveis FZD Fc antagonizam a sinalização pela via Wnt ativada através do ligando Wnt3a.

A capacidade das proteínas de fusão FZD:Fc de antagonizar a sinalização por parte de diferentes ligandos Wnt foi então determinada. Foram incubadas células HEK 293 estavelmente transferidas com repórter 8xTCF-luciferase com quantidades crescentes de recetores solúveis FZD Fri.Fc em presença de diferentes ligandos Wnt incluindo Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a e Wnt7b. As proteínas de fusão FZD4 Fri.Fc, FZD5 Fri.Fc e FZD8 Fri.Fc inibiram a sinalização por Wnt mediada pelos 5 ligandos Wnt (Fig. 3).

#### Exemplo 3

##### Prevenção *In Vivo* do Crescimento Tumoral Utilizando Proteínas Recetoras Solúveis FZD Fc

Este exemplo descreve a utilização de um recetor solúvel FZD Fc para prevenir o crescimento tumoral num modelo de xenoenxerto.

As células tumorais a partir de uma amostra de paciente (biópsia de tumor sólido ou efusão pleural) que foram passadas como um xenoenxerto em ratinhos foram preparadas para repassagem em animais experimentais conforme descrito detalhadamente acima. Foram então injetadas células tumorais dissociadas (<10.000 células por animal; n=10) por via subcutânea nos corpos adiposos de ratinhos NOD/SCID para estimular o crescimento tumoral.

Em certas formas de realização, as células tumorais dissociadas são primeiramente classificadas em células tumorigénicas e não tumorigénicas com base nos marcadores de superfície celular anteriormente à injeção em animais experimentais. Especificamente, as células tumorais dissociadas conforme descritas acima são lavadas duas vezes com solução salina de tampão Hepes (HBSS) contendo soro fetal bovino (HICS) inativado por calor a 2% e ressuspensas a  $10^6$

células por 100  $\mu$ l. São adicionados anticorpos e as células incubadas durante 20 min sobre gelo seguido por duas lavagens com HBSS/HICS a 2%. Os anticorpos incluem anti-ESA (Biomeda, Foster City, CA), anti-CD44, anti-CD24, e os marcadores de linhagem anti-CD2, -CD3, -CD10, -CD16, -CD18, -CD31, -CD64, e -CD140b (coletivamente referidos como Lin; PharMingen, San Jose, CA). Os anticorpos são diretamente conjugados com fluorocromos para selecionar positivamente ou negativamente células expressando estes marcadores. As células de ratinho são eliminadas através de seleção frente a células H2Kd+, e as células mortas são eliminadas utilizando o corante de viabilidade 7AAD. É levada a cabo citometria de fluxo num FACSVantage (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). São utilizados perfis de dispersão lateral e dispersão frontal para eliminar os aglomerados. Células tumorigénicas Lin<sup>-</sup> ESA<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>-</sup>/baixo, Lin<sup>-</sup> isoladas são então injetadas por via subcutânea nos corpos adiposos mamários para tumores de mama ou no flanco para tumores não de mama de ratinhos NOD/SCID para estimular o crescimento tumoral.

Em certas formas de realização, dois dias após a injeção de células tumorais, os animais foram tratados com recetor solúvel FZD7 ECD.Fc, recetor solúvel FZD10 ECD.Fc, ou recetor solúvel FZD5 ECD.Fc. Cada animal injetado para teste recebeu proteína FZD4 ECD.Fc, FZD5 ECD.Fc or FZD10 ECD.Fc a 10 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.) 2-3x por semana durante um total de 4 semanas. Os animais injetados para controlo receberam injeção 2x por semana durante um total de 4 semanas. O tamanho tumoral foi avaliado nos dias 21, 24, 28, e 30. O tratamento tanto com FZD10 ECD.Fc como com FZD7 ECD.Fc solúveis reduziu o volume tumoral total em comparação com animais tratados com controlo (Fig. 4). A redução do volume tumoral através de FZD7 ECD.Fc foi estatisticamente significativa no dia 28 e dia 30 (Fig. 4).

A seguir é avaliado o efeito do tratamento com recetor solúvel FZD Fc em presença de células estaminais cancerosas num

tumor. Amostras de tumor a partir de ratinhos tratados com FZD Fc frente a controlo são cortadas em pedaços pequenos, picados completamente utilizando lâminas estéreis, e foram obtidas suspensões de célula única através de digestão enzimática e interrupção mecânica. As células tumorais dissociadas são então analisadas através de análise FACS para a presença de células estaminais cancerosas tumorigénicas com base na expressão dos marcadores de superfície celular ESA+, CD44+, CD24-/baixo, Lin- conforme descrito detalhadamente acima.

A tumorigenicidade das células isoladas com base na expressão de ESA+, CD44+, CD24-/baixo, Lin- após tratamento com FZD Fd pode então ser avaliada. São reinjetadas 5.000, 1.000, 500, células Lin ESA+, CD44+, CD24-/baixo, Lin- a partir de ratinhos tratados com FZD Fc frente a controlo por via subcutânea nos corpos adiposos de ratinhos NOD/SCID. É então determinada a tumorigenicidade das células estaminais cancerosas com base no número de células injetadas requeridas para formação tumoral consistente.

Em certas formas de realização, foram injetadas a ratinhos de duplo *knockout rag-2/cadeia γ* fêmea de 5-7 semanas de idade 50.000 células derivadas de tumor de vírus de tumor da mama (MMTV)-WNT1 no corpo adiposo mamário superior direito. Ratinhos (MMTV)-Wnt-1 transgênicos exibem etapas discretas de tumorigénese mamária, incluindo hiperplasia, carcinoma dutal invasivo, e metástases distantes, e como tal este modelo de ratinho de cancro da mama proporciona uma ferramenta única para analisar o papel dos Wnts na formação e crescimento tumoral (Nusse e Varmus (1982) Cell 31:99-109). Os tumores a partir destes ratinhos foram dissociados e estas células tumorais dissociadas utilizadas para fins de propagação tumoral. Ratinhos com células tumorais implantadas no corpo adiposo mamário foram tratados 5x por semana com PBS a 200 ul (n=10) ou recetor solúvel FZD8 Fri.Fc (10mg/kg) diluído em PBS. Uma vez os tumores foram palpáveis, os tamanhos tumorais foram medidos duas vezes por semana. O tratamento com recetor solúvel

FZD8 Fri.Fc reduziu dramaticamente o crescimento de tumores em comparação com o tratamento controle com PBS (Fig. 5).

Para testar uma vez mais a capacidade dos recetores solúveis FZD de inibir o crescimento tumoral, ratinhos NOD/SCID foram injetados com 50.000 células de tumor da mama PE13. Um dia após a injeção celular, foram injetados 200 ul de recetor solúvel FZD8 Fri.Fc diluído em PBS por via i.p. a 10 mg/kg ou foi injetado PBS a 200 ul e o tratamento foi continuado 5 vezes por semana (n=10 por grupo experimental). O crescimento tumoral foi monitorizado semanalmente até ser detetado crescimento, e posteriormente o tamanho tumoral foi medido duas vezes por semana. O tratamento de animais com FZD8 Fri.Fc reduziu significativamente o crescimento celular de tumores da mama em comparação com os controlos injetados com PBS (Fig. 6).

#### Exemplo 4

Tratamento *In Vivo* do Crescimento Tumoral Utilizando Proteínas Recetoras Solúveis FZD Fc

Este exemplo descreve a utilização de um recetor solúvel FZD Fc para tratar tumores num modelo de xenoenxerto.

Em certas formas de realização, 50.000 células derivadas a partir de tumor da mama MMTV Wnt1 em Matrigel foram implantadas por via subcutânea em ratinhos de duplo *knockout rag-2/cadeia  $\gamma$*  fêmea de 5-7 semanas de idade. No dia dezanove, ratinhos com tumores foram aleatoriamente atribuídos a grupos com um volume tumoral médio de 65mm<sup>3</sup>, e no dia vinte e seis, foi iniciado tratamento com proteínas de fusão FZD8 Fri.Fc ou FZD5 Fri.Fc. Especificamente, foi administrada proteína de fusão FZD8 Fri.Fc a concentrações crescentes (5 mg/kg, 10 mg/kg, e 30 mg/kg), e FZD5 Fri.Fc foi administrado a 10 mg/kg. Os animais de controlo foram tratados com PBS.

Foi observada uma atividade antitumoral dependente de dose da proteína de fusão FZD8 Fri.Fc (Fig. 7). À dose mínima - 5 mg/kg - FZD8 Fri.Fc reduziu o crescimento de tumores relativamente a ratinhos tratados com PBS, mas os regimes de tratamento com FZD8 Fri.Fc a 10mg/kg e 30mg/kg foram

significativamente mais eficazes na redução do tamanho dos tumores pré-estabelecidos. Em contraste, FZD5 Fri.Fc não mostrou efeitos anti tumorais em tumores da mama estabelecidos que requerem Wnt1 para o crescimento.

#### Exemplo 5

##### Tratamento *In Vivo* de Tumores Utilizando Proteínas Recetoras Solúveis FZD Fc

Este exemplo descreve a utilização de um recetor solúvel FZD Fc para tratar tumores num modelo de xenoenxerto.

As células tumorais a partir de uma amostra de paciente (biópsia de tumor sólido ou efusão pleural) que foram passadas como um xenoenxerto em ratinhos são preparadas para repassagem em animais experimentais. O tecido tumoral é removido, cortado em pequenos pedaços, picado completamente utilizando lâminas estéreis, e são obtidas suspensões de célula única através de digestão enzimática e interrupção mecânica. As células tumorais dissociadas são então injetadas por via subcutânea nos corpos adiposos mamários para tumores de mama ou no flanco para tumores não de mama de ratinhos NOD/SCID para estimular o crescimento tumoral. Alternativamente, células tumorais ESA+, CD44+, CD24-/baixo Lin- tumorigénicas são isoladas conforme descrito detalhadamente acima e injetadas.

Após a injeção de células tumorais, os animais são monitorizados para o crescimento tumoral. Uma vez os tumores alcançam um tamanho médio de aproximadamente 150 a 200 mm, é iniciado o tratamento com proteína FZD Fc. Cada animal recebe FZD Fc ou proteína controlo a 10 mg/kg por via i.p. duas a cinco vezes por semana durante um total de 6 semanas. O tamanho tumoral é avaliado duas vezes por semana durante estas 6 semanas. É como tal determinada a capacidade de FZD Fc de prevenir crescimento tumoral adicional ou de reduzir o tamanho tumoral em comparação com anticorpos controlo.

#### Exemplo 6

##### Tratamento do Cancro Humano Utilizando Proteínas Recetoras Solúveis FZD Fc

Este exemplo descreve métodos para tratar o cancro utilizando um recetor solúvel FZD Fc para visar tumores compreendendo células estaminais cancerosas e/ou células tumorais nas quais foi detetada expressão do recetor FZD.

A presença de expressão de marcadores de células estaminais cancerosas pode ser primeiramente determinada a partir de uma biópsia tumoral. São removidas células tumorais de uma biópsia a partir de um paciente diagnosticado com cancro sob condições estéreis. Numa forma de realização a biópsia tecidual é congelado fresco em azoto líquido, incorporado em O.C.T., e cortado num criostato em seções de 10 um em lâminas de vidro. Alternativamente a biópsia tecidual é fixada em formalina, incorporada em parafina, e cortada num micrótomo em seções de 10 um em lâminas de vidro. As seções são incubadas com anticorpos contra um recetor FZD para detetar expressão proteica. Adicionalmente, pode ser determinada a presença de células estaminais cancerosas. Amostras de biópsia tecidual são cortadas em pedaços pequenos, picadas completamente utilizando lâminas estéreis, e as células são submetidas a digestão enzimática e interrupção mecânica para obter uma suspensão de célula única. As células tumorais dissociadas são então incubadas com anticorpos anti-ESA, -CD44, -CD24, -Lin, e -FZD para detetar células estaminais cancerosas, e a presença de células estaminais tumorais ESA+, CD44+, CD24-/baixo, Lin-, FZD+ é determinada através de citometria de fluxo conforme descrito detalhadamente acima.

Pacientes de cancro cujos tumores são diagnosticados com células estaminais cancerosas são tratados com um recetor solúvel FZD:Fc. É purificada proteína de fusão FZD Fc humana gerada conforme descrito acima e formulada com um portador farmacêutico adequado em PBS para injeção. Os pacientes são tratados com FZD Fc preferentemente uma vez por semana durante pelo menos 10 semanas, mas mais preferentemente uma vez por semana durante pelo menos 14 semanas. Cada administração de FZD Fc deve ser uma dose farmacêuticamente eficaz de cerca de 2 até



cerca de 100 mg/ml ou cerca de 5 até cerca de 40 mg/ml. FZD Fc pode ser administrado anteriormente a, simultaneamente com, ou após regimes de radioterapia padrão ou regimes de quimioterapia utilizando um ou mais agentes quimioterapêuticos, tais como oxaliplatina, fluorouracilo, leucovorina, ou estreptozocina. Os pacientes são monitorizados para determinar se tal tratamento resultou numa resposta antitumoral, por exemplo, com base na regressão tumoral, redução das incidências de novos tumores, menor expressão de antigénio tumoral, diminuição dos números de células estaminais cancerosas, ou outros meios de avaliar o prognóstico da doença.

SEQ ID NO: 1

Domínio extracelular N-terminal FZD10

MQRPGPRLWLVLQVMGSCAAJSSMDMERPGDGKCKQPIEIPMCKDIGYNMTRMPNLMGHENQREBA  
AIQLHEFAPLVEYGCHGHLRFFLCSLYAPMCTEQVSTPIPACRVMCEQARLKCSPIMEQFNTKWPD  
SLDCRKLPNKNDPNYLCMEAPNNGSDEPTRGSGLPPLFRPQRPHSAQEHPLKDGGPGRGGCDNP  
GKFHHVEKSASCAPLCTPGVDVYWSREDKRFA

SEQ ID NO: 2

Domínio extracelular N-terminal FZD7

MRDPGAAAPLSSSLGLCÁLVLALLGALSAGAGAPQYHGBKGISVPDHGFCQFISIPLCTDIAYNQTL  
PNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFLCSMYAPVCTVLDQAIPPCRS LCERARQGCEA  
LMNKFQGWPERLRCENFPVHGAGEICVQGNTSDGSGGGPGGPTAYPTAPYLPDLPTALPPGASD  
GRGRPAFFFSRQLKVPYLYGYRFLGERDCGAPCEPGRANGLMYFKBEERRFARL

SEQ ID NO: 3

Domínio extracelular N-terminal FZD5

MARPDPSAPPSLLLLLLAQLVGRAAAASKAPVCQETVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQDEAGL  
EVHQFWPLVEIQSPDLRFFLCSMYTPICLPDYHKPLPPCRSV CERAKAGCSPLMRQYGF A WPERM  
SCDRLPVLGRDAEVL CMDYNRSEATTAPRPFPAKPTLP GPPGAPASGGECFAGGPFVCKCREPFV  
PILKESHPLYNKVRTGQVPNCAVPCYQPSFSADERT

SEQ ID NO: 4 Fc de IgG<sub>1</sub> humana

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN  
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
QQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 5

Domínio extracelular N-terminal FZD6

MEMFTFLLTCIFLPLLRGHS LFTCEPITVPRCMKMAYNMTFFPNLMGHYDQSI AAVEMEHLPLAN  
LECSNFIETFLCKAFVPTCIBQIHVVPCKRLCEKVYSDCKKLIDTFGIRWP EELECDRLQYCD ETVP  
VTFDPHTEFLGPQKKTEQVQRDIGFWCPRHLKTS GGQGYKFLGIDQCAPP CPNM YFKSDELEFAKS  
FIGTVSI

EP2500360B1

SEQ ID NO: 6

Domínio extracelular N-terminal FZD

MLAMAWRGAGPSVPGAPGGVGLSLGLLLQLLLLLGPARGFGDEEBERRCDPIRISMCCQNLGYNVTK  
MPNLVGHELQTD AELQLTTFTPLIQYGCSSQLQFFLCVYVPMCTEKNIPGPGGMCLSVKRRCE  
PVLKEFGFAWPESLNCSEKFPQNDHNHMCMEGPGDEEVLPFKTPIQPGEECHSVGTNSDQYTWV  
KRSLNLCVLCGYDAGLYSRSAKEFTDI

SEQ ID NO:7 domínio FZD8 Fri

MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGAAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDE  
AGLEVHQFWPLVEIQSPDLKFFLCSEMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAWP  
DRMRCDRLPEQGNPD TLCMDYNRTDLTT

SEQ ID NO: 8 domínio FZD4 Fri

MLAMAWRGAGPSVPGAPGGVGLSLGLLLQLLLLLGPARGFGDEEBERRCDPIRISMCCQNLGYNVTK  
MPNLVGHELQTD AELQLTTFTPLIQYGCSSQLQFFLCVYVPMCTEKNIPGPGGMCLSVKRRCE  
PVLKEFGFAWPESLNCSEKFPQNDHNHMCMEGPGDEEV

SEQ ID NO: 9 domínio FZD5 Fri

MARPDPSAPPSLLLLLAQLVGRAAAASKAPVCQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQDEBAGL  
EVHQFWPLVEIQSPDLRFFLCSEMYTPICLPDYHKPLPPCRSVCERAKAGCSPLMRQYGFAWPERM  
SCDRLPVLGRDAEVL CMDYNRSEATT

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> OncoMed Pharmaceuticals, Inc.

<120> Composições e Métodos para Diagnóstico e Tratamento do  
Câncer

<130> HMK/FP6810626

<140> EP

<141> 31-10-2006

<150> EP 07752161.5

<151> 31-10-2006

<150> PCT/US2007/005443

<151> 31-10-2006

<150> 60/812.966

<151> 13-06-2006

EP2500360B1

<150> 60/731.468

<151> 13-06-2006

<160>9

<170> PatentIn versão 3.3

<210>1

<211> 227

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio extracelular N-terminal FZD10 humano

<400>1

Met Gln Arg Pro Gly Pro Arg Leu Trp Leu Val Leu Gln Val Met Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Cys Ala Ala Ile Ser Ser Met Asp Met Glu Arg Pro Gly Asp Gly  
 20 25 30  
 Lys Cys Gln Pro Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr Asn  
 35 40 45  
 Met Thr Arg Met Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu Ala  
 50 55 60  
 Ala Ile Gln Leu His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys His  
 65 70 75 80  
 Gly His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr  
 85 90 95  
 Glu Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu Gln  
 100 105 110  
 Ala Arg Leu Lys Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Lys Trp  
 115 120 125  
 Pro Asp Ser Leu Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro Asn  
 130 135 140  
 Tyr Leu Cys Met Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser Asp Glu Pro Thr Arg  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Gly Leu Phe Pro Pro Leu Phe Arg Pro Gln Arg Pro His Ser  
 165 170 175  
 Ala Gln Glu His Pro Leu Lys Asp Gly Gly Pro Gly Arg Gly Gly Cys  
 180 185 190  
 Asp Asn Pro Gly Lys Phe His His Val Glu Lys Ser Ala Ser Cys Ala  
 195 200 205  
 Pro Leu Cys Thr Pro Gly Val Asp Val Tyr Trp Ser Arg Glu Asp Lys  
 210 215 220  
 Arg Phe Ala  
 225

EP2500360B1

<210>2

<211> 255

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio extracelular N-terminal FZD7 humano

<400>2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly Ser Gly Gly Pro Gly Gly Gly Pro  
 165 170 175

Thr Ala Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Leu Pro Asp Leu Pro Phe Thr Ala  
 180 185 190

Leu Pro Pro Gly Ala Ser Asp Gly Arg Gly Arg Pro Ala Phe Pro Phe  
 195 200 205

Ser Cys Pro Arg Gln Leu Lys Val Pro Pro Tyr Leu Gly Tyr Arg Phe  
 210 215 220

Leu Gly Glu Arg Asp Cys Gly Ala Pro Cys Glu Pro Gly Arg Ala Asn  
 225 230 235 240

Gly Leu Met Tyr Phe Lys Glu Glu Glu Arg Arg Phe Ala Arg Leu  
 245 250 255

<210>3

<211> 233

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio extracelular N-terminal FZD5 humano

<400>3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Phe Ser Ala Asp Glu Arg Thr  
 225 230

EP2500360B1

<210>4

<211> 227

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Fc de IgG1 humana

<400>4

```
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1          5          10          15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20          25          30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
```



35	40	45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
50	55	60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
65	70	75
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
85	90	95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
100	105	110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
115	120	125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
130	135	140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
145	150	155
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
210	215	220
Pro Gly Lys		
225		

&lt;210&gt;5

&lt;211&gt; 207

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

EP2500360B1

<220>

<223> Domínio extracelular N-terminal FZD6 humano

<400>5

Met Glu Met Phe Thr Phe Leu Leu Thr Cys Ile Phe Leu Pro Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Arg Gly His Ser Leu Phe Thr Cys Glu Pro Ile Thr Val Pro Arg Cys  
 20 25 30  
 Met Lys Met Ala Tyr Asn Met Thr Phe Phe Pro Asn Leu Met Gly His  
 35 40 45  
 Tyr Asp Gln Ser Ile Ala Ala Val Glu Met Glu His Phe Leu Pro Leu  
 50 55 60  
 Ala Asn Leu Glu Cys Ser Pro Asn Ile Glu Thr Phe Leu Cys Lys Ala  
 65 70 75 80  
 Phe Val Pro Thr Cys Ile Glu Gln Ile His Val Val Pro Pro Cys Arg  
 85 90 95  
 Lys Leu Cys Glu Lys Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr  
 100 105 110  
 Phe Gly Ile Arg Trp Pro Glu Glu Leu Glu Cys Asp Arg Leu Gln Tyr  
 115 120 125  
 Cys Asp Glu Thr Val Pro Val Thr Phe Asp Pro His Thr Glu Phe Leu  
 130 135 140  
 Gly Pro Gln Lys Lys Thr Glu Gln Val Gln Arg Asp Ile Gly Phe Trp  
 145 150 155 160  
 Cys Pro Arg His Leu Lys Thr Ser Gly Gly Gln Gly Tyr Lys Phe Leu  
 165 170 175  
 Gly Ile Asp Gln Cys Ala Pro Pro Cys Pro Asn Met Tyr Phe Lys Ser  
 180 185 190  
 Asp Glu Leu Glu Phe Ala Lys Ser Phe Ile Gly Thr Val Ser Ile  
 195 200 205

&lt;210&gt;6

&lt;211&gt; 224

&lt;212&gt; PRT

EP2500360B1

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio extracelular N-terminal FZD humano

<400>6

Met Leu Ala Met Ala Trp Arg Gly Ala Gly Pro Ser Val Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Pro Gly Gly Val Gly Leu Ser Leu Gly Leu Leu Leu Gln Leu Leu Leu  
 20 25 30  
 Leu Leu Gly Pro Ala Arg Gly Phe Gly Asp Glu Glu Glu Arg Arg Cys  
 35 40 45  
 Asp Pro Ile Arg Ile Ser Met Cys Gln Asn Leu Gly Tyr Asn Val Thr  
 50 55 60  
 Lys Met Pro Asn Leu Val Gly His Glu Leu Gln Thr Asp Ala Glu Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Leu Thr Thr Phe Thr Pro Leu Ile Gln Tyr Gly Cys Ser Ser Gln  
 85 90 95  
 Leu Gln Phe Phe Leu Cys Ser Val Tyr Val Pro Met Cys Thr Glu Lys  
 100 105 110  
 Ile Asn Ile Pro Ile Gly Pro Cys Gly Gly Met Cys Leu Ser Val Lys  
 115 120 125  
 Arg Arg Cys Glu Pro Val Leu Lys Glu Phe Gly Phe Ala Trp Pro Glu  
 130 135 140  
 Ser Leu Asn Cys Ser Lys Phe Pro Pro Gln Asn Asp His Asn His Met  
 145 150 155 160  
 Cys Met Glu Gly Pro Gly Asp Glu Glu Val Pro Leu Pro His Lys Thr  
 165 170 175  
 Pro Ile Gln Pro Gly Glu Glu Cys His Ser Val Gly Thr Asn Ser Asp  
 180 185 190  
 Gln Tyr Ile Trp Val Lys Arg Ser Leu Asn Cys Val Leu Lys Cys Gly  
 195 200 205  
 Tyr Asp Ala Gly Leu Tyr Ser Arg Ser Ala Lys Glu Phe Thr Asp Ile  
 215 220

EP2500360B1

<210>7

<211> 158

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Domínio FZD8 Fri humano

<400>7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EP2500360B1

<210>8

<211> 170

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio FZD4 Fri humano

<400>8

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

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

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

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

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

Gln Leu Thr Thr Phe Thr Pro Leu Ile Gln Tyr Gly Cys Ser Ser Gln

85

90

95

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

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

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

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

Cys Met Glu Gly Pro Gly Asp Glu Glu Val  
 165 170

&lt;210&gt;9

&lt;211&gt; 157

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;



EP2500360B1

<223> Domínio FZD5 Fri humano

<400>9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

**Documentos de patente referidos na descrição**

- US 20020137129 A [0015]
- US 6004528 A [0028]
- EP 0401384 A [0090] [0093]
- EP 0154316 A [0092]
- US 5252714 A [0095]
- US 4588585 A [0098]
- US 4485045 A [0114]
- US 4544545 A [0114]
- US 5013556 A [0114]
- US 3773919 A [0116]
- EP 07752161 A [0149]
- US 2007005443 W [0149]
- US 60812966 B [0149]
- US 60731468 B [0149]
- US 20051031 B [0149]

**Documentos de não patente citados na descrição**

- **JEMAL et al.** *Cancer J. Clin.*, 2003, vol. 53, 5-26 [0002]
- the American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. Lippincott-Raven Publishers, 1997, 171-180 [0004]
- Staging of breast carcinoma. **HARRIS, J R et al.** *Breast Diseases*. Lippincott, 1991 [0004]
- **JEMAL et al.** *CA Cancer J. Clin.*, 2003, vol. 53, 5-26 [0005] [0009]
- **MUTHURAMALINGAM et al.** *Clin. Oncol.*, 2004, vol. 16, 505-516 [0005] [0006]

- **TROJAN et al.** *Anticancer Res.*, 2005, vol. 25, 551-561 [0006]
- **WEITZ et al.** *Lancet*, 2005, vol. 365, 153-65 [0007]
- **SPIRO et al.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2002, vol. 166, 1166-1196 [0009] [0010]
- **BEACHY et al.** *Nature*, 2004, vol. 432, 324 [0011] [0059]
- **MORRISON et al.** *Cell*, 1997, vol. 88, 287-298 [0011] [0056]
- **MORRISON et al.** *Curr. Opin. Immunol.*, 1997, vol. 9, 216-221 [0011]
- **MORRISON et al.** *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 1995, vol. 11, 35-71 [0011]
- **PANDIS et al.** *Genes, Chromosomes & Cancer*, 1998, vol. 12, 122-129 [0012]
- **KUUKASJRVI et al.** *Cancer Res.*, 1997, vol. 57, 1597-1604 [0012]
- **BONSING et al.** *Cancer*, 1993, vol. 71, 382-391 [0012]
- **BONSING et al.** *Genes Chromosomes & Cancer*, 2000, vol. 82, 173-183 [0012]
- **BEERMAN H. et al.** *Cytometry*, 1991, vol. 12, 147-154 [0012]
- **AUBELE M ; WERNER M.** *Analyt. Cell. Path.*, 1999, vol. 19, 53 [0012]
- **SHEN LET.** *Cancer Res.*, 2000, vol. 60, 3884 [0012]
- **LAPIDOT et al.** *Nature*, 1994, vol. 17, 645-648 [0014]
- **AL-HAJJ et al.** *PNAS*, 2003, vol. 100, 3983-3988 [0014] [0057]
- **AKASHI ; WEISSMAN.** *Developmental Biology of Hematopoiesis.* Oxford Univ. Press, 2001 [0056]
- **SPANGRUDE et al.** *Science*, 1988, vol. 241, 58-61 [0056]
- **BAUM et al.** *PNAS*, 1992, vol. 89, 2804-2808 [0056]
- **MORRISON et al.** *PNAS*, 1995, vol. 92, 10302-20306 [0056]
- **MORRISON et al.** *Immunity*, 1996, vol. 5, 207-216 [0056]
- **MORRISON et al.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1995, vol. 11, 35-71 [0056]
- **MORRISON et al.** *Dev.*, 1997, vol. 124, 1929-1939 [0056]
- **MORRISON ; WEISSMAN.** *Immunity*, 1994, vol. 1, 661 [0056]
- **UCHIDA et al.** *PNAS*, 2000, vol. 97, 14720-14725 [0056]
- **MORRISON et al.** *Cell*, 2000, vol. 101, 499-510 [0056]
- **BAUM et al.** *Bone Marrow Transplantation.* Blackwell Scientific

Publications, 1994 [0056]

- **PARK et al.** *J. Natl. Cancer Inst.*, 1971, vol. 46, 411-422 [0057]
- **LAPIDOT et al.** *Nature*, 1994, vol. 367, 645-648 [0057]
- **BONNET ; DICK.** *Nat. Med.*, 1997, vol. 3, 730-737 [0057]
- **HOPE et al.** *Nat. Immunol.*, 2004, vol. 5, 738-743 [0057]
- **REYA et al.** *Nature*, 2001, vol. 414, 105-111 [0058]
- **TAIPALE; BEACHY.** *Nature*, 2001, vol. 411, 349-354 [0058]
- **REYA ; CLEVERS.** *Nature*, 2005, vol. 434, 843 [0059] [0063] [0064] [0065]
- **NUSSE ; VARMUS.** *Cell*, 1982, vol. 31, 99-109 [0060] [0067] [0138]
- **VAN OOYEN ; NUSSE.** *Cell*, 1984, vol. 39, 233-240 [0060]
- **CABRERA et al.** *Cell*, 1987, vol. 50, 659-663 [0060]
- **RIJSEWIJK et al.** *Cell*, 1987, vol. 50, 649-657 [0060]
- **WU; NUSSE.** *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, 41762-41769 [0060]
- **MILLER et al.** *Oncogene*, 1999, vol. 18, 7860-7872 [0060]
- **JOHNSON et al.** *J. Bone Mineral Res*, 2004, vol. 19, 1749 [0060]
- **VEEMAN et al.** *Dev. Cell*, 2003, vol. 5, 367-377 [0062]
- **OLSON; GIBO.** *Exp. Cell Res.*, 1998, vol. 241, 134 [0062]
- **TOPOL et al.** *J. Cell Biol.*, 2003, vol. 162, 899-908 [0062]
- **REYA et al.** *Nature*, 2003, vol. 423, 409-414 [0063]
- **WILLERT et al.** *Nature*, 2003, vol. 423, 448-452 [0063]
- **VAN DEN BERG et al.** *Blood*, 1998, vol. 92, 3189-3202 [0063]
- **MURDOCH et al.** *PNAS*, 2003, vol. 100, 3422-3427 [0063]
- **JAMIESON et al.** *N. Engl. J. Med.*, 2004, vol. 351, 657-667 [0064]
- **KORINEK et al.** *Nat. Genet.*, 1998, vol. 19, 379 [0065]
- **PINTO et al.** *Genes Dev.*, 2003, vol. 17, 1709-1713 [0065]
- **KUHNERT et al.** *PNAS*, 2004, vol. 101, 266-271 [0065]
- **OSHIMA et al.** *Cancer Res.*, 1997, vol. 57, 1644-1649 [0066]
- **HARADA et al.** *EMBO J.*, 1999, vol. 18, 5931-5942 [0066]
- **IMBERT et al.** *J. Cell Biol.*, 2001, vol. 153, 555-568 [0067]
- **MICHAELSON ; LEDER.** *Oncogene*, 2001, vol. 20, 5093-5099 [0067]
- **TEPERA et al.** *J. Cell Sc.*, 2003, vol. 116, 1137-1149 [0067]

- **HATSELL et al.** *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2003, vol. 8, 145-158 [0067]
- **LIU et al.** *PNAS*, 2004, vol. 101, 4158 [0067]
- **BRENNAN ; BROWN.** *J. Mammary Gland Neoplasia*, 2004, vol. 9, 119-131 [0067]
- **MALOVANOVIC et al.** *Int. J. Oncol.*, 2004, vol. 25, 1337-1342 [0067]
- **NUNNALLY ; PARR.** *Dev. Genes Evol.*, 2004, vol. 214, 144-148 [0068]
- **KAWAKAMI et al.** *Dev. Growth Differ.*, 2000, vol. 42, 561-569 [0068]
- **WANG et al.** *Mol. Cell Biol.*, 2005, vol. 25, 5022-5030 [0068]
- **SAITOH et al.** *Int. J. Oncol.*, 2002, vol. 20, 117-120 [0068]
- **TERASAKI et al.** *Int. J. Mol. Med.*, 2002, vol. 9, 107-112 [0068]
- **NAGAYAMA et al.** *Oncogene*, 2005, 1-12 [0068]
- **SAITOH et al.** *Int. J. Oncol.*, 2001, vol. 18, 991-996 [0068]
- **KIRIKOSHI et al.** *Int. J. Oncol.*, 2001, vol. 19, 111-115 [0068]
- **JANSSENS et al.** *Tumor Biol.*, 2004, vol. 25, 161-171 [0068]
- **VINCAN et al.** *Differentiation*, 2005, vol. 73, 142-153 [0068]
- **ISHIKAWA et al.** *Dev.*, 2001, vol. 128, 25-33 [0068]
- **JANSSENS et al.** *Tumor Biology*, 2004, vol. 25, 161-171 [0068]
- **GREGORIEFF.** *Gastroenterology*, 2005, vol. 129, 626-638 [0068]
- **WILSON, I. et al.** *Cell*, 1984, vol. 37, 767 [0076]
- **BOWIE et al.** *Science*, 1990, vol. 247, 1306-1310 [0079]
- **PINCKARD et al.** *Clin. Exp. Immunol.*, 1967, vol. 2, 331-340 [0081]
- **ROBBINS et al.** *Diabetes*, 1987, vol. 36, 838-845 [0081]
- **CLELAND et al.** *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1993, vol. 10, 307-377 [0081]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co, 2000 [0087]
- **MALIK.** *Exp. Hematol*, 1992, vol. 20, 1028-1035 [0090]
- *Focus on Growth Factors*, 1992, vol. 3 (2), 4-10 [0092]
- **ZOELLER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 5662-5066 [0098]

- **POUWELS et al.** Cloning Vectors: A Laboratory Manual. Elsevier, 1985 [0103]
- **GLUZMAN.** *Cell*, 1981, vol. 23, 175 [0104]
- **LUCKOW ; SUMMERS.** *Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 47 [0104]
- **REMYINGTON.** The Science and Practice of Pharmacy. Mack Publishing, 2000 [0111] [0115]
- **EPSTEIN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0114]
- **HWANG et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0114]
- Chemotherapy Service. Williams & Wilkins, 1992 [0119]
- **HE et al.** *Science*, 1997, vol. 275, 1652-54 [0125]
- **TANAKA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, vol. 95, 10164-69 [0125]
- **HOLMEN et al.** *JBC*, 2002, vol. 277, 34727-35 [0125]
- **VINCAN et al.** *Differentiation*, 2005, vol. 73, 142-53 [0125]
- **GAZIT et al.** *Oncogene*, 1999, vol. 18, 5959-66 [0129]

Lisboa, 16 de Setembro de 2015

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Uma composição farmacêutica compreendendo um recetor FZD8 solúvel e um portador, excipiente e/ou estabilizador farmaceuticamente aceitável, em que a sequência de aminoácidos do recetor FZD8 solúvel consiste nos resíduos 28 a 158 da SEQ ID NO: 7, ligados a uma sequência de recetor não FZD, em que a sequência do recetor não FZD compreende uma Fc humana.
2. Uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que a Fc humana é Fc de IgG1 humana.
3. Uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência de aminoácidos do recetor solúvel consiste nos resíduos 28 a 158 da SEQ ID NO: 7, ligados à SEQ ID NO: 4.
4. A composição farmacêutica de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3 para utilização num método de tratamento do corpo humano por meio de terapêutica.
5. Uma composição farmacêutica de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3 para utilização num método de tratamento do cancro.
6. Uma composição farmacêutica de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, para utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o cancro é cancro da mama, cancro colorretal, cancro pancreático, cancro prostático, cancro da cabeça e pescoço, um tumor pulmonar, cancro ovárico, melanoma, carcinoma de células basais, sarcoma ou cancro hepatocelular.
7. Uma composição farmacêutica de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, para utilização de acordo com a reivindicação 5 ou a reivindicação 6, em que o método compreende administrar o recetor solúvel a um paciente humano com

EP2500360B1

terapêutica de radiação, quimioterapia, ou um anticorpo contra um antígeno associado a tumor adicional.

Lisboa, 16 de Setembro de 2015



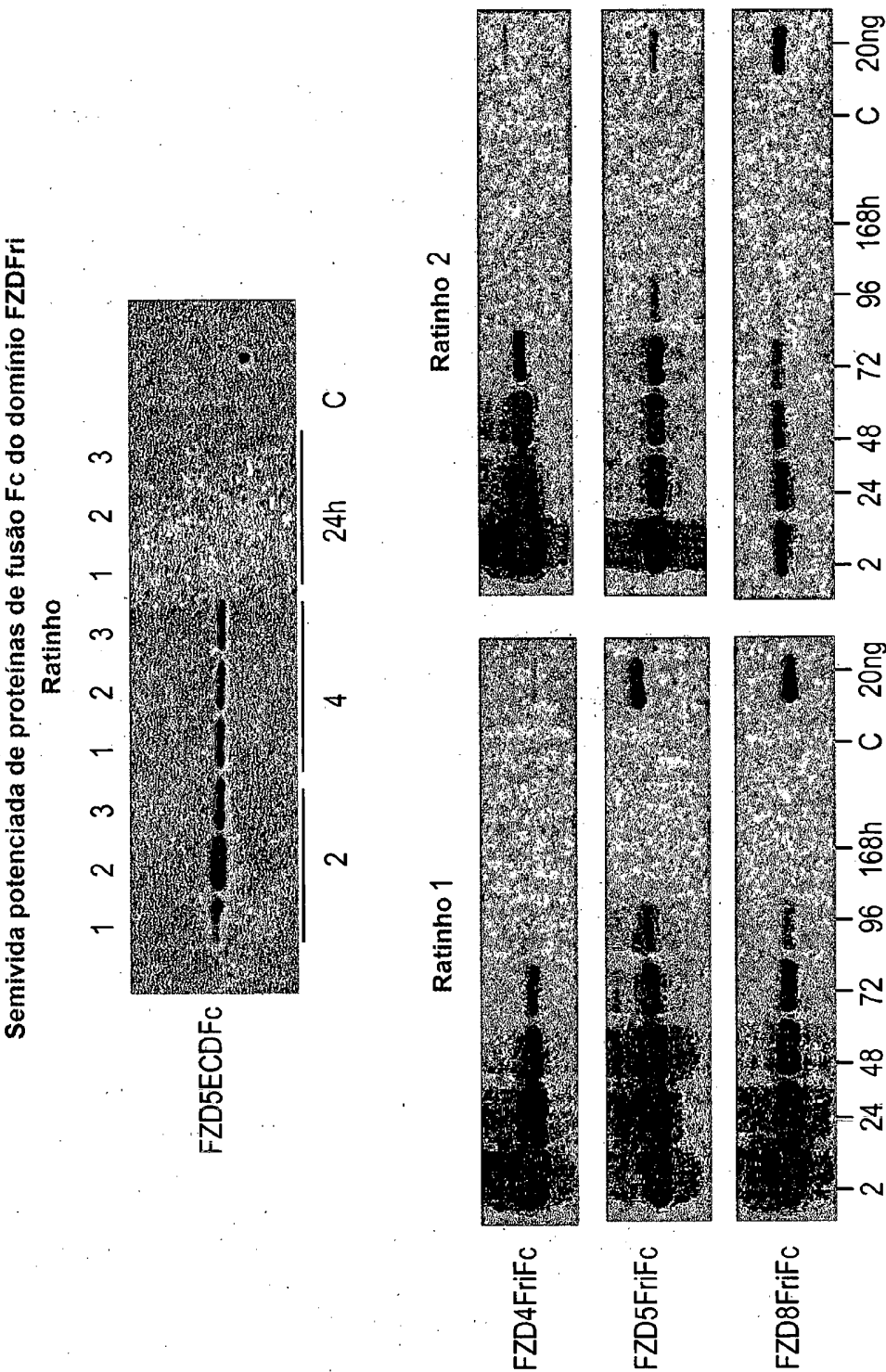


FIG. 1

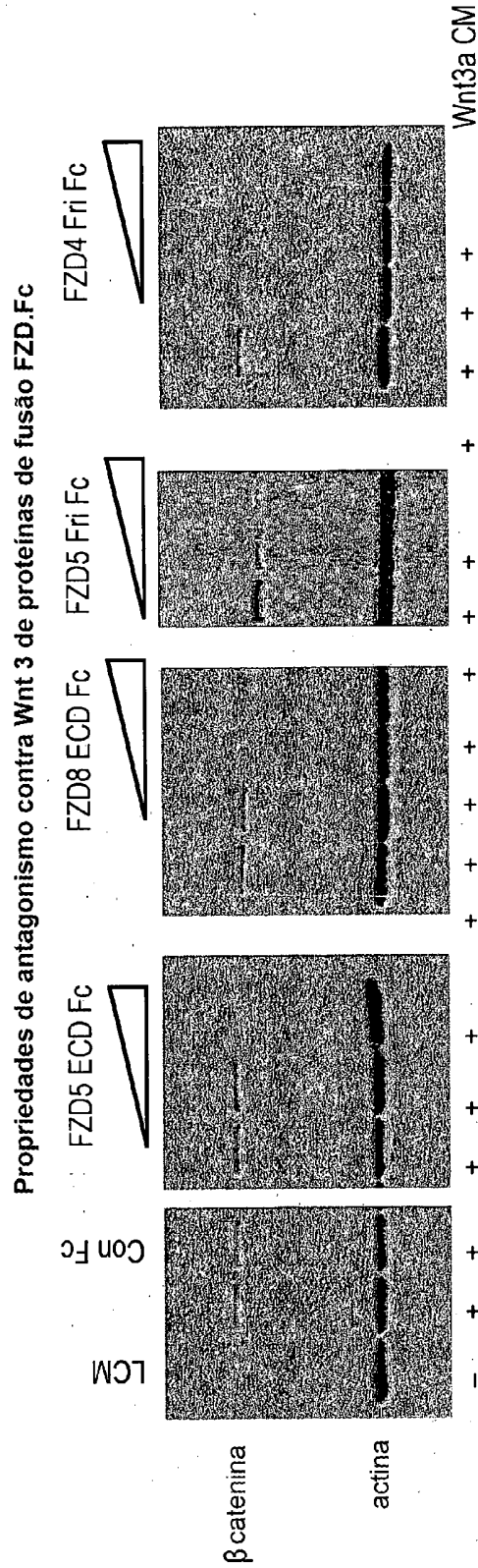


FIG. 2

Subfamília FZD responsável por ligar a Wnts que ativam a beta-Catenina

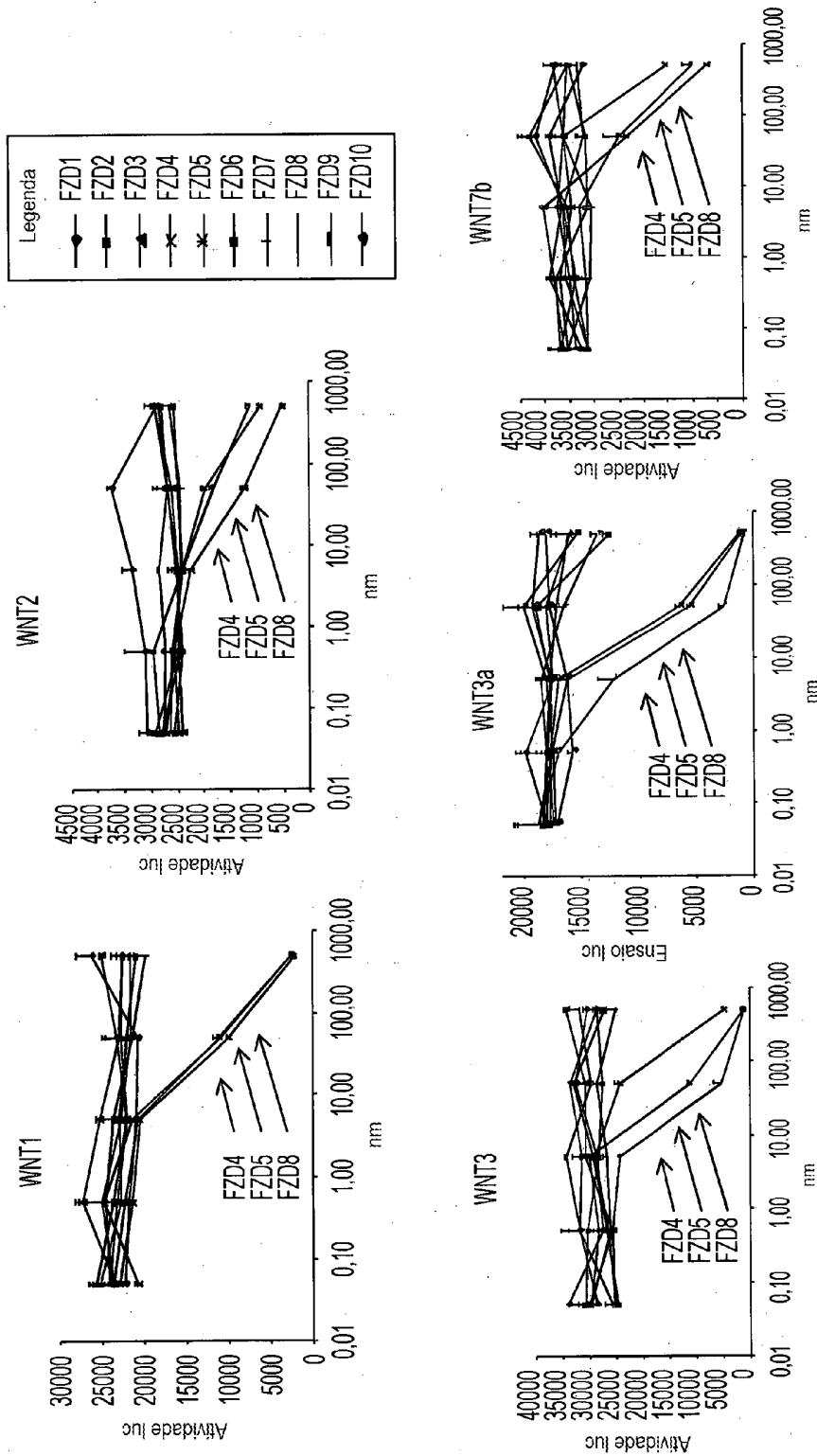


FIG. 3

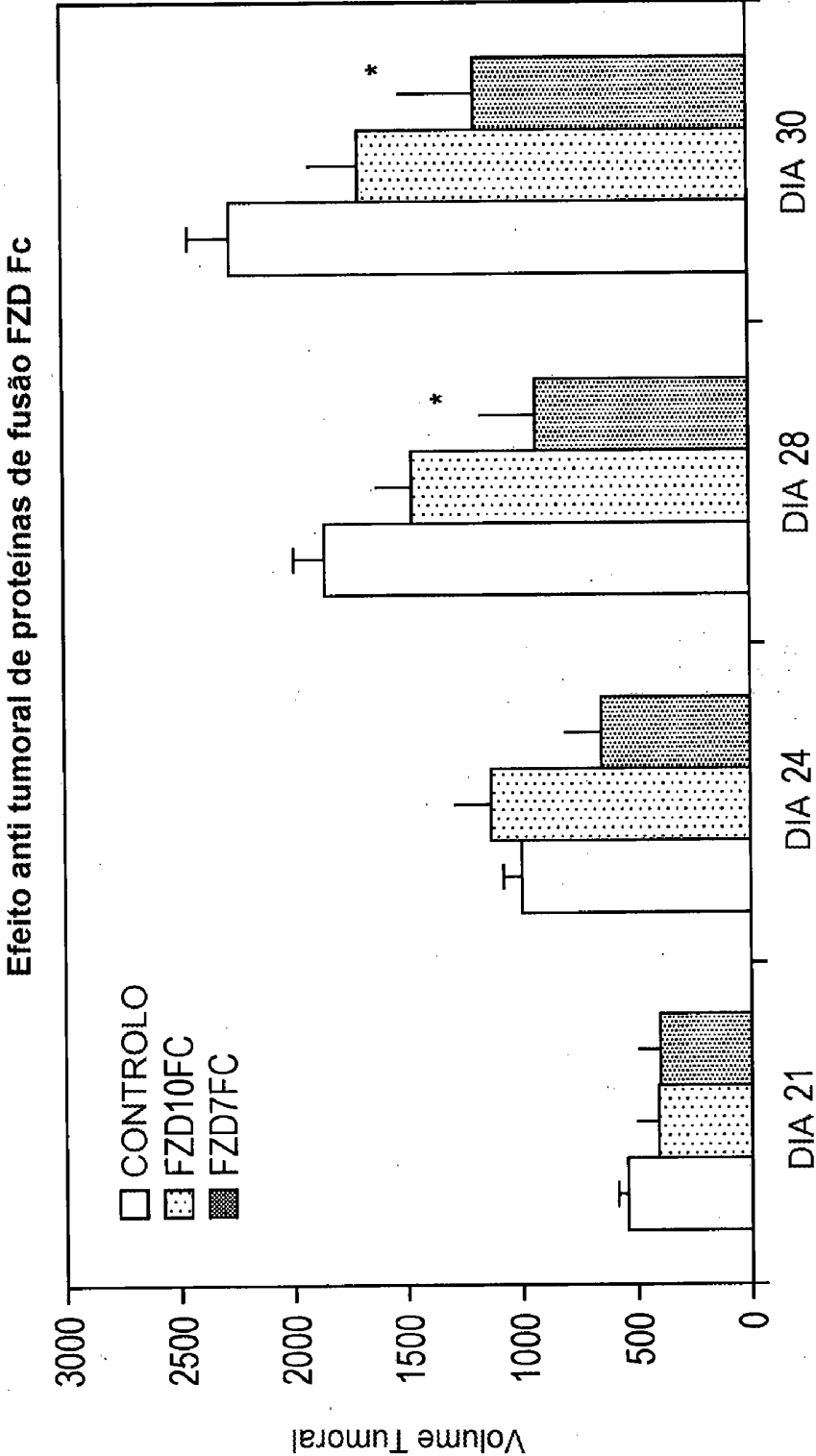


FIG. 4

Tumores WNT1 em Tratamento com FZD8Fc  
(5X semana: 10 mg/kg)

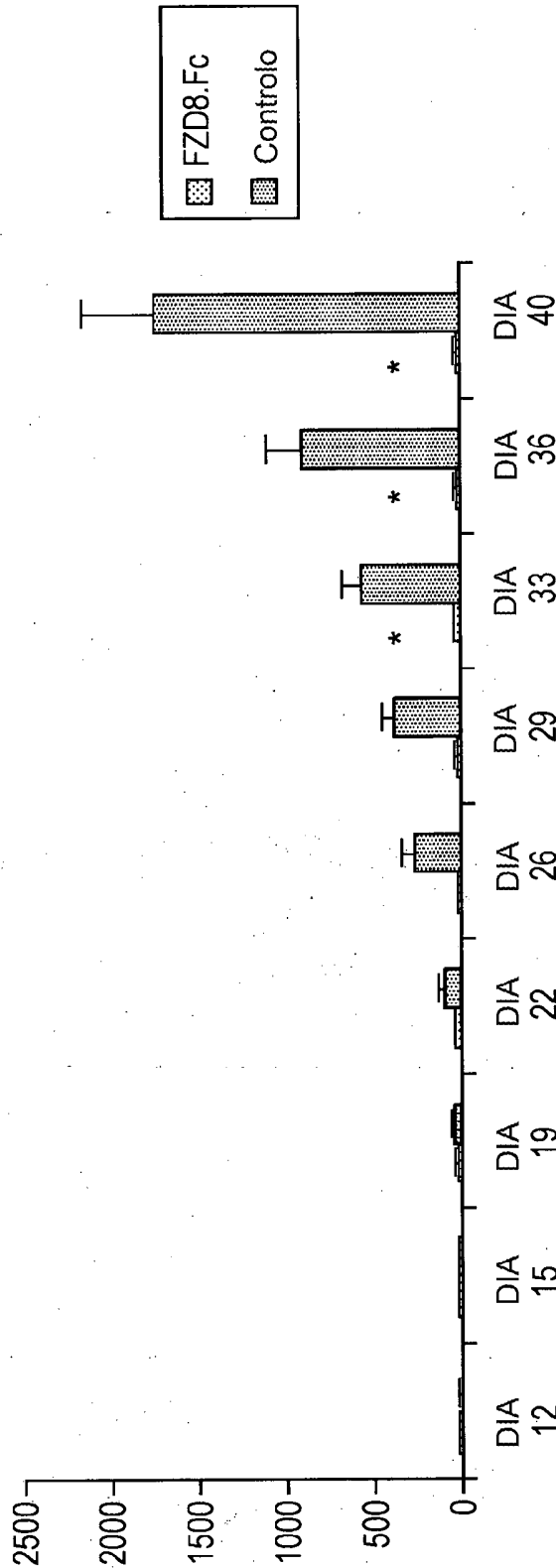
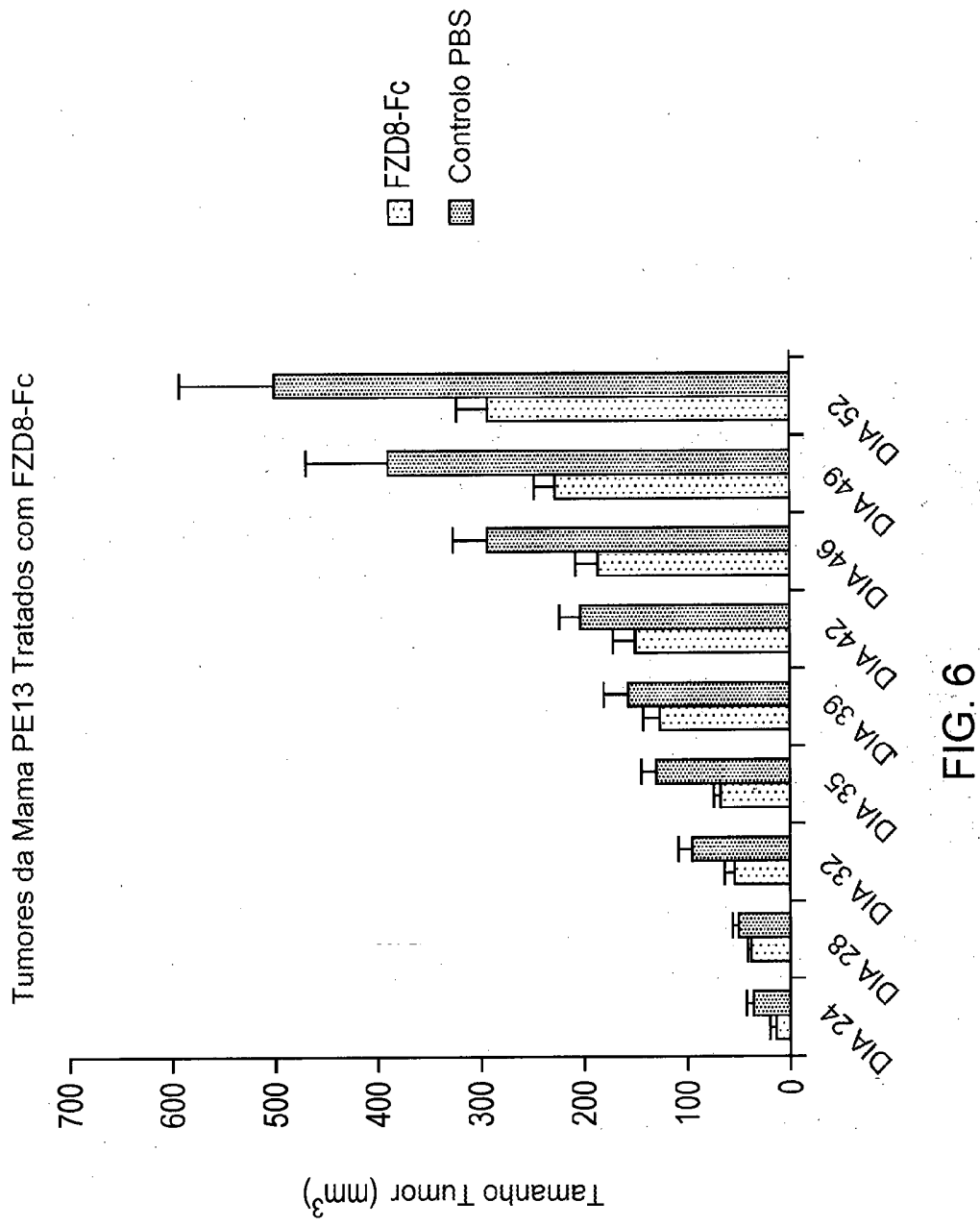


FIG. 5



Efeito de FZD8FriFc em Tumores WNT1 MMTV Estabelecidos

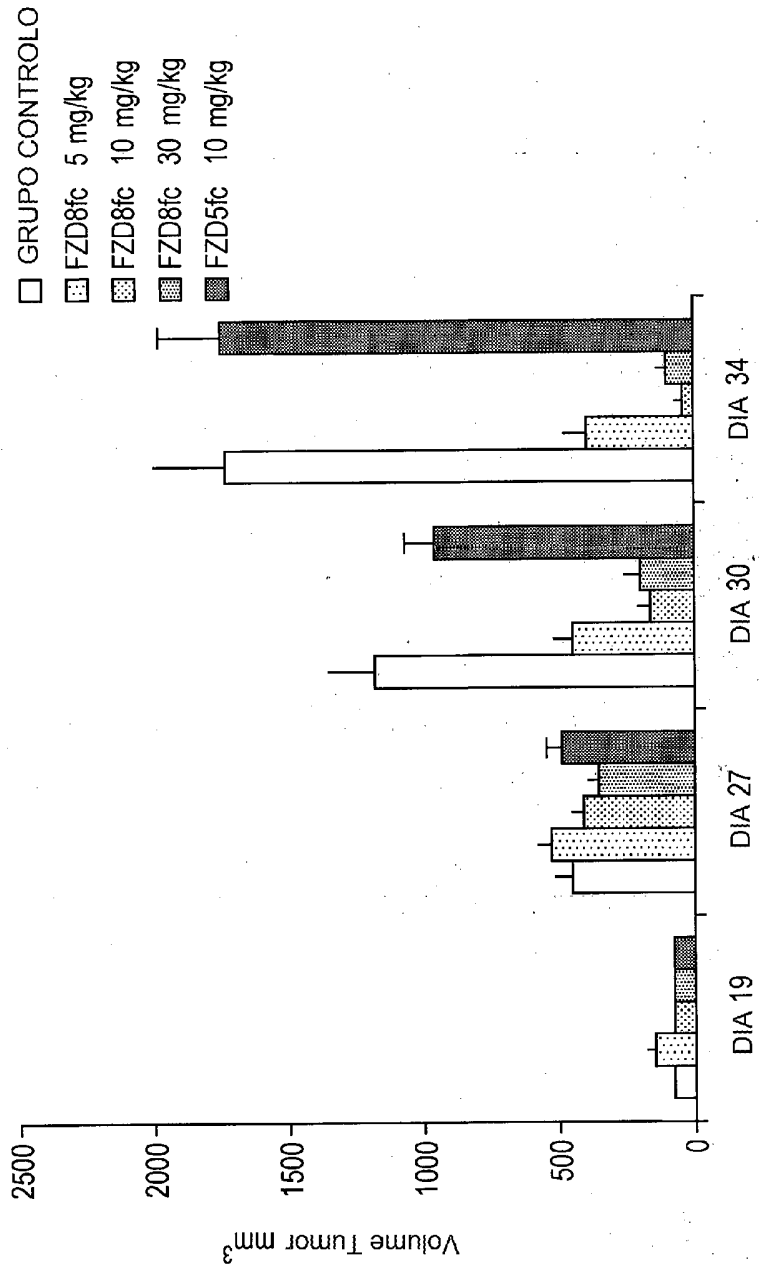


FIG. 7