

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 099**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2016 PCT/EP2016/079575**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2017 WO17093478**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2016 E 16808971 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3383425**

54 Título: **Polipéptidos biparatópicos antagonistas de la señalización WNT en células tumorales**

30 Prioridad:

04.12.2015 EP 15197999

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

23.04.2021

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH & CO. KG (100.0%)
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**ZINZALLA, VITTORIA;
KUENKELE, KLAUS-PETER;
BUYSE, MARIE-ANGE;
CROMIE, KAREN;
STAELENS, STEPHANIE y
STRUBBE, BEATRIJS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 821 099 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos biparatópicos antagonistas de la señalización WNT en células tumorales

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos que se unen a la proteína 5 similar al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP5) y a la proteína 6 similar al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP6), como se caracterizan en las reivindicaciones adjuntas. La invención también se refiere un vector de expresión que codifica un ácido nucleico que codifica un polipéptido así; a procedimientos para preparar tales polipéptidos; a células anfitrionas que expresan o son capaces de expresar tales polipéptidos; a composiciones que comprenden tales polipéptidos; y a usos de tales polipéptidos o tales composiciones, en particular con fines terapéuticos en el campo de las enfermedades cancerosas.

15 Antecedentes de la invención

La activación de la vía de señalización Wnt requiere la unión de ligandos Wnt extracelulares al receptor Frizzled y al correceptor LRP5 (Número de acceso: UniProtKB -075197 / LRP5_HUMAN) o su homólogo LRP6 estrechamente relacionado (Número de acceso: UniProtKB - 075581 / LRP6_HUMAN). Existen 19 proteínas Wnt y 10 receptores Frizzled en células de mamíferos. En ausencia del ligando Wnt, la beta-catenina citoplásmica es fosforilada por un complejo proteico que consiste en las proteínas de andamiaje Axin y APC y las quinasas GSK3beta y CK1a. El reconocimiento posterior por la ubiquitina ligasa beta-TrcP conduce a la degradación de la beta-catenina mediada por ubiquitina. En presencia del ligando Wnt, la unión de Wnt a Frizzled y LRP5 o LRP6 conduce al reclutamiento de la proteína efectora citoplásmica Dvl y la fosforilación de la cola citoplásmica LRP5 o LRP6, que proporciona el sitio de acoplamiento para Axin. El secuestro de Axin por LRP5 o LRP6 conduce a la inactivación del complejo Axin-APC-GSK3beta y, por lo tanto, a la estabilización y acumulación intracelular de beta-catenina. Por lo tanto, los niveles citoplásmicos de beta-catenina aumentan, y la beta-catenina migra al núcleo y forma complejos con miembros de la familia de factores de transcripción del factor de células T (TCF)/factor de unión a potenciador linfoide (LEF). A continuación, se reclutan la maquinaria de transcripción basal y los coactivadores transcripcionales, incluida la proteína de unión a la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) (CBP) o su homólogo p300, lo que conduce a la expresión de varios genes diana, incluidos Axin2, ciclina D1 y c-Myc.

Un nivel adicional de regulación de la vía Wnt dependiente del ligando está mediado por la E3 ligasa RNF43 y su homólogo estrechamente relacionado ZNRF3, y por las proteínas R-Spondin secretadas (de Lau et al. "El módulo R-spondin/Lgr5/Rnf43: regulador de la intensidad de la señal Wnt". *Genes Dev.* 2014; 28(4):305-16). RNF43 media la ubiquitinación del complejo receptor Frizzled/LRP5 o LRP6 en la superficie celular, lo que lleva a su degradación y, por lo tanto, inhibe la actividad de la vía Wnt dependiente del ligando. La actividad de RNF43 es contrarrestada por los miembros de la familia R spondin (ligandos R-Spondin 1 a 4). Cuando el ligando R-Spondin está presente, elimina el RNF43 de la superficie celular, lo que permite la acumulación del complejo Frizzled/LRP5 o LRP6 y la mejora de la señalización de Wnt en presencia de ligandos de Wnt.

LRP5 y LRP6 funcionan como guardianes de la activación de señalización Wnt dependiente de ligando y, por lo tanto, pueden considerarse como dianas para lograr un bloqueo completo de la vía mediada por todos los 19 ligandos Wnt y 10 receptores Frizzled y potenciada por ligandos R-spondin. En particular, los ligandos Wnt se pueden dividir en una clase Wnt1 y una clase Wnt3a, cada una de las cuales se une a diferentes epítomos/regiones de LRP5 y LRP6 para señalización. El ectodominio de LRP5 y LRP6 comprende cuatro unidades repetidas de una hélice beta conectada a un dominio similar a EGF, seguido de tres repeticiones de LDLR tipo A. Los análisis estructurales y funcionales combinados de LRP5 y LRP6 sugieren que Wnt1 (ligando de clase Wnt1) se une a un fragmento que contiene las hélices beta 1 y 2 y Wnt3a se une a un fragmento que contiene las hélices beta 3 y 4 de LRP6. Hasta ahora, solo se informa una imagen de baja resolución del ectodominio LRP6 que contiene una hélice beta de 1 a 4 regiones (Ahn et al. "Base estructural de la inhibición de la señalización de Wnt por la unión de Dickkopf a LRP5/6". *Dev Cell.* 2011; 21(5):862-73). Sin embargo, las incertidumbres de estas reconstrucciones de baja resolución (40 Å) y la ausencia de datos estructurales del ectodominio LRP6 en complejo con los ligandos Wnt no permiten definir los epítomos exactos implicados en la unión del ligando Wnt1 o Wnt3a.

La hiperactivación de la señalización de Wnt está involucrada en la patogénesis de varios tipos de cáncer. En algunos tipos de cáncer, las mutaciones frecuentes en las moléculas de señalización en sentido descendente contribuyen a la vía Wnt activada constitutivamente (por ejemplo, Mutaciones APC en cáncer colorrectal; mutación activadora de beta-catenina en carcinoma hepatocelular). Por el contrario, en el cáncer de mama triple negativo (TNBC), el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), el adenocarcinoma de páncreas y en un subconjunto de cáncer colorrectal (CCR) y cánceres de endometrio, la activación de la señalización de Wnt es accionada por un mecanismo dependiente de ligando (es decir, mediante una activación de Wnt autocrina/paracrina), tal como es detectada por la acumulación intracelular de beta-catenina. En NSCLC, TNBC y adenocarcinoma de páncreas, la activación de Wnt dependiente de ligando está mediada por múltiples mecanismos, que incluyen una mayor expresión de los ligandos de Wnt y/o de los receptores LRP5 y LRP6, o el silenciamiento del regulador negativo DKK1 de LRP5 y LRP6 (TNBC: Liu et al. "La sobreexpresión de LRP6 define una clase de subtipo de cáncer de mama y es un objetivo de la terapia". *Proc Natl*

Acad Sci U S A 2010; 107 (11):5136-41; Khramtsov y col. "La activación de la vía Wnt/beta-catenina se enriquece en los cánceres de mama de tipo basal y predice un mal resultado". *Am J Pathol.* 2010; 176(6): 2911-20; NSCLC: Nakashima et al. "Sobreexpresión de Wnt1 asociada con la proliferación tumoral y un mal pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas". *Oncol Rep.* 2008; 19(1):203-9; Cáncer de páncreas: Zhang et al. "Se requiere señalización wnt canónica para la carcinogénesis pancreática". *Cancer Res.* 2013; 73(15):4909-22). En particular, los datos publicados han demostrado que en tejidos sanos (por ejemplo, epitelio mamario y pulmonar), la beta-catenina se localiza únicamente en la membrana plasmática. Por el contrario, la mayoría de las muestras clínicas primarias de TNBC, NSCLC y adenocarcinoma pancreático mostraron acumulación intracelular de beta-catenina (es decir, en el citoplasma/núcleo; biomarcador de activación de señalización de Wnt), debido a una señalización de Wnt aberrante. Publicaciones recientes han demostrado que la activación de la señalización de Wnt dependiente de ligando está mediada por RNF43 mutado/inactivado (Giannakis et al. "RNF43 se muta con frecuencia en cánceres colorrectales y endometriales". *Nat Genet.* 2014; 46(12):1264-6) o activando los transcritos de fusión de R-Spondin (que codifican las proteínas R-spondin2 o R-spondin3 activadas por promotores fuertes constitutivamente activos; Seshagiri et al. "Fusiones recurrentes de R-spondin en cáncer de colon". *Nature* 2012; 488 (7413):660-4) en un subconjunto de CCR y cánceres de endometrio. Se ha demostrado que la inactivación de las mutaciones de RNF43 y las transcripciones de fusión de R-Spondin aumentan la señalización de Wnt dependiente del ligando in vitro al aumentar la abundancia de Frizzled en la superficie celular. Se demostró que la activación de Wnt dependiente de ligando en tumores impulsa el crecimiento tumoral y la resistencia a la quimioterapia o inmunoterapia, y está relacionada con la recurrencia en modelos preclínicos.

Algunas moléculas de unión a LRP5 o LRP6, capaces de modular la vía de señalización de Wnt, se conocen en la técnica: Dickkopf-1 (DKK1) es un inhibidor de LRP5 y LRP6. DKK1 se asocia con ambos correceptores de Wnt, LRP5 y 6, y la proteína transmembrana, Kremen, inhibe la señalización de Wnt y conduce a una rápida internalización de LRP5 y LRP6. Se muestra que DKK1 inhibe la señalización mediada tanto por Wnt1 como por Wnt3a. Los estudios de modelado estructural muestran que una sola molécula de DKK1 se une cooperativamente a una región extendida del ectodominio LRP6 (de la hélice beta 1 a 3). Los análisis estructurales sugieren una interacción de unión cooperativa de DKK1 con LRP6 con una unión inicial a la región 3 de la hélice beta que facilita la interacción/unión a la región 1 y 2 de la hélice beta a través de un cambio de conformación del ectodominio LRP6. Sin embargo, falta la elucidación de los epítomos definidos dentro de los dominios beta-propulsores 1, 2 y 3 implicados en la unión de DKK1 a LRP6 debido a la baja resolución de las reconstrucciones estructurales del ectodominio completo de LRP6 unido a DKK1, como se mencionó.

Se demostró que el tratamiento con DKK1 in vivo provoca una toxicidad grave en el tracto gastrointestinal. En particular, se demostró que la expresión de DKK1 mediada por adenovirus en ratones adultos inhibía marcadamente la proliferación en el intestino delgado y el colon, acompañada de una degeneración de arquitectura progresiva, pérdida severa de peso corporal y mortalidad por colitis e infección sistémica. En particular, LRP5 y LRP6 se expresan en el intestino en las células epiteliales proliferativas y son necesarias para la proliferación del epitelio intestinal, lo que sugiere que la inhibición de LRP5 y LRP6 puede ser tóxica para este y otros tejidos normales (Zhong et al. *Lrp5 y Lrp6 desempeñan funciones compensatorias en el desarrollo intestinal del ratón*". *J Cell Biochem.* 2012; 113(1):31-8). Esto hace que sea dudoso si los agentes que inhiben LRP5 y LRP6, o que inhiben la vía de señalización Wnt (Wnt1 y Wnt3a) en general pueden usarse con fines terapéuticos; por ejemplo, se pueden desarrollar como medicamentos contra el cáncer.

El documento WO2009/056634 se refiere a moléculas de unión a LRP6 que pueden interactuar con la vía de señalización de Wnt1 o con la vía de señalización de Wnt3/3a, que pueden ser antagonistas o agonistas, y que pueden utilizarse con fines de diagnóstico o para tratar los "trastornos relacionados con la señalización de Wnt", como la osteoartritis, la poliquistosis renal o el cáncer. En este documento no se proporcionan ejemplos específicos para tales moléculas de unión, definidas por su secuencia de aminoácidos.

Los documentos WO2011/138391 y WO2011/138392 divulgan anticuerpos de unión a LRP6 multivalentes. El documento WO2011/138391 reivindica anticuerpos que bloquean una vía de señalización de Wnt (Wnt1 o Wnt3) sin potenciar la otra vía (Wnt3 o Wnt1, respectivamente). La publicación WO2011/138392 proporciona, entre otras cosas, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que potencian la señalización de Wnt mediante la agrupación de receptores LRP6.

El documento WO2011/138391 explica que, para lograr el efecto deseado, las moléculas de unión a LRP6 deben formarse en anticuerpos IgG de longitud completa. Se proporcionan ejemplos de moléculas biparatópicas de LRP6 que incluyen una molécula de IgG, que tiene una primera especificidad de unión, acoplada a una porción Fv de cadena sencilla, que tiene la segunda especificidad de unión. Se describe que algunos formatos tienen una estabilidad térmica significativamente reducida (T_m de 50 a 52°C). Una porción Fc puede impartir funciones efectoras en una molécula de IgG, como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El documento WO2013/067355 divulga construcciones de inmunoglobulina scFv de unión a LRP6 biparatópica de vida media prolongada, derivadas de moléculas de IgG descritas en WO2011/138391.

El documento WO2011/119661 divulga anticuerpos que se unen a LRP6 e inhiben la señalización inducida por una primera isoforma de Wnt, esp. por Wnt3 o Wnt3a, pero potencian la señalización inducida por una segunda isoforma Wnt, que puede ser una isoforma Wnt1, 2, 2b, 4, 6, 7a, 7b, 8a, 9a, 9b, 10a o 10b. Se divulgan moléculas biespecíficas que se unen a la región E1-E2 de LRP6 así como a la región E3-E4 de LRP6. Se utilizó la técnica de botón en el agujero para generar anticuerpos biespecíficos.

La identificación de los epítomos de unión (residuos de aminoácidos definidos dentro de las regiones del ectodominio/hélice beta de LRP6) involucrados en la unión de los anticuerpos de LRP6 no se proporciona en la publicación WO2009/056634, ni en la publicación WO2011/138391 o la publicación WO2013/067355, y solo parcialmente en la publicación WO2011/119661. En particular, los anticuerpos de unión a LRP6 pueden inhibir la señalización de Wnt a través de mecanismos alternativos de acuerdo con la unión a diferentes regiones de LRP6, incluida la competencia directa con Wnts o la inhibición de la formación de complejos de receptores ternarios (Wnt-LRP6-Frizzled), mientras que otros mejoran la señalización, posiblemente por agrupamiento de receptor (Ahn et al. "Base estructural de la inhibición de la señalización de Wnt por la unión de Dickkopf a LRP5/6". Dev Cell. 2011; 21 (5):862-73).

Sin embargo, ninguna de las moléculas de unión descritas en la técnica ha sido autorizada hasta ahora por las autoridades sanitarias para su uso como medicamento para tratar ninguna enfermedad. Específicamente, dicho uso requiere propiedades de unión muy específicas, la especificidad correcta, de modo que dichas moléculas se unan, activen o inhiban o no a otras dianas (por ejemplo, dando como resultado una activación o inhibición no deseada de otras vías de señalización, o la falta de activación o inhibición con respecto a isoformas dianas), en el caso de agentes biespecíficos o multiespecíficos, el equilibrio correcto entre las dos o más especificidades de unión, propiedades farmacocinéticas y dinámicas adecuadas, un perfil toxicológico aceptable y, por supuesto, eficacia in vivo.

En vista de lo anterior, existe la necesidad de nuevos agentes terapéuticos que permitan un tratamiento eficaz de varios tipos de enfermedades cancerosas y tumores. Por tanto, un objeto de la invención es proporcionar agentes farmacológicamente activos que puedan usarse en el tratamiento de varias enfermedades cancerosas, incluyendo NSCLC y TNBC.

En particular, es un objeto de la invención proporcionar tales composiciones, agentes farmacológicamente activos y/o procedimientos de tratamiento que proporcionen ciertas ventajas en comparación con los agentes, composiciones y/o procedimientos actualmente utilizados y/o conocidos en la técnica. Estas ventajas incluyen eficacia in vivo, propiedades terapéuticas y farmacológicas mejoradas, menos efectos secundarios y otras propiedades ventajosas tales como facilidad de preparación mejorada o costes reducidos de productos, especialmente en comparación con fármacos candidatos ya conocidos en la técnica.

Breve resumen de la invención

Según un primer aspecto de la invención, la presente invención proporciona polipéptidos que se unen específicamente a LRP5 o LRP6, en donde dicho polipéptido de la invención comprende un primer dominio variable individual de inmunoglobulina (a) seleccionado del grupo de dominios variables individuales de inmunoglobulina (i) a (iii) definidos por tener las siguientes secuencias de CDR:

(i):

CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)
 CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)
 CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

(ii):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)
 CDR2: AIRRSGRRYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)
 CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6)

(iii):

CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)
 CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)
 CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEY (= SEQ ID NO:9),

y un segundo dominio de variable individual de inmunoglobulina (b) seleccionado del grupo de dominios variables individuales de inmunoglobulina (iv) y (v) definidos por tener las siguientes secuencias de CDR:

(iv):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)
 CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)
 CDR3: SPIPYGSLRRRRNNYDY (= SEQ ID NO:12)

(v):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)
 CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)
 CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEEY (= SEQ ID NO:15).

5 Los términos "primero" y "segundo" con respecto a dichos dominios variables individuales de inmunoglobulina están destinados únicamente a indicar que estos dominios son dos dominios diferentes (ya que al menos incluirán diferentes secuencias de CDR). Por tanto, no se entenderá que estos términos se refieren al orden o secuencia exactos de los dominios dentro de dicha cadena polipeptídica.

10 Los polipéptidos de la invención comprenden opcionalmente un tercer dominio variable individual de inmunoglobulina, tal como especialmente un dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina, tal como el dominio Alb11, que comprende las siguientes CDR:

CDR1(Alb11): SFGMS (= SEQ ID NO:16)
 CDR2(Alb11): SISGSGSDTYADSVKG (= SEQ ID NO:17)
 CDR3(Alb11): GGSLSR (= SEQ ID NO:18)

15 Según una forma de realización más específica, los polipéptidos de la invención incluyen dominios variables individuales de inmunoglobulina que son dominios VHH, y preferiblemente dominios VHH humanizados.

20 Según una forma de realización aún más específica, los polipéptidos de la invención incluyen un primer dominio variable individual de inmunoglobulina (a) seleccionado del grupo de dominios variables individuales de inmunoglobulina (i) a (iii) que tienen las siguientes secuencias:

(i):

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSTYTVGWFRQAPGKERE
 VAAIRRRGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY
 CAADTRTVALLQYRYDYWGQGLTVTVSS
 (= SEQ ID NO:19)

25

(ii):

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKERE
 FVAAIRRSRRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY
 CAAARRVRSSTRYNTGTWWWWEYWGQGLTVTVSS
 (= SEQ ID NO:20)

30 (iii):

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKERE
 VAAIVRSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY
 CAADRRGRGENYILLYSSGRYEWGQGLTVTVSS
 (= SEQ ID NO:21),

35

y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina (b) seleccionado del grupo que consiste en dominios variables individuales de inmunoglobulina (iv) y (v) que tienen las siguientes secuencias:

(iv):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSSYAMGWFRQAPGKERE
 FVA AISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVY
 YCAASPIPYGSLRRRRNNYDYWGQGLTVTVSS
 (= SEQ ID NO:22),

y

(v):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKERE
 FVAAISWRSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVY
 YCAADPRGYGVAYVSAYYEWGQGTLLTVSS
 (= SEQ ID NO:23).

5

De acuerdo con una forma de realización específicamente preferida, los polipéptidos de la invención incluyen adicionalmente un residuo que prolonga la vida media, en el que dicho residuo que extiende la vida media se une covalentemente a dicho polipéptido y se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en un residuo que se une a la albúmina, tal como un péptido de unión a albúmina o un dominio de inmunoglobulina de unión a albúmina, preferiblemente un dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina, más preferiblemente el dominio Alb11, un residuo de unión a transferrina, tal como un dominio de inmunoglobulina antitransferrina, una molécula de polietilenglicol, albúmina de suero humano, y un fragmento de albúmina de suero humano.

10

Específicamente preferidos son los polipéptidos que incluyen, además de los dos dominios variables individuales de inmunoglobulina (a) y (b) como se describen anteriormente, un dominio Alb11 que tiene la siguiente secuencia:

15

EVQLVESGGGLVQPNSLRLSCAASGGTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW
 VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYQMNSLRPEDTAVYYCTI
 GGSLSRSSQGTLLTVSS
 (= SEQ ID NO:24)

Según una forma de realización adicional, la invención incluye específicamente polipéptidos que comprenden o consisten en cualquiera de las siguientes tres cadenas polipeptídicas:

20

F13500575, que tiene la secuencia SEQ ID NO:25,

F13500571, que tiene la secuencia SEQ ID NO:26, y

25

F13500720, que tiene la secuencia SEQ ID NO:27.

Según otros aspectos, la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico, vectores de expresión, células anfitrionas y procedimientos de fabricación usados en la producción de un polipéptido de la invención. Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de la invención pueden usarse, en forma aislada, para construir los respectivos vectores de expresión, que luego pueden transfectarse en células anfitrionas usadas para la producción biofarmacéutica de los polipéptidos de la invención. Dicho procedimiento de fabricación comprende típicamente las etapas de cultivar la célula anfitriona en condiciones que permitan la expresión del polipéptido, recuperar el polipéptido y purificarlo de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica.

30

Otros aspectos, formas de realización, usos y procedimientos que implican los polipéptidos de la invención resultarán claros a partir de la siguiente descripción detallada de la invención y de las reivindicaciones adjuntas.

35

La invención proporciona nuevas moléculas que permiten un tratamiento más eficaz de varios tipos de cáncer, como TNBC, CRC y NSCLC, con menos efectos secundarios. Los polipéptidos de la invención proporcionan un efecto terapéutico sorprendente (es decir, eficacia) en el tratamiento de pacientes con cáncer, ya que pueden inducir la regresión del tumor dando como resultado una respuesta patológica completa (pCR). Se espera que esto, a su vez, dé como resultado una mejora significativa de la supervivencia libre de progresión y la supervivencia general, especialmente en indicaciones de alta necesidad médica insatisfecha como, por ejemplo, en el cáncer de mama. Por tanto, los polipéptidos de la invención proporcionan nuevas opciones terapéuticas en el tratamiento de varios tipos de cáncer, especialmente los que muestran una vía de señalización Wnt desregulada y acumulación de beta-catenina. Además, los polipéptidos de la invención son fáciles de fabricar, tienen una alta estabilidad y baja antigenicidad, y ofrecen una variedad de opciones con respecto a las vías de administración, además de la inyección y la infusión.

40

45

Breve descripción de los dibujos

50

La Figura 1 muestra una representación esquemática de polipéptidos biparatópicos que antagonizan la señalización de Wnt1 y Wnt3a. Consisten en tres dominios, con dos dominios que se unen a distintos epítomos de LRP5 y LRP6 (bloqueadores de Wnt1 y Wnt3a) y un dominio para la extensión de la vida media (ligante de albúmina de suero humano).

55

La Figura 2 muestra la falta de correlación entre ensayos FACS y ELISA de enlace para un número representativo de VHH de unión a LRP6 derivados de la inmunización de llama. El panel número "1" de VHH se caracteriza por una alta afinidad por las células que expresan LRP6 en la membrana plasmática, tal como se detecta mediante ensayos de enlace de FACS (en el eje y se indican los valores de MCF). El panel número "2" de VHH se caracteriza por una alta afinidad por el ectodominio de LRP6 humano recombinante (rhLRP6-Fc), según lo detectado por ensayos de enlace ELISA (en el eje x se informan los valores de OD405).

La Figura 3 muestra el enlazamiento de tres constructos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media prolongada a LRP5 humana (Figura 3A) y LRP6 humana (Figura 3B) que sobreexpresan líneas celulares HEK293 en comparación con el control negativo que consiste en un ligante (construcción VHH que se une a una proteína bacteriana que no se expresa en células HEK293).

La Figura 4 muestra la competencia DKK1 completa de tres constructos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media prolongada para la unión a LRP5 humana (Figura 4A) y LRP6 humana (Figura 4B) que sobreexpresan líneas celulares HEK293, según lo detectado por un ensayo de competición DKK1 basado en FACS.

La figura 5 muestra la inhibición completa de la vía Wnt1 y Wnt3a de tres constructos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópica de vida media prolongada (figura 5A) y la comparación con otras moléculas de unión a LRP6 (figura 5B: Knob HC YW210.09 y MOR08168lgG1 LALA 6475 scfv; Figura 5C: 802T) en el ensayo de marcador de Wnt1 y Wnt3a combinados.

La Figura 6 muestra la inhibición de la señalización de Wnt en las células cancerosas, tal como es detectada por la inhibición de la expresión relativa del ARNm de Axin2 (Figura 6A), y la proliferación celular (Figura 6B) tal como es detectada por la disminución del porcentaje (%) de células viables, después del tratamiento con tres constructos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media prolongada (concentración final de 1 mM) y por tratamiento con 802T, en comparación con F013500571 y células no tratadas (control) (diagrama del lado izquierdo/lado derecho de la Figura 6B); las curvas de dosis-respuesta se muestran para el tratamiento con una construcción de LRP5/LRP6 biparatópica de vida media prolongada (Figura 6C) y 802T (Figura 6D).

La Figura 7 muestra la eficacia in vivo de los constructos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media prolongada (F013500571 en la Figura 7A y F013500720 en la Figura 7B) y del Knob HC YW210.09 (Figura 7C) en un modelo de tumor accionado por Wnt (modelo de xenoinjerto MMTV-Wnt1).

La Figura 8 muestra la inhibición de la vía Wnt en tumores tratados con los constructos F013500571 y F013500720 de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópica de vida media prolongada, tal como es detectada por reducción de la expresión de ARNm de Axin2 en relación con el grupo de control.

La Figura 9 muestra el efecto de la inhibición de la señalización accionada por Wnt3a sobre la liberación de TNFalfa de citocinas proinflamatorias por parte de las células dendríticas (Figura 9A) y el efecto sobre la activación de las células T, según lo determinado por la liberación de interferón-gamma (Figura 9B) tras el tratamiento con un constructo de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópico de vida media prolongada. Cada símbolo representa un donante de células dendríticas (DC) individual. Los datos mostrados están normalizados a los niveles de TNFalfa del control no tratado (Figura 9A) y cada símbolo representa un par de donantes individual para DC y células T (Panel B).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los anteriores y otros aspectos y formas de realización de la invención resultarán claros a partir de la descripción adicional en este documento, en la que:

a) A menos que se indique o se defina lo contrario, todos los términos utilizados tienen su significado habitual en la técnica, lo cual será claro para el experto. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales estándar, tales como Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2ª Ed.), Vols. 1 -3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, Nueva York, (1990), y Roitt et al., "Immunology" (2ª Ed.), Gower Medical Publishing, Londres, Nueva York (1989), también en cuanto a los antecedentes generales citados en este documento. Además, a menos que se indique lo contrario, todos los procedimientos, pasos, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle se pueden realizar y se han realizado de una manera conocida per se, como será evidente para el experto. Se hace referencia de nuevo, por ejemplo, a los manuales estándar, a los antecedentes generales mencionados anteriormente y a las referencias adicionales citadas en ellos.

b) A menos que se indique lo contrario, los términos "inmunoglobulina" y "secuencia de inmunoglobulina", ya sea que se utilicen en este documento para referirse a un anticuerpo de cadena pesada o a un anticuerpo de 4 cadenas convencional, se utilizan como términos generales para incluir tanto el anticuerpo de tamaño completo, las cadenas

individuales del mismo, así como todas las partes, dominios o fragmentos del mismo (incluidos, entre otros, dominios de unión a antígenos o fragmentos tales como dominios VHH o dominios VH/VL, respectivamente). Además, el término "secuencia" como se usa en este documento (por ejemplo, en términos como "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia de anticuerpo", "secuencia de dominio variable (individual)", "secuencia de VHH" o "secuencia de proteína"), debe entenderse generalmente que incluye tanto la secuencia de aminoácidos relevante como también las secuencias de ácido nucleico o secuencias de nucleótidos que codifican el mismo, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada;

c) El término "dominio" (de un polipéptido o proteína) como se usa en este documento se refiere a una estructura de proteína plegada que tiene la capacidad de retener su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. Generalmente, los dominios son responsables de las propiedades funcionales discretas de las proteínas y, en muchos casos, se pueden añadir, eliminar o transferir a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio.

d) El término "dominio de inmunoglobulina" como se usa en este documento se refiere a una región globular de una cadena de anticuerpo (como, por ejemplo, una cadena de un anticuerpo convencional de 4 cadenas o de un anticuerpo de cadena pesada), o a un polipéptido que consiste esencialmente en tal región globular. Los dominios de inmunoglobulina se caracterizan porque retienen el pliegue de inmunoglobulina característico de las moléculas de anticuerpo, que consiste en un sándwich de 2 capas de aproximadamente 7 hebras beta antiparalelas dispuestas en dos hojas beta, opcionalmente estabilizadas por un enlace disulfuro conservado.

e) El término "dominio variable de inmunoglobulina" como se usa en el presente documento significa un dominio de inmunoglobulina que consiste esencialmente en cuatro "regiones marco" que se denominan en la técnica y en lo sucesivo "región marco 1" o "FR1"; como "región marco 2" o "FR2"; como "región marco 3" o "FR3"; y como "región marco 4" o "FR4", respectivamente; dichas regiones marco están interrumpidas por tres "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR", que se denominan en la técnica y más adelante como "región determinante de complementariedad 1" o "CDR1"; como "región determinante de complementariedad 2" o "CDR2"; y como "región determinante de complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente. Por tanto, la estructura general o secuencia de un dominio variable de inmunoglobulina se puede indicar como sigue: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. El o los dominios variables de inmunoglobulina son los que confieren especificidad a un anticuerpo para el antígeno al llevar el sitio de unión al antígeno.

f) El término "dominio variable individual de inmunoglobulina" como se usa en este documento significa un dominio variable de inmunoglobulina que es capaz de unirse específicamente a un epítipo del antígeno sin emparejarse con un dominio de inmunoglobulina variable adicional. Un ejemplo de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el sentido de la presente invención es "anticuerpos de dominio", tales como los dominios variables individuales de inmunoglobulina VH y VL (dominios de VH y dominios de VL). Otro ejemplo importante de dominios variables individuales de inmunoglobulina son los "dominios VHH" (o simplemente "VHH") de camélidos, como se define a continuación.

En vista de la definición anterior, el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de 4 cadenas convencional (como una molécula de IgG, IgM, IgA, IgD o IgE; conocida en la técnica) o de un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv tal como un fragmento Fv o un fragmento scFv unidos por disulfuro, o un diacuerpo (todos conocidos en la técnica) derivado de dicho anticuerpo convencional de 4 cadenas, normalmente no se consideraría un dominio variable individual de inmunoglobulina, ya que, en estos casos, la unión al epítipo respectivo de un antígeno normalmente no ocurriría por un (individual) dominio de inmunoglobulina sino por un par de dominios de inmunoglobulina (asociados) tales como dominios variables de cadena ligera y pesada, es decir, por un par VH-VL de dominios de inmunoglobulina, que se unen conjuntamente a un epítipo del antígeno respectivo.

f1) Los "dominios VHH", también conocidos como VHH, dominios V_HH, fragmentos de anticuerpos VHH y anticuerpos VHH, se han descrito originalmente como el dominio de inmunoglobulina (variable) de unión a antígeno de "anticuerpos de cadena pesada" (es decir, de "anticuerpos desprovistos de cadenas ligeras"; Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: "Anticuerpos naturales desprovistos de cadenas ligeras"; Nature 363, 446 - 448 (1993)). El término "dominio VHH" se ha elegido para distinguir estos dominios variables de los dominios variables de cadena pesada que están presentes en los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (que se denominan en el presente documento "dominios V_H" o "dominios VH") y de los dominios variables de cadena ligera que están presentes en los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (que se denominan en el presente documento "dominios V_L" o "dominios VL"). Los dominios VHH pueden unirse específicamente a un epítipo sin un dominio de unión a antígeno adicional (a diferencia de los dominios VH o VL en un anticuerpo convencional de 4 cadenas, en cuyo caso el epítipo es reconocido por un dominio VL junto con un dominio VH). Los dominios VHH son unidades de reconocimiento de antígenos pequeñas, robustas y eficientes formadas por un solo dominio de inmunoglobulina.

En el contexto de la presente invención, los términos dominio VHH, VHH, dominio V_HH, fragmento de anticuerpo VHH, anticuerpo VHH, así como "Nanobody®" y "dominio de Nanobody®" (donde "Nanobody" es una marca comercial de la empresa Ablynx N.V.; Gante; Bélgica) se utilizan indistintamente y son representantes de dominios variables

individuales de inmunoglobulina (que tienen la estructura: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 y se unen específicamente a un epítipo sin requerir la presencia de un segundo dominio variable de inmunoglobulina), y que también puede distinguirse de los dominios VH por los denominados "residuos distintivos", como se define en, por ejemplo, la publicación WO2009/109635, figura 1.

Los residuos de aminoácidos de un dominio VHH se numeran de acuerdo con la numeración general para los dominios V_H proporcionada por Kabat et al. ("Secuencia de proteínas de interés inmunológico", Servicios de Salud Pública de EE. UU., NIH Bethesda, MD, Publicación No. 91), según se aplica a los dominios VHH de Camelidos, como se muestra, por ejemplo, en la Figura 2 de Riechmann y Muyldermans, J. Immunol. Methods 231, 25-38 (1999). Según esta numeración,

- FR1 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 1-30,
- CDR1 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 31-35,
- FR2 comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49,
- CDR2 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 50-65,
- FR3 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 66-94,
- CDR3 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 95-102, y
- FR4 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 103-113.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, como es bien conocido en la técnica para los dominios V_H y para los dominios VHH, el número total de residuos de aminoácidos en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponder al número total de residuos de aminoácidos indicado por la numeración Kabat (es decir, una o más posiciones de acuerdo con la numeración Kabat pueden no estar ocupadas en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más residuos de aminoácidos que el número permitido para la numeración Kabat). Esto significa que, generalmente, la numeración según Kabat puede corresponder o no a la numeración real de los residuos de aminoácidos en la secuencia real.

En la técnica se conocen procedimientos alternativos para numerar los residuos de aminoácidos de los dominios V_H; dichos procedimientos también pueden aplicarse de manera análoga a los dominios VHH. Sin embargo, en la presente descripción, en las reivindicaciones y figuras, se seguirá la numeración según Kabat y aplicada a los dominios VHH como se describe anteriormente, a menos que se indique lo contrario.

El número total de residuos de aminoácidos en un dominio VHH estará normalmente en el intervalo de 110 a 120, a menudo entre 112 y 115. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las secuencias más pequeñas y más largas también pueden ser adecuadas para los fines descritos en este documento.

Otras características estructurales y propiedades funcionales de los dominios VHH y polipéptidos que los contienen se pueden resumir de la siguiente manera:

Los dominios VHH (que han sido "diseñados" por la naturaleza para unirse funcionalmente a un antígeno sin la presencia de, y sin ninguna interacción con, un dominio variable de cadena ligera) pueden funcionar como una unidad estructural de unión al antígeno funcional única, relativamente pequeña, dominio o polipéptido. Esto distingue los dominios VHH de los dominios VH y VL de los anticuerpos convencionales de 4 cadenas, que por sí mismos generalmente no son adecuados para la aplicación práctica como proteínas de unión a antígenos individuales o dominios variables individuales de inmunoglobulina, pero deben combinarse de una forma u otra para proporcionar una unidad funcional de unión a antígeno (como en, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos convencionales tales como fragmentos Fab; en scFv, que consisten en un dominio VH unido covalentemente a un dominio VL).

Debido a estas propiedades únicas, el uso de dominios VHH, ya sea solos o como parte de un polipéptido más grande, ofrece una serie de ventajas significativas sobre el uso de dominios VH y VL convencionales, scFv o fragmentos de anticuerpos convencionales (como fragmentos de Fab- o F(ab')₂):

- solo se requiere un dominio individual para unir un antígeno con alta afinidad y con alta selectividad, de modo que no hay necesidad de tener dos dominios separados presentes, ni asegurar que estos dos dominios estén presentes en la conformación y configuración espacial correctas (es decir, mediante el uso de enlazadores especialmente diseñados, como con los scFv);

- Los dominios VHH pueden expresarse a partir de un solo gen y no requieren plegamiento o modificaciones postraduccionales;

- Los dominios VHH pueden diseñarse fácilmente en formatos multivalentes y multiespecíficos (como se describe con más detalle en el presente documento);

- Los dominios VHH son muy solubles y no tienen tendencia a agregarse (como ocurre con los dominios de unión a antígenos derivados de ratón descritos por Ward et al., Nature 341: 544-546 (1989));

- Los dominios VHH son altamente estables al calor, pH, proteasas y otros agentes o condiciones desnaturalizantes y, por tanto, pueden prepararse, almacenarse o transportarse sin el uso de equipos de refrigeración, lo que conlleva un ahorro de costes, tiempo y medio ambiente;
- 5
- Los dominios VHH son fáciles y relativamente baratos de preparar, incluso en la escala requerida para la producción. Por ejemplo, los dominios VHH y los polipéptidos que los contienen pueden producirse usando fermentación microbiana (por ejemplo, como se describe más adelante) y no requieren el uso de sistemas de expresión de mamíferos como, por ejemplo, con fragmentos de anticuerpos convencionales;
- 10
- Los dominios VHH son relativamente pequeños (aproximadamente 15 kDa, o 10 veces más pequeños que una IgG convencional) en comparación con los anticuerpos de 4 cadenas convencionales y sus fragmentos de unión a antígeno, y, por lo tanto
- 15
- muestran una penetración alta o mayor en los tejidos y
 - se pueden administrar en dosis más altas que dichos anticuerpos de 4 cadenas convencionales y sus fragmentos de unión a antígeno;
- 20
- Los dominios VHH pueden mostrar las denominadas propiedades de unión a la cavidad (debido, entre otras cosas, a su bucle CDR3 extendido, en comparación con los dominios VH convencionales) y, por lo tanto, también pueden acceder a dianas y epítomos no accesibles a los anticuerpos convencionales de 4 cadenas y a sus fragmentos de unión a antígenos.
- 25
- Los procedimientos para obtener dominios VHH que se unen a un antígeno o epítomo específico se han descrito anteriormente, por ejemplo, en las publicaciones WO2006/040153 y WO2006/122786. Como también se describe allí en detalle, los dominios VHH derivados de camélidos pueden ser "humanizados" reemplazando uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de VHH original por uno o más de los residuos de aminoácidos que se encuentran en la posición o las posiciones correspondientes en un dominio VH de un anticuerpo convencional de 4 cadenas de un ser humano. Un dominio VHH humanizado puede contener una o más secuencias de la región marco humana y, en una forma de realización aún más específica, puede contener secuencias de una región marco humana derivadas de DP-29, DP-47, DP-51 o partes de las mismas, opcionalmente combinadas con secuencias JH, tales como JH5.
- 30
- f2) "Anticuerpos de dominio", también conocidos como "Dab", "Anticuerpos de dominio" y "dAbs" (los términos "Anticuerpos de dominio" y "dAbs" utilizados como marcas comerciales por el grupo de empresas GlaxoSmithKline) se han descrito en, por ejemplo, Ward, E.S. et al. "Actividades de unión de un repertorio de dominios variables de inmunoglobulina individuales secretados por *Escherichia coli* "; Nature 341: 544-546 (1989); Holt, L.J. et al.: "Anticuerpos de dominio: proteínas para terapia "; TRENDS in Biotechnology 21(11): 484-490 (2003) y la publicación WO2003/002609.
- 35
- 40
- Los anticuerpos de dominio corresponden esencialmente a los dominios VH o VL de mamíferos no camélidos, en particular anticuerpos de 4 cadenas humanas. Para unir un epítomo como un dominio individual de unión a antígeno, es decir, sin estar emparejado con un dominio VL o VH, respectivamente, se requiere una selección específica para tales propiedades de unión a antígeno, por ejemplo, utilizando bibliotecas de secuencias de dominio VH o VL únicas humanas. Los anticuerpos de dominio tienen, como los VHH, un peso molecular de aproximadamente 13 a
- 45
- aproximadamente 16 kDa y, si se derivan de secuencias completamente humanas, no requieren humanización para, por ejemplo, uso terapéutico en humanos. Como en el caso de los dominios VHH, también se expresan bien en sistemas de expresión procarióticos, lo que proporciona una reducción significativa en el coste de fabricación general.
- 50
- Los anticuerpos de dominio, así como los dominios VHH, pueden someterse a maduración por afinidad mediante la introducción de una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos de una o más CDR; tales alteraciones dan como resultado una afinidad mejorada del dominio variable individual de inmunoglobulina resultante para su respectivo antígeno, en comparación con la molécula parental respectiva. Las moléculas de dominio variable individual de inmunoglobulina maduras por afinidad de la invención pueden prepararse mediante procedimientos conocidos en
- 55
- la técnica, por ejemplo, como se describe en Marks et al., 1992, Biotechnology 10: 779-783, o Barbas, et al., 1994, Proc. Nat. Acad. Sci, Estados Unidos 91:3809-3813.; Shier et al., 1995, Gene 169: 147-155; Yelton et al., 1995, Immunol. 155: 1994-2004; Jackson et al., 1995, J. Immunol. 154 (7): 3310-9; y Hawkins et al., 1992, J. Mol. Biol. 226(3): 889 896; KS Johnson y RE Hawkins, "Maduración por afinidad de anticuerpos usando presentación de fagos", Oxford University Press 1996.
- 60
- f3) Además, también será claro para el experto que es posible "injertar" una o más de las CDR mencionadas anteriormente sobre otros "armazones", que incluyen, pero no se limitan a armazones humanos o armazones que no son de inmunoglobulina. Se conocen en la técnica armazones y técnicas adecuados para tal injerto de CDR. g) Los términos "epítomo" y "determinante antigénico", que pueden usarse indistintamente, se refieren a la parte de una macromolécula, como un polipéptido, que es reconocida por moléculas de unión a antígeno, como los anticuerpos convencionales o los polipéptidos de la invención, y más particularmente por el sitio de unión al antígeno de dichas
- 65

moléculas. Los epítomos definen el sitio de unión mínimo para una inmunoglobulina y, por lo tanto, representan la diana de especificidad de una inmunoglobulina.

La parte de una molécula de unión a antígeno (como un anticuerpo convencional o un polipéptido de la invención) que reconoce el epítomo se denomina paratopo.

h) El término molécula de unión "biparatópica" (antígeno) o polipéptido "biparatópico", como se usa en el presente documento, significará un polipéptido que comprende un primer dominio variable individual de inmunoglobulina y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina como se define aquí, en donde estos dos dominios variables son capaces de unión a dos epítomos diferentes de un antígeno; tales epítomos normalmente no están unidos al mismo tiempo por una inmunoglobulina monoespecífica como, por ejemplo, un anticuerpo convencional o un dominio variable individual de inmunoglobulina. Los polipéptidos biparatópicos según la invención están compuestos de dominios variables que tienen diferentes especificidades de epítomo y no contienen pares de dominios variables mutuamente complementarios que se unan al mismo epítomo. Por tanto, no compiten entre sí por unirse a LRP5 o LRP6.

i) Un polipéptido (como una inmunoglobulina, un anticuerpo, un dominio variable individual de inmunoglobulina, un polipéptido de la invención o, en general, una molécula de unión a antígeno o un fragmento de la misma) que puede "unirse", "unirse a", "unirse específicamente", o "unirse específicamente a", que "tiene afinidad por" y/o que "tiene especificidad por" un cierto epítomo, antígeno o proteína (o por al menos una parte, fragmento o epítomo del mismo) se dice que es "contra" o "dirigido contra" dicho epítomo, antígeno o proteína o es una molécula de unión "con respecto a dicho epítomo, antígeno o proteína.

k) Generalmente, el término "especificidad" se refiere al número de diferentes tipos de antígenos o epítomos a los que puede unirse una molécula de unión a antígeno o proteína de unión a antígeno particular (tal como una inmunoglobulina, un anticuerpo, un dominio variable individual de inmunoglobulina o un polipéptido de la invención). La especificidad de una proteína de unión a antígeno se puede determinar basándose en su afinidad y/o avidéz. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una proteína de unión a antígeno (K_D), es una medida de la fuerza de unión entre un epítomo y un sitio de unión a antígeno en la proteína de unión a antígeno: cuanto menor es el valor de K_D , más grande es la fuerza de unión entre un epítomo y la molécula de unión al antígeno (alternativamente, la afinidad también puede expresarse como la constante de afinidad (K_A), que es $1/K_D$). Como resultará evidente para el experto en la materia (por ejemplo, basándose en la descripción adicional en el presente documento), la afinidad se puede determinar de una manera conocida per se, dependiendo del antígeno específico de interés. La avidéz es la medida de la fuerza de unión entre una molécula de unión a antígeno (como una inmunoglobulina, un anticuerpo, un dominio variable individual de inmunoglobulina o un polipéptido de la invención) y el antígeno pertinente. La avidéz está relacionada con la afinidad entre un epítomo y su sitio de unión al antígeno en la molécula de unión al antígeno y el número de sitios de unión pertinentes, presentes en la molécula de unión al antígeno.

Normalmente, las proteínas de unión a antígenos (como los polipéptidos de la invención) se unirán con una constante de disociación (K_D) de $10E-5$ a $10E-14$ moles/litro (M) o menos, y preferiblemente de $10E-7$ a $10E-14$ moles/litro (M) o menos, más preferiblemente $10E-8$ a $10E-14$ moles/litro, e incluso más preferiblemente $10E-11$ a $10E-13$ (medido, por ejemplo, en un ensayo de Kinexa; conocido en la técnica), y/o con una constante de asociación (K_A) de al menos $10E7$ ME-1, preferiblemente al menos $10E8$ ME-1, más preferiblemente al menos $10E9$ ME-1, tal como al menos $10E11$ ME-1. En general, se considera que cualquier valor de K_D superior a $10E-4$ M indica una unión no específica. Preferiblemente, un polipéptido de la invención se unirá al antígeno deseado con una K_D menor que 500 nM, preferiblemente menor que 200 nM, más preferiblemente menor que 10 nM, tal como menor que 500 pM. La unión específica a un antígeno de un epítomo o proteína de unión a antígeno puede determinarse de cualquier manera adecuada conocida per se, incluidos, por ejemplo, los ensayos descritos en el presente documento, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competición en sándwich, y las diferentes variantes de los mismos conocidas per se en la técnica.

l) El término "reactividad cruzada" en relación con las moléculas de unión que son capaces de unirse a LRP5, así como a LRP6 ("reacción cruzada de LRP5/LRP6") pretende significar que dichas moléculas de unión pueden unirse específicamente a un epítomo comprendido en la molécula LRP5 y, alternativamente, también puede unirse específicamente a un epítomo comprendido en la molécula LRP6. Normalmente, tal reactividad cruzada puede surgir en el caso de que los epítomos de las diferentes proteínas unidas por dicha molécula de unión tengan una estructura y/o secuencia similar; por ejemplo, que representen epítomos conservados; por ejemplo, que sean compartidos por proteínas que pertenecen a la misma familia de proteínas (por ejemplo, LRP5 y LRP6, pertenecientes a la familia de proteínas LRP).

m) Los residuos de aminoácidos se indicarán de acuerdo con el código estándar de aminoácidos de tres letras o de una letra, como se conoce generalmente y se acuerda en la técnica. Cuando se comparan dos secuencias de aminoácidos, el término "diferencia de aminoácidos" se refiere a inserciones, deleciones o sustituciones del número indicado de residuos de aminoácidos en una posición de la secuencia de referencia, en comparación con una segunda secuencia. En caso de sustitución (es), dicha (s) sustitución (es) serán preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas, lo que significa que un residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido de

estructura química similar y que tiene poca o esencialmente ninguna influencia en la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Las sustituciones conservadoras de aminoácido son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, por el documento WO 98/49185, en el que las sustituciones conservativas de aminoácidos son preferiblemente sustituciones en las que un aminoácido dentro de los siguientes grupos (i) - (v) está sustituido por otro residuo de aminoácido dentro del mismo grupo: (i) pequeños residuos alifáticos, apolares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (ii) residuos polares cargados negativamente y sus amidas (no cargadas): Asp, Asn, Glu y Gln; (iii) residuos polares cargados positivamente: His, Arg y Lys; (iv) grandes residuos alifáticos apolares: Met, Leu, Ile, Val y Cys; y (v) residuos aromáticos: Phe, Tyr y Trp. Las sustituciones de aminoácidos conservativas particularmente preferidas son las siguientes:

Ala en Gly o en Ser;
 Arg en Lys;
 Asn en Gln o en His;
 Asp en Glu;
 Cys en Ser;
 Gln en Asn;
 Glu en Asp;
 Gly en Ala o en Pro;
 His en Asn o en Gln;
 Ile en Leu o en Val;
 Leu en Ile o en Val;
 Lys en Arg, en Gln o en Glu;
 Met en Leu, en Tyr o en Ile;
 Phe en Met, en Leu o en Tyr;
 Ser en Thr;
 Thr en Ser;
 Trp en Tyr;
 Tyr en Trp o en Phe;
 Val en Ile o en Leu

n) Se considera que una molécula de ácido nucleico o polipéptido está "(en) (forma) esencialmente aislada", por ejemplo, cuando se compara con su fuente biológica nativa y/o el medio de reacción o medio de cultivo del que se ha obtenido, cuando se ha separado de al menos otro componente con el que habitualmente se asocia en dicha fuente o medio, tal como otro ácido nucleico, otra proteína/polipéptido, otro componente biológico o macromolécula o al menos un contaminante, impureza o componente menor. En particular, una molécula de ácido nucleico o polipéptido se considera "esencialmente aislada" cuando se ha purificado al menos 2 veces, en particular al menos 10 veces, más en particular al menos 100 veces y hasta 1000 veces o más. Una molécula de ácido nucleico o polipéptido que está "en forma esencialmente aislada" es de modo preferible esencialmente homogénea, según se determina usando una técnica adecuada, tal como una técnica cromatográfica adecuada, tal como electroforesis en gel de poliacrilamida;

o) "Identidad de secuencia" entre, por ejemplo, dos secuencias de dominio variable individual de inmunoglobulina indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre estas dos secuencias. Puede calcularse o determinarse como se describe en el párrafo f) en las páginas 49 y 50 del documento WO2008/020079. "Similitud de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones conservadoras de aminoácidos.

Especificidad de diana

Los polipéptidos de la invención tienen especificidad para LRP5, así como para LRP6, ya que comprenden dominios variables individuales de inmunoglobulina que se unen específicamente a epítomos incluidos en ambas moléculas (moléculas de unión de reacción cruzada LRP5/LRP6).

Las moléculas de la invención se unirán a las formas humanas de LRP5 y LRP6, y preferiblemente también a sus contrapartes en otras especies relevantes para desarrollo de fármacos, es decir, LRP5 y LRP6 de cynomolgus (macaco cangrejero) y ratón.

Polipéptidos de la invención

En su sentido más amplio, la invención proporciona nuevos agentes farmacológicamente activos para el tratamiento de enfermedades cancerosas, como se caracterizan en las reivindicaciones. Los agentes de acuerdo con la invención pertenecen a una nueva clase de moléculas de unión, más precisamente polipéptidos biparatópicos de reacción cruzada LRP5/LRP6, que comprenden dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina que se unen a LRP5 y/o LRP6 en diferentes epítomos. Los términos "reactivo cruzado" y "biparatópico" se han explicado anteriormente, de modo que las moléculas biparatópicas de reactividad cruzada LRP5/LRP6 pueden definirse como moléculas que pueden unirse a LRP5 en dos epítomos diferentes comprendidos en la proteína LRP5, y que también pueden unirse a LRP6 en los dos epítomos correspondientes comprendidos en la proteína LRP6.

Más específicamente, los polipéptidos de la invención incluyen:

- un primer dominio variable individual de inmunoglobulina que es capaz de unirse específicamente a LRP5, así como a LRP6 (reactividad cruzada de LRP5/LRP6) a través de un epítipo/de una manera que da como resultado la inhibición de la vía de señalización de Wnt1, de modo que se inhibe la transcripción del gen diana impulsada por Wnt1, y

- un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina que es capaz de unirse específicamente a LRP5, así como a LRP6 (reactividad cruzada de LRP5/LRP6) a través de un epítipo/de una manera que da como resultado la inhibición de la vía de señalización de Wnt3a, de modo que se inhibe la transcripción del gen diana impulsada por Wnt3a.

Debido a los dos dominios variables individuales de inmunoglobulina presentes en dicho polipéptido, en los que los dos dominios se unen a diferentes epítopos (relacionados con la señalización de Wnt1/Wnt3a), estas moléculas son moléculas de unión biparatópicas. Este modo de unión biparatópica se muestra esquemáticamente en la Figura 1.

En este contexto, cabe señalar que se supone que los polipéptidos de la invención pueden unirse a una única molécula de LRP5 o LRP6 a través de sus dos dominios de unión de LRP5/LRP6, como se muestra en la Fig. 1 (modo de unión intramolecular). Sin embargo, también pueden ocurrir otros modos de unión.

Finalmente, se asume que los polipéptidos de la invención son capaces de competir con DKK1 - un ligando natural de LRP5 y LRP6, e interferir con la señalización de Wnt1 y Wnt3a - para unirse a LRP5 y LRP6, inhibiendo así tanto a Wnt1 como la vía de señalización de Wnt3a. Sin embargo, tampoco debe entenderse que esta teoría limita el alcance de la invención.

Más específicamente, como se caracteriza en las reivindicaciones, los polipéptidos de acuerdo con la invención se unen específicamente a LRP5 o LRP6, en donde dichos polipéptidos comprenden un primer dominio variable individual de inmunoglobulina (a) seleccionado del grupo de dominios variables individuales de inmunoglobulina (i) a (iii) definidos por tener lo siguiente secuencias de CDR:

(i):

CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)
 CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)
 CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

[= CDRs del dominio Wnt1-333E06mod]

(ii):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)
 CDR2: AIRRSGRRYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)
 CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6)

[= CDRs del dominio Wnt1-333G06]

(iii):

CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)
 CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)
 CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEY (= SEQ ID NO:9)

[= CDRs del dominio Wnt1-332D03mod],

y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina (b) seleccionado del grupo de dominios variables individuales de inmunoglobulina (iv) y (v) definidos por tener las siguientes secuencias de CDR:

(iv):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)
 CDR2: AISWGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)
 CDR3: SPIPYGSLRRRRNNYDY (= SEQ ID NO:12)

[= CDRs del dominio Wnt3a-093A01]

(v):

5

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)
 CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)
 CDR3: DPRGYGVAYVSAYEY (= SEQ ID NO:15)

[= CDRs del dominio Wnt3a-367B10].

10 El uso de los términos "primero" y "segundo" con respecto a dichos dominios variables individuales de inmunoglobulina está destinado únicamente a indicar que estos dominios son dominios diferentes, ya que incluirán diferentes secuencias de CDR y se unirán a diferentes epítomos. Sin embargo, no se entenderá que estos términos se refieren al orden o secuencia exactos de los dominios dentro de dicha cadena polipeptídica. En otras palabras, los dominios variables individuales de inmunoglobulina (a) y (b) anteriores pueden estar dispuestos en el orden (a) - (b) o en el
 15 orden (b) - (a) dentro de dicho polipéptido de la invención.

El término "unirse específicamente a LRP5 o LRP6" pretende significar que los dominios variables individuales de inmunoglobulina (a) y (b) tienen reactividad cruzada con respecto a LRP5 y LRP6. Por supuesto, las propiedades de unión de tales moléculas están determinadas por sus secuencias (CDR), de modo que la característica "unión específica a LRP5 o LRP6" expuesta anteriormente y en las reivindicaciones solo pretende ilustrar la utilidad de la
 20 invención, y no limitar el alcance de esta invención.

Los dominios variables individuales de inmunoglobulina típicamente consisten esencialmente en cuatro regiones marco (FR1 a FR4, respectivamente) y tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente). Para ubicarse dentro de un polipéptido, o cadena polipeptídica, dicho primer y segundo dominios variables individuales de inmunoglobulina necesitan estar unidos covalentemente, ya sea directamente o mediante un péptido enlazador.
 25

Por tanto, la estructura general de las moléculas de la invención también se puede representar como sigue:

30 FR(a) 1 - CDR(a) 1 - FR(a) 2 - CDR(a) 2 - FR(a) 3 - CDR(a) 3 - FR(a) 4 - [péptido enlazador] - FR(b) 1 - CDR(b) 1 - FR(b) 2 - CDR(b) 2 - FR(b) 3 - CDR(b) 3 - FR(b) 4 donde

35 FR(a) denota una región marco del primer dominio variable individual de inmunoglobulina,

FR(b) denota una región marco del segundo dominio variable individual de inmunoglobulina,

CDR(a) denota una CDR del primer dominio variable individual de inmunoglobulina,

40 CDR(b) denota una CDR del segundo dominio variable individual de inmunoglobulina, [péptido enlazador] indica un péptido enlazador que puede estar presente opcionalmente,

en donde las CDR tienen las secuencias como se indica arriba.

45 Nuevamente, se entenderá que (a) y (b) pueden intercambiarse; es decir, que las moléculas que tienen la estructura general FR(b)1 - CDR(b)1 - FR(b)2 - CDR(b)2 - FR(b)3 - CDR(b)3 - FR(b)4 - [péptido enlazador] - FR (a)1 - CDR(a)1 - FR(a)2 - CDR(a)2 - FR(a)3 - CDR(a)3 - FR(a)4 también estarán incluidas en la presente invención.

El péptido enlazador opcionalmente comprende o consiste en un tercer dominio como, por ejemplo, un dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina, como el dominio Alb11, que comprende las siguientes CDR:

CDR(Alb11)1: SFGMS (= SEQ ID NO:16)
 CDR(Alb11)2: SISGSGSDTYADSVKG (= SEQ ID NO:17)
 CDR(Alb11)3: GGSLSR (= SEQ ID NO:18)

55 Esto da como resultado un grupo de polipéptidos de la invención que tiene la siguiente estructura general:

FR(a) 1 - CDR(a)1 - FR(a)2 - CDR(a)2 - FR(a) 3 - CDR(a) 3 - FR(a) 4 - [péptido enlazador] - FR (Alb11)1 - CDR (Alb11)1 - FR (Alb11)2 - CDR (Alb11)2 - FR (Alb11) 3 - CDR (Alb11) 3 - FR (Alb11) 4 - [péptido enlazador] - FR(b)1 - CDR(b)1 - FR(b)2 - CDR(b)2 - FR(b) 3 - CDR(b) 3 - FR(b) 4.

60

Nuevamente, el orden de los tres dominios variables individuales de inmunoglobulina (a), (b) y Alb11 no es fijo, sino polipéptidos en los que los dominios anteriores están dispuestos en el orden:

(b) - Alb11 - (a)

5 también se incluirán.

Además, los polipéptidos que tienen el dominio Alb11 en el extremo N- o C-terminal del polipéptido (por ejemplo, Alb11- (a) - (b), Alb11- (b) - (a), (a) - (b) - Alb11, o (b) - (a) - Alb11) también se incluirán en la invención.

10 En tres formas de realización preferidas, los polipéptidos de la invención incluyen dominios variables individuales de inmunoglobulina definidos como sigue:

15 Primera forma de realización preferida: polipéptidos que comprenden un primer dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene las siguientes secuencias de CDR:

CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)
 CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)
 CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

20 y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene las siguientes secuencias de CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)
 CDR2: AISWGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)
 CDR3: SPIPYGSLRRRNNDY (= SEQ ID NO:12).

25 Segunda forma de realización preferida: polipéptidos que comprenden un primer dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene las siguientes secuencias de CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)
 CDR2: AIRRSGRRYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)
 CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6)

y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene las siguientes secuencias de CDR:

30 CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)
 CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)
 CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEEY (= SEQ ID NO:15).

Tercera forma de realización preferida: polipéptidos que comprenden un primer dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene las siguientes secuencias de CDR:

35 CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)
 CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)
 CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEEY (= SEQ ID NO:9)

y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene las siguientes secuencias de CDR:

40 CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)
 CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)
 CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEEY (= SEQ ID NO:15).

Por supuesto, las variantes tal como están expuestas anteriormente, es decir, que incluyen opcionalmente péptidos enlazadores y/o dominios adicionales, en especial que incluyen un dominio Alb11, diferentes órdenes de los dominios variables individuales de inmunoglobulina también se aplicarán a estas tres formas de realización preferidas.

45 En una forma de realización específicamente preferida, el dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina se encuentra entre los dos dominios variables individuales de inmunoglobulina de unión a LRP5/LRP6. Por tanto, pueden contemplarse tres formas de realización específicamente preferidas como sigue:

Primera forma de realización específicamente preferida: polipéptidos que comprenden un primer dominio variable individual de inmunoglobulina (de unión a LRP5/LRP6) que tiene las siguientes secuencias de CDR:

CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)
 CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)
 CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

5 un dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina que tiene las siguientes secuencias de CDR:

CDR1: SFGMS (= SEQ ID NO:16)
 CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:17)
 CDR3: GGSLSR (= SEQ ID NO:18);

10 y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina (unión a LRP5/LRP6) que tiene las siguientes secuencias de CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)
 CDR2: AISWGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)
 CDR3: SPIPYGSLRRRRNNYDY (= SEQ ID NO:12);

15 ya sea en este orden, o se cambia el orden de los dominios anteriores.

Segunda forma de realización específicamente preferida: polipéptidos que comprenden un primer dominio variable individual de inmunoglobulina (de unión a LRP5/LRP6) que tiene las siguientes secuencias de CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)
 CDR2: AIRRSGRRTYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)
 CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6);

20 un dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina que tiene las siguientes secuencias de CDR:

CDR1: SFGMS (= SEQ ID NO:16)
 CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:17)
 CDR3: GGSLSR (= SEQ ID NO:18);

25 y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina (de unión a LRP5/LRP6) que tiene las siguientes secuencias de CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)
 CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)
 CDR3: DPRGYGVAYVSAYYDY (= SEQ ID NO:15);

30 ya sea en este orden, o se cambia el orden de los dominios anteriores.

Tercera forma de realización específicamente preferida: polipéptidos que comprenden un primer dominio variable individual de inmunoglobulina (de unión a LRP5/LRP6) que tiene las siguientes secuencias de CDR:

CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)
 CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)
 CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYDY (= SEQ ID NO:9);

35 un dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina que tiene las siguientes secuencias de CDR:

CDR1: SFGMS (= SEQ ID NO:16)
 CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:17)
 CDR3: GGSLSR (= SEQ ID NO:18);

40

y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina (unión a LRP5/LRP6) que tiene las siguientes secuencias de CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)
 CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)
 CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEEY (= SEQ ID NO:15);

ya sea en este orden, o se cambia el orden de los dominios anteriores.

Las secuencias de CDR mencionadas anteriormente se resumen en las Tablas IA, IB e IC:

TABLA IA: Secuencias de CDR de dominios variables individuales de inmunoglobulina que interfieren con la señalización de Wnt1:

	Wnt1-333E06mod	Wnt1-333G06	Wnt1-332D03mod
CDR1	TYTVG (SEQ ID NO:1)	SYAMG (SEQ ID NO:4)	RYTMG (SEQ ID NO:7)
CDR2	AIRRRGSSTYYADS VKG (SEQ ID NO:2)	AIRRSGRRTYYADSVK G (SEQ ID NO:5)	AIVRSGGSTYYADS VKG (SEQ ID NO:8)
CDR3	DTRTVALLQYRYDY (SEQ ID NO: 3)	ARRVRSSTRYNTGTW WWEY (SEQ ID NO:6)	DRRGRGENYILLYS SGRYEY (SEQ ID NO:9)

TABLA IB: Secuencias CDR de dominios variables individuales de inmunoglobulina que interfieren con la señalización de Wnt3a:

	Wnt3a-093A01	Wnt3a-367B10
CDR1	SYAMG (SEQ ID NO:10)	SYAMG (SEQ ID NO:13)
CDR2	AISWSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:11)	AISWRSGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:14)
CDR3	SPIPYGSLRRRRNNYDY (SEQ ID NO:12)	DPRGYGVAYVSAYYEEY (SEQ ID NO:15)

TABLA IC: Secuencias de CDR del dominio variable individual de inmunoglobulina de la unión a la albúmina sérica (dominio Alb11):

	Dominio Alb11
CDR1	SFGMS (SEQ ID NO:16)
CDR2	SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO:17)
CDR3	GGSLSR (SEQ ID NO:18)

Además de las secuencias de CDR expuestas anteriormente, los dominios variables individuales de inmunoglobulina comprendidos en los polipéptidos de la invención incluyen secuencias de la región marco (FR) de inmunoglobulina. Estas secuencias preferiblemente no son inmunogénicas en humanos y, por lo tanto, preferiblemente son secuencias de FR humanas o humanizadas. Las secuencias de FR humanas o humanizadas adecuadas se conocen en la técnica. Se pueden tomar secuencias de FR específicamente preferidas de las formas de realización que se muestran más adelante, que describen los dominios variables individuales de inmunoglobulina completos y, por lo tanto, secuencias de CDR, así como secuencias de FR.

Según una forma de realización más específica, los polipéptidos de la invención incluyen dominios variables individuales de inmunoglobulina que son dominios VHH, y preferiblemente dominios VHH humanizados.

Según una forma de realización aún más específica, los polipéptidos de la invención incluyen un primer dominio variable individual de inmunoglobulina (a) seleccionado del grupo que consiste en dominios variables individuales de inmunoglobulina (i) a (iii) que tienen las siguientes secuencias:

(i)

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKEREFVA
AIRRRGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCAA
DTRTVALLQYRYDYWGQGLTVTVSS

5 [= dominio de Wnt1-333E06mod; = SEQ ID NO:19]

(ii)

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA
AIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCAA
ARRVRSSTRYNTGTWWWEYWGQGLTVTVSS

10 [= dominio de Wnt1-333G06; = SEQ ID NO:20],

y

15 (iii)

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKEREFVA
AIVRSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCAA
DRRGRGENYILLYSSGRYEYWGQGLTVTVSS

20 [= dominio de Wnt1-332003mod; = SEQ ID NO:21],

y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina (b) seleccionado del grupo que consiste en dominios variables individuales de inmunoglobulina (iv) y (v) que tiene las siguientes secuencias:

(iv)

25

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA
AISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCAA
SPIPYGSLRRRNNYDYWGQGLTVTVSS

[= dominio de Wnt3a-093A01; = SEQ ID NO:22],

30 y

(v)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA
AISWRSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCAA
DPRGYGVAYVSAYYEYWGQGLTVTVSS

35

[= dominio de Wnt3a-367B10; = SEQ ID NO:23].

Las formas de realización preferidas son polipéptidos que comprenden

40 - un primer dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 19 y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 22; o

45 - un primer dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 20 y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 23; o

- un primer dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 21 y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 23.

5 Por tanto, las formas de realización anteriores se pueden presentar esquemáticamente como isvd (a) - [péptido enlazador] - isvd (b), en el que "isvd" indica el dominio variable individual de inmunoglobulina respectivo, y en el que, por lo demás, se aplicarán las mismas definiciones y variantes que se han establecido anteriormente, especialmente con respecto a la presencia de péptidos enlazadores opcionales y/o dominios adicionales, especialmente un dominio Alb11, y con respecto a diferentes órdenes de los dominios variables individuales de inmunoglobulina.

10 Según formas de realización específicas de la invención, los polipéptidos anteriores pueden incluir adicionalmente un residuo que prolonga la vida media, en donde dicho residuo que extiende la vida media está unido covalentemente a dicho polipéptido y se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en un residuo que se une a la albúmina, tal como un péptido de unión a albúmina o un dominio de inmunoglobulina de unión a albúmina, preferiblemente un dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina, más preferiblemente el dominio Alb11, un residuo de unión a transferrina, tal como un dominio de inmunoglobulina anti-transferrina, una molécula de polietilenglicol, albúmina sérica, preferiblemente albúmina sérica humana y un fragmento de albúmina sérica (humana).

15 La secuencia del dominio variable individual de inmunoglobulina Alb11 mencionado anteriormente es la siguiente:

20 EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSFSGMSWVRQAPGKGLEW
VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI
GGSLRSSQGLTVTVSS

(= dominio Alb11; = SEQ ID NO:24)

25 Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de dominios variables individuales de inmunoglobulina que se unen a albúmina sérica humana, y se describen con más detalle, por ejemplo, en publicaciones internacionales de patentes WO2006/122787 y WO2008/028977. Se describen otros péptidos que se unen a la albúmina sérica humana, por ejemplo, en los documentos WO2008/068280, WO2009/127691 y WO2011/095545.

30 Por tanto, tres formas de realización específicas preferidas de la invención son las siguientes:

Primera forma de realización específica preferida: polipéptidos que comprenden

35 - un primer dominio variable individual de inmunoglobulina (de unión a LRP5/LRP6) que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 19;

- un dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 24;

40 - un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina (de unión a LRP5/LRP6) que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID NO: 22;

ya sea en este orden, o se cambia el orden de los tres dominios anteriores.

45 Segunda forma de realización específica preferida: polipéptidos que comprenden

- un primer dominio variable individual de inmunoglobulina (de unión a LRP5/LRP6) que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 20;

50 - un dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 24;

- un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina (de unión a LRP5/LRP6) que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 23;

55 ya sea en este orden, o se cambia el orden de los tres dominios anteriores.

Tercera forma de realización específica preferida: polipéptidos que comprenden

60 - un primer dominio variable individual de inmunoglobulina (de unión a LRP5/LRP6) que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 21;

- un dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 24;

5 - un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina (de unión a LRP5/LRP6) que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 23;

ya sea en este orden, o se cambia el orden de los tres dominios anteriores.

10 En formas de realización incluso más específicamente preferidas, el dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina se encuentra entre los dos dominios variables individuales de inmunoglobulina de unión a LRP5/LRP6.

15 Las secuencias de los dominios variables individuales de inmunoglobulina mencionados anteriormente se resumen en las Tablas IIA, IIB e IIC:

TABLA IIA: Secuencias de dominios variables individuales de inmunoglobulina que interfieren con la señalización de Wnt1:

VHH ID SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Wnt1-333E06 mod	AVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCAA SGRTFS	TYTVG	WFRQAPG KEREFVA	AIRRRGS STYYADS VKG	RFTISRDNKNTVYL QMNSLRPEDTAVVY CAA	DTRTVA LLQRY DY	WGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:19							
Wnt1-333G06	AVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCAA SGGTFS	SYAMG	WFRQAPG KEREFVA	AIRRSGR RTYYADS VKG	RFTISRDNKNTVYL QMNSLRPEDTAVVY CAA	ARRVRS STRYNT GTWW WEY	WGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:20							
Wnt1-332D03 mod	AVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCAA SGLTFS	RYTMG	WFRQAPG KEREFVA	AIVRSGG STYYADS VKG	RFTISRDNKNTVYL QMNSLRPEDTAVVY CAA	DRRGR GENYILL YSSGRY EY	WGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:21							

TABLA IIB: Secuencias de dominios variables individuales de inmunoglobulina que interfieren con la señalización de Wnt3a:

VHH ID SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Wnt3a-093A01	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCAA SGRTFS	SYAMG	WFRQAPG KEREFVA	AISWGG STYYADS VKG	RFTISRDNKNTVYL QMNSLRPEDTAVY CAA	SIPYGS LLRRRN NYDY	WGQGTL VTYSS
SEQ ID NO:22							
Wnt3a-367B10	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCAA SGGTFE	SYAMG	WFRQAPG KEREFVA	AISWRSG STYYADS VKG	RFTISRDNKNTVYL QMNSLRPEDTAVY CAA	DPRGY GVAVWS AYYEY	WGQGTL VTYSS
SEQ ID NO:23							

TABLA IIC: Secuencia de dominio variable individual de inmunoglobulina que se une a albúmina (dominio Alb11):

VHH ID SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Alb11 SEQ ID NO:24	EVQLVESG GGLVQPG NSLRISCA ASGFTFS	SFGMS	WVRQAPG KGLEWVS	SISGSGSD TLYADSV KG	RFTISRDNAKTTLYL QMNSLRPEDTAVYY CTI	GGSLSR	SSQGTLY TVSS

5 Como se indicó anteriormente, los (al menos dos) dominios variables individuales de inmunoglobulina presentes en un polipéptido de la invención se pueden unir entre sí directamente, sin el uso de un enlazador, o mediante un enlazador. El enlazador es preferiblemente un péptido enlazador y, según la invención, se seleccionará para permitir la unión de al menos dos dominios variables individuales de inmunoglobulina diferentes a cada uno de sus epítomos diana.

10 Los enlazadores adecuados dependerán, entre otras cosas, de los epítomos y, específicamente, de la distancia entre los epítomos de las moléculas diana a las que se unirán los dominios variables individuales de inmunoglobulina. Esto resultará evidente para el experto en la materia basándose en la descripción de este documento, opcionalmente después de cierto grado limitado de experimentación de rutina.

15 Por tanto, los enlazadores adecuados pueden comprender una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, que tiene una longitud de 9 o más aminoácidos, preferiblemente al menos 17 aminoácidos, tales como aproximadamente 20 a 40 aminoácidos. La secuencia enlazadora puede ser una secuencia de origen natural o una secuencia de origen no natural. Si se usa con fines terapéuticos, el enlazador es preferiblemente no inmunogénico en el sujeto al que se administra el polipéptido de la invención.

20 Un grupo útil de secuencias enlazadora son los enlazadores derivados de la región bisagra de los anticuerpos de cadena pesada como se describe en los documentos WO 1996/34103 y WO1994/04678. Otros ejemplos son secuencias enlazadoras de polialanina tales como Ala-Ala-Ala.

25 Otros ejemplos preferidos de secuencias enlazadoras son enlazadores Gly/Ser de diferente longitud tales como enlazadores $(\text{gly}_x\text{ser}_y)_z$, incluyendo, por ejemplo, $(\text{gly}_4\text{ser})_3$, $(\text{gly}_4\text{ser})_5$, $(\text{gly}_4\text{ser})_7$, $(\text{gly}_3\text{ser})_3$, $(\text{gly}_3\text{ser})_5$, $(\text{gly}_3\text{ser})_7$, $(\text{gly}_3\text{ser}_2)_3$, $(\text{gly}_3\text{ser}_2)_5$ y $(\text{gly}_3\text{ser}_2)_7$.

30 Alternativamente, o además de un enlazador polipeptídico, los al menos dos dominios variables individuales de inmunoglobulina presentes en un polipéptido de la invención pueden unirse entre sí a través de otro residuo, tal como otro polipéptido que, en una forma de realización preferida pero no limitante, puede ser un dominio variable individual de inmunoglobulina como ya se describió anteriormente. Tal residuo puede ser esencialmente inactivo o puede tener un efecto biológico tal como mejorar las propiedades deseadas del polipéptido o puede conferir una o más propiedades deseadas adicionales al polipéptido. Como ya se ha expuesto anteriormente, un dominio polipeptídico adicional preferido aumentará la vida media del polipéptido, tal como un dominio de unión de albúmina de suero (humano), tal como el dominio Alb11.

35 Por tanto, de acuerdo con una forma de realización adicional, la invención incluye específicamente polipéptidos que comprenden cualquiera de las siguientes secuencias, en donde las secuencias de aminoácidos exactas se pueden tomar de la Tabla III a continuación:

40 SEQ ID NO:25 (= secuencia del polipéptido F013500575),

SEQ ID NO:26 (= secuencia del polipéptido F013500571),

45 y

SEQ ID NO:27 (= secuencia del polipéptido F013500720).

50 Según una forma de realización aún más específica, los polipéptidos de la invención se seleccionan del siguiente grupo de moléculas:

Polipéptido F013500575, que tiene la secuencia SEQ ID NO:25,

Polipéptido F013500571, que tiene la secuencia SEQ ID NO:26, y

55 Polipéptido F013500720, que tiene la secuencia SEQ ID NO:27.

Tabla III: Secuencias de tres formas de realización específicas de polipéptidos de la invención.

ID SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos (secuencias CDR subrayadas)
F013500575 SEQ ID NO:25	<u>AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKEREFVAAIRRRGSSTYYA</u> <u>DSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTRTVALLQYRYDYWGQGLTVTV</u> SSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRL SCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYL QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA <u>AISWSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAASPIPYGSLRRRN</u> <u>NYDYWGQGLTVTVSSA</u>
F013500571 SEQ ID NO:26	<u>AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAIRRSGRRTYY</u> <u>ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAARRVRSSTRYNTGTWWWEYW</u> GQGLTVTVSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN NAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAP GKEREFVAISWRSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADPRG <u>YGVAYSAYEYWGQGLTVTVSSA</u>
F013500720 SEQ ID NO:27	<u>AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKEREFVAAIVRSGGSTYY</u> <u>ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADRRGRGENYILLSSGRYEWGQ</u> GTLTVTVSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN KTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGK EREFVAISWRSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADPRGYG <u>VAYSAYEYWGQGLTVTVSSA</u>

5 Como se explicó anteriormente, a menos que se indique lo contrario, los polipéptidos de la invención pueden incluir residuos adicionales y/o dominios polipeptídicos adicionales, siempre que su unión a LRP5/LRP6 no sea impedida por dicho residuo o dominio adicional.

10 Los polipéptidos de la invención pueden contener adicionalmente modificaciones tales como residuos de glicosilo o cadenas laterales de aminoácidos modificadas, y pueden ser PEGilados para aumentar la vida media y otras propiedades de dicha molécula. Pueden tomarse técnicas y reactivos útiles para PEGilar constructos de dominio variable individual de inmunoglobulina biperatópica, por ejemplo, de la publicación WO2011/107507.

15 Los polipéptidos de la invención pueden tener una secuencia N-terminal modificada, por ejemplo, una delección de uno o más de los aminoácidos N-terminales, o un intercambio de, por ejemplo, el primero, aminoácido N-terminal (por ejemplo, glutamato a alanina), para optimizar la molécula para que se exprese mediante el uso de ciertos sistemas de expresión (como vectores específicos o células anfitrionas), o para que se exprese como cuerpos de inclusión o en forma soluble, o para ser secretado al medio o al espacio periplásmico o para estar contenido dentro de la célula, o por producir un producto más homogéneo. Los polipéptidos de la invención pueden tener una secuencia C-terminal modificada, tal como una alanina adicional (como se muestra para las tres formas de realización mostradas en la Tabla
 20 III anterior), y/o más intercambios de aminoácidos en la parte C-terminal o en otras posiciones definidas dentro de cualquiera de las regiones marco, como se explica, por ejemplo, en las publicaciones WO2012/175741, WO2011/075861 o WO2013/024059, con el fin de, por ejemplo, mejorar aún más la estabilidad o reducir la inmunogenicidad de tales polipéptidos.

25 Además, la vida media de los polipéptidos de la invención puede mejorarse añadiendo un dominio de albúmina, es decir, convirtiéndolos en proteínas de fusión de albúmina. Ejemplos de residuos de albúmina útiles y cómo añadirlos a moléculas de unión son proporcionados, por ejemplo, en las publicaciones WO2001/079271 y WO2003/059934.

30 Preferiblemente, los polipéptidos de la invención tienen valores de unión (EC₅₀), medidos en un ensayo de unión FACS como se describe en el Ejemplo 7.1 más adelante, en el intervalo de 10⁻⁶ moles/litro o menos, más preferiblemente 10⁻⁶

⁹ moles/litro o menos, e incluso más preferiblemente en el intervalo de 10^{-10} a 10^{-13} moles/litro, o tienen un valor de IC50 tal como es medido en un ensayo de marcador de Wnt1 y Wnt3a combinados como se establece en el ejemplo 7.3 más adelante, de 10^{-9} moles/litro o menos, y preferiblemente en el intervalo de 5×10^{-10} moles/litro a 10^{-12} moles/litro.

Los polipéptidos de la invención permiten un tratamiento más eficaz de varios tipos de cáncer, tales como TNBC, CRC y NSCLC. Tienen características in vitro mejoradas (es decir, mayor eficacia de la inhibición de la vía Wnt), cf., por ejemplo, los ejemplos 7 y 8 más adelante, y propiedades significativas de inhibición del crecimiento tumoral in vivo, que conducen a una mayor eficacia in vivo en comparación con otras moléculas de unión a LRP6 descritas en la técnica, como se muestra, por ejemplo, en los ejemplos 9 y 10 más adelante.

En particular, como se muestra in vivo en un modelo de tumor impulsado por Wnt, los constructos VHH humanizadas biparatópicas de vida media prolongada de reacción cruzada LRP5/LRP6 podrían inhibir la señalización de Wnt y el crecimiento tumoral in vivo, e incluso proporcionar una contracción sustancial del tumor (es decir, inhibición de crecimiento tumoral superior al 100%), lo que no podría lograrse, en las mismas condiciones experimentales, con un enlazador LRP6 conocido en la técnica. La contracción del tumor (es decir, la regresión del tumor) es, por supuesto, el efecto terapéutico deseado (es decir, la eficacia) para el tratamiento de pacientes con cáncer. Además, la regresión tumoral, que da como resultado una respuesta patológica completa (pCR), es un criterio de valoración clínico reconocido, que indica una mejora significativa de la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global.

En los mismos experimentos in vivo, no se observaron cambios significativos en el peso corporal (<10%) y los resultados de los análisis histopatológicos gastrointestinales no indicaron ningún efecto tóxico de los polipéptidos anteriores de la invención. Esto es específicamente sorprendente en vista de los estudios de expresión de DKK1 in vivo discutidos anteriormente (es decir, que dan como resultado la ulceración de la mucosa intestinal y la pérdida de peso corporal).

Por tanto, los polipéptidos de la invención proporcionan de hecho nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades cancerosas, y especialmente incluso para su uso en indicaciones de alta necesidad médica no satisfecha tales como cáncer de mama (triple negativo).

Sorprendentemente, los inventores llegaron a esta solución no siguiendo la ruta convencional, es decir, tratando de desarrollar inhibidores o moléculas de unión que tienen una alta especificidad/selectividad para un objetivo dado, como LRP6 (mencionado como una diana para el tratamiento de "enfermedades mediadas por señalización Wnt", por ejemplo, en la publicación WO2009/056634). En contraste con esto, los inventores desarrollaron moléculas dirigidas a dos proteínas relacionadas al mismo tiempo - LRP6 y LRP5 - y de ese modo lograron los efectos in vitro e in vivo significativamente mejorados anteriores que no se podían esperar de la técnica anterior.

El mecanismo molecular subyacente para esta superioridad no está completamente claro, pero se puede especular, sin desear estar vinculado a una teoría específica, que tales moléculas de reactividad cruzada pueden tener efectos adicionales y, por lo tanto, más fuertes en la cascada de señalización altamente complicada de la vía de señalización Wnt.

Los efectos ventajosos anteriores se ilustrarán adicionalmente en los ejemplos más adelante y mediante los datos comparativos incluidos en ellos.

Además, los polipéptidos de la invención son fáciles de fabricar y son más solubles, lo que significa que pueden almacenarse y/o administrarse en concentraciones más altas en comparación con los anticuerpos convencionales. Son estables a temperatura ambiente y tienen una estabilidad prolongada incluso a pH extremos, por lo que pueden prepararse, almacenarse y/o transportarse sin el uso de equipos de refrigeración, lo que supone un ahorro de costes, tiempo y medio ambiente. Por lo anterior y por su baja inmunogenicidad, además ofrecen una variedad de opciones en cuanto a vías de administración distintas a la inyección e infusión, así como en cuanto a regímenes de administración y usos de dispositivos específicos.

Ácidos nucleicos, vectores, células anfitrionas

Según otros aspectos, la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico y vectores de expresión que codifican los polipéptidos de la invención, así como a células anfitrionas que expresan los mismos. Estos ácidos nucleicos, vectores y células anfitrionas son útiles para fabricar los polipéptidos de la invención, y más adelante se describirán aspectos y formas de realización adicionales de los mismos en conexión con un esquema de los procedimientos de fabricación de los polipéptidos de la invención.

Uso terapéutico

Debido a sus propiedades biológicas, los polipéptidos de la invención son adecuados para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una proliferación celular excesiva o anormal, como el cáncer y la fibrosis pulmonar idiopática (IPF).

Por ejemplo, los siguientes cánceres, tumores y otras enfermedades proliferativas pueden tratarse con polipéptidos de acuerdo con la invención, sin restringirse a los mismo:

5 Cánceres de cabeza y cuello; Cánceres de pulmón como, por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC); Neoplasias del mediastino como, por ejemplo, tumores neurogénicos y tumores mesenquimales; Cánceres del tracto gastrointestinal (GI) como, por ejemplo, cánceres de esófago, estómago (cáncer gástrico), páncreas, hígado y árbol biliar (incluyendo por ejemplo, carcinoma hepatocelular (HCC)) e intestino delgado y grueso (incluyendo, por ejemplo, cáncer colorrectal); Cánceres de próstata; Cánceres de testículo; Los cánceres ginecológicos como, por ejemplo, cánceres de ovario; Cánceres de mama como, por ejemplo, carcinoma de mama, cáncer positivo de mama con receptor hormonal, cáncer de mama positivo para Her2 y cáncer de mama triple negativo; Cánceres del sistema endocrino; Sarcomas de los tejidos blandos como, por ejemplo, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi; Sarcomas del hueso como, por ejemplo, mieloma, osteosarcoma, tumor de Ewing, fibrosarcoma, osteocondroma, osteoblastoma y condroblastoma; Mesoteliomas;

20 Cánceres de piel como, por ejemplo, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células de Merkel y melanoma; Neoplasias del sistema nervioso central y el cerebro como, por ejemplo, astrocitoma, glioblastoma, gliomas neuroblastomas y retinoblastomas; Linfomas y leucemias como por ejemplo, Linfomas no Hodgkin de células B (LNH), linfomas no Hodgkin de células T, leucemia linfocítica de células B crónica (LLC-B), leucemia linfocítica de células T crónica (T-CLL), enfermedad de Hodgkin (HD), leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia mielógena/mieloide aguda (AML), leucemia linfática/linfoblástica aguda (ALL), mieloma múltiple (MM), plasmocitoma y síndromes mielodisplásicos (MDS); y cánceres de sitio primario desconocido.

25 Todos los cánceres, tumores, neoplasias, etc., mencionados anteriormente, que se caracterizan por su ubicación/origen específico en el cuerpo, deben incluir tanto los tumores primarios como los tumores metastásicos derivados de los mismos.

30 Más específicamente, los polipéptidos de la invención son útiles para el tratamiento de enfermedades, y esp. enfermedades cancerosas en las que la proliferación celular anormal es causada por, o implica, señalización Wnt anormal (activada).

35 Por lo tanto, los polipéptidos de la invención son específicamente útiles para el tratamiento de tumores sólidos, y más específicamente para el tratamiento de cánceres de pulmón, hígado, colon, cerebro, tiroides, páncreas, mama, ovario y próstata, e incluso más específicamente para el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de mama triple negativo (TNBC) y cáncer colorrectal (CCR). En particular, los polipéptidos de la invención se pueden usar para tratar pacientes con TNBC localmente avanzado o metastásico, pacientes con NSCLC metastásico o CCR localmente avanzado o metastásico, como agente individual o en combinación, para prolongar la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia general (SO). Además, los polipéptidos de la invención pueden usarse como tratamiento neoadyuvante para pacientes con cáncer de mama para lograr una respuesta patológica completa (pCR; definida como la ausencia de cáncer residual invasivo e in situ mediante evaluación histopatológica de la muestra de mama resecada completa y todos los ganglios linfáticos regionales muestreados tras la finalización de la terapia sistémica neoadyuvante).

45 Los polipéptidos de la invención se pueden utilizar en regímenes terapéuticos en el contexto de tratamientos de primera línea, segunda línea o cualquier otra línea.

50 Los polipéptidos de la invención pueden usarse para la prevención, el tratamiento a corto o largo plazo de las enfermedades mencionadas anteriormente, opcionalmente también en combinación con radioterapia y/o cirugía.

55 Asimismo, los polipéptidos de la invención son específicamente útiles para el tratamiento de otras enfermedades causadas por la proliferación celular anormal que implica la vía de señalización Wnt, como la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) (Konigshoff et al. "Señalización funcional de Wnt aumenta en la fibrosis pulmonar idiopática". PLoS One 2008; 3 (5): e2142; Lam et al. "Correceptor de Wnt Lrp5 es un impulsor de la fibrosis pulmonar idiopática". Am J Respir Crit Care Med. 2014;190(2):185-95).

60 Además, los polipéptidos de la invención son específicamente útiles para el tratamiento de retinopatías, y esp. para el tratamiento de la retinopatía diabética, debido a la activación anormal de Wnt en las células internas de la retina, lo que provoca el aumento de la formación anormal de nuevos vasos retinianos que conduce al desarrollo y progresión de la retinopatía diabética (Chen, Y., et al. "Activación de la vía Wnt juega un papel patógeno en la retinopatía diabética en modelos humanos y animales" The Am J Pathol. 2009; 175(6):2676-85., Gao et al. "Niveles elevados de LRP6 se correlacionan con el factor de crecimiento endotelial vascular en el vítreo de la retinopatía diabética proliferativa" Mol Vis. 2015; 21:665-72).

65

Finalmente, como se pudo demostrar que la inhibición de las vías de señalización de Wnt1/Wnt3a también puede tener un efecto sobre las células dendríticas (DC) y la función de las células dendríticas, los polipéptidos de la invención también pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades inmunológicas e infecciosas, así como para influir en el microambiente tumoral en las diversas enfermedades cancerosas ya expuestas anteriormente. Los tumores suprimen activamente la inmunidad antitumoral y las CD desempeñan un papel importante en el mecanismo de inmunoescape del cáncer. En particular, los estudios han demostrado que los ligandos Wnt en el microambiente tumoral también pueden iniciar la señalización paracrina dentro de las células inmunes y regular la inmunidad antitumoral del anfitrión (Hong et al. "La beta-catenina promueve respuestas reguladoras de las células T en tumores al inducir el metabolismo de la vitamina A en células dendríticas". *Cancer Res.* 2015;75(4):656-665).

Por supuesto, lo anterior también incluye el uso de los polipéptidos de la invención en diversos procedimientos de tratamiento de las enfermedades anteriores mediante la administración de una dosis terapéuticamente eficaz a un paciente que lo necesita, así como el uso de estos polipéptidos para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de dichas enfermedades, así como composiciones farmacéuticas que incluyen dichos polipéptidos de la invención, así como la preparación y/o fabricación de medicamentos que incluyen dichos polipéptidos de la invención y similares.

Combinaciones con otras sustancias activas

Los polipéptidos de la invención se pueden usar solos o en combinación con otras sustancias farmacológicamente activas, tales como compuestos del estado de la técnica o estándar de atención tales como, por ejemplo, sustancias citostáticas o citotóxicas, inhibidores de la proliferación celular, sustancias anti-angiogénicas, esteroides, inmunomoduladores/inhibidores de puntos de control y similares.

Los principios activos citostáticos y/o citotóxicos que pueden administrarse en combinación con los compuestos según la invención incluyen, sin limitarse a ellos, hormonas, análogos de hormonas y antihormonas, inhibidores de aromatasa, agonistas y antagonistas de LHRH, inhibidores de factores de crecimiento (factores de crecimiento tales como como, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), factor de crecimiento epidérmico humano (HER, por ejemplo, HER2, HER3, HER4) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF); los inhibidores son, por ejemplo, anticuerpos del factor de (anti-)crecimiento, anticuerpos del receptor del factor de (anti-)crecimiento e inhibidores de la tirosina quinasa como, por ejemplo cetuximab, gefitinib, afatinib, nintedanib, imatinib, lapatinib, bosutinib y trastuzumab; antimetabolitos (por ejemplo, antifolatos como metotrexato, raltitrexed, análogos de pirimidina como 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina y gemcitabina, análogos de purina y adenosina como mercaptopurina, tioguanina, cladribina y pentostatina, citarabina (ara C), fludarabina); antibióticos antitumorales (por ejemplo, antraciclinas); derivados de platino (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino); agentes de alquilación (por ejemplo, estramustina, mecloretamina, melfalán, clorambucilo, busulfano, dacarbazina, ciclofosfamida, ifosfamida, temozolomida, nitrosoureas como, por ejemplo, carmustina y lomustina, tiotepa); agentes antimetabólicos (por ejemplo, alcaloides de la Vinca como, por ejemplo, vinblastina, vindesina, vinorelbina y vincristina; y taxanos como paclitaxel, docetaxel); inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de tubulina; Inhibidores de la síntesis de ADN, inhibidores de PARP, inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, epipodofilotoxinas como, por ejemplo, etopósido y etopofos, tenipósido, amsacrina, topotecán, irinotecán, mitoxantrona), inhibidores de serina/treonina quinasa (por ejemplo, inhibidores de PDK1, inhibidores de Raf, inhibidores de A-Raf, inhibidores de B-Raf, inhibidores de C-Raf, inhibidores de mTOR, inhibidores de mTORC1/2, inhibidores de PI3K, inhibidores de PI3Ka, inhibidores duales de mTOR/PI3K, inhibidores de STK33, inhibidores de AKT, inhibidores de PLK1 (tales como volasertib), inhibidores de CDK, inhibidores de Aurora quinasa), inhibidores de tirosina quinasa (por ejemplo, Inhibidores de PTK2/FAK), inhibidores de interacción proteína-proteína, inhibidores de MEK, inhibidores de ERK, inhibidores de FLT3, inhibidores de BRD4, inhibidores de IGF-1 R, agonistas de TRAILR2, inhibidores de Bcl-xL, inhibidores de Bcl-2, inhibidores de Bcl-2/Bcl-xL, Inhibidores del receptor ErbB, inhibidores BCR-ABL, inhibidores ABL, inhibidores Src, análogos de rapamicina (por ejemplo, everolimus, temsirolimus, ridaforolimus, sirolimus), inhibidores de la síntesis de andrógenos, inhibidores de los receptores de andrógenos, inhibidores de DNMT, inhibidores de HDAC, inhibidores de ANG1/2, inhibidores de CYP17, radiofármacos, agentes inmunoterapéuticos como inhibidores de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, moléculas de unión CTLA4, PD1, PD-L 1, LAG3 y TIM3 / inmunoglobulinas, como ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab), vacunas contra el cáncer como la vacuna tradicional contra tumores (vacunas basadas en células, por ejemplo, Sipuleucel-T para el tratamiento del cáncer de próstata), vacunas personalizadas de neoantígenos y virus oncolíticos, y diversos agentes quimioterapéuticos como amifostina, anagrelid, clodronat, filgrastina, interferón, interferón alfa, leucovorina, rituximab, procarbazona, levamisol, mesna, mitotano, pamidronato y porfímero.

Son particularmente preferidos los procedimientos de tratamiento que incluyen el uso de los polipéptidos de la invención en combinación con un fármaco seleccionado del grupo que consiste en:

(i) anticuerpos anti-VEGF (bevacizumab y otras sustancias antiangiogénicas) con o sin combinación de quimioterapia (incluida doxorubicina/combinación de ciclofosfamida y/o combinación de capecitabina/docetaxel en un entorno neoadyuvante; régimen de taxano/platino para el tratamiento de primera línea y línea posterior) en pacientes con cáncer de mama;

(ii) TKI EGFR para NSCLC mutante EGFR o crizotinib para NSCLC translocado ALK con o sin combinación de quimioterapia (terapia de combinación citotóxica basada en platino, que incluye gemcitabina/cisplatino en el tratamiento de primera línea; docetaxel o pemetrexed en el tratamiento de segunda línea en pacientes con cáncer de pulmón;

(iii) anticuerpos anti-EGFR (cetuximab y panitumumab en tumores de tipo silvestre KRAS) con o sin combinación de quimioterapia (incluida irinotecán), combinación de anticuerpos anti-VEGF (bevacizumab y otras sustancias antiangiogénicas) o combinación de regorafenib, por ejemplo, para el tratamiento de pacientes con CCR.

(iv) agentes inmunoterapéuticos, incluidos agentes anti-PD-1, tales como pembrolizumab y nivolumab, agentes anti-PD-L1, agentes anti-CTLA4, agentes anti-BTLA, agentes anti-LAG3 y agentes anti-TIM3, tales como anticuerpos anti-PDL1, etc., por ejemplo, para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama, cáncer de pulmón y CCR

(v) agentes quimioterapéuticos, como agentes antineoplásicos a base de platino, o en combinación con un régimen de quimioterapia FOLFOX, que incluye ácido folínico, 5'-fluorouracilo y oxaliplatino, o en combinación con un régimen de quimioterapia FOLFOXIRI, que incluye ácido folínico, 5'-fluorouracilo, oxaliplatino e irinotecán, por ejemplo, para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama o CCR.

Cuando se van a utilizar dos o más sustancias o principios como parte de un régimen de tratamiento combinado, se pueden administrar mediante la misma ruta de administración o mediante diferentes rutas de administración, esencialmente al mismo tiempo (es decir, simultáneamente, de modo concurrente) o en diferentes momentos (por ejemplo, secuencialmente, sucesivamente, alternativamente, consecutivamente o según cualquier otro tipo de régimen alterno).

Cuando las sustancias o principios deben administrarse simultáneamente a través de la misma ruta de administración, pueden administrarse como diferentes formulaciones o composiciones farmacéuticas o como parte de una formulación o composición farmacéutica combinada. Además, cuando se van a utilizar dos o más sustancias o principios activos como parte de un régimen de tratamiento combinado, cada una de las sustancias o principios puede administrarse en la misma cantidad y de acuerdo con el mismo régimen que se utiliza cuando se utiliza el compuesto o principio. por sí solo, y tal uso combinado puede conducir o no a un efecto sinérgico. Sin embargo, cuando el uso combinado de las dos o más sustancias o principios activos conduce a un efecto sinérgico, también puede ser posible reducir la cantidad de una, más o todas las sustancias o principios que se van a administrar, mientras se sigue logrando el efecto de acción terapéutica deseada. Esto puede ser útil, por ejemplo, para evitar, limitar o reducir cualquier efecto secundario no deseado que esté asociado con el uso de una o más de las sustancias o principios cuando se usan en sus cantidades habituales, mientras se obtiene el efecto farmacológico o terapéutico deseado.

Por supuesto, lo anterior incluye la preparación y los procedimientos de preparación de los polipéptidos de la invención para el uso combinado con las contrapartes de combinación anteriores. También se incluyen la preparación y los procedimientos de preparación de las contrapartes de combinación mencionadas anteriormente para el uso combinado con los polipéptidos de la invención. Por tanto, por la presente la invención proporciona, por ejemplo, procedimientos para usar, o preparar para el uso, un inmunomodulador/inhibidor del punto de control, como un anticuerpo anti-PD1, como pembrolizumab o nivolumab, para la administración en combinación con un polipéptido de la invención, y más específicamente para la administración en un régimen de terapia de combinación con un polipéptido de la invención.

Además, la invención también incluye kits que comprenden al menos un polipéptido de la invención y uno o más de otros componentes seleccionados del grupo que consiste en otros fármacos usados para el tratamiento de enfermedades y trastornos como se han descrito anteriormente, y dispositivos como se describen más adelante.

Composiciones farmacéuticas, procedimientos de administración, dosis

Para el experto en la materia estará claro que los procedimientos de tratamiento anteriores de una enfermedad incluyen la preparación de un medicamento para el tratamiento de dicha enfermedad. Por tanto, la invención se refiere además a composiciones farmacéuticas para el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente, en las que tales composiciones comprenden al menos un polipéptido de la invención.

Los polipéptidos de la invención y/o las composiciones que los comprenden pueden administrarse a un paciente que los necesite de cualquier manera adecuada, dependiendo de la formulación o composición farmacéutica específica que se vaya a utilizar. Por tanto, los polipéptidos de la invención y/o las composiciones que los comprenden pueden administrarse, por ejemplo, por vía intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), intraperitoneal (i.p.), transdérmica, oral, sublingual (por ejemplo, en forma de un comprimido, aerosol o gota sublinguales, colocados debajo de la lengua y adsorbidos a través de las membranas mucosas hacia la red capilar debajo de la lengua), (intra-) nasalmente (por ejemplo, en forma de aerosol nasal y/o aerosol), tópicamente, por medio de un supositorio, por inhalación, o cualquier otra forma adecuada en una cantidad o dosis eficaz.

Los polipéptidos de la invención y/o las composiciones que los comprenden se administran de acuerdo con un régimen de tratamiento que es adecuado para tratar y/o aliviar la enfermedad, trastorno o afección a tratar o aliviar. El médico generalmente podrá determinar un régimen de tratamiento adecuado, dependiendo de factores tales como la enfermedad, trastorno o afección a tratar o aliviar, la gravedad de la enfermedad, la gravedad de los síntomas de la misma, el polipéptido específico de la invención para ser utilizado, la ruta específica de administración y formulación o composición farmacéutica a utilizar, edad, sexo, peso, dieta, estado general del paciente y factores similares bien conocidos por el médico. Generalmente, el régimen de tratamiento comprenderá la administración de uno o más polipéptidos de la invención, o de una o más composiciones que comprenden los mismos, en cantidades o dosis terapéuticamente eficaces.

Generalmente, para el tratamiento y/o alivio de las enfermedades, trastornos y afecciones mencionadas en este documento y dependiendo de la enfermedad, trastorno o afección específicos a tratar, la potencia del polipéptido específico de la invención a usar, la vía de administración específica y la formulación o composición farmacéutica específica utilizada, los polipéptidos de la invención generalmente se administrarán en una cantidad entre 0.005 y 20.0 mg por kilogramo de peso corporal y dosis, preferiblemente entre 0.05 y 10.0 mg/kg/dosis, y más preferiblemente entre 0.5 y 10 mg/kg/dosis, ya sea de forma continua (por ejemplo, por infusión) o más preferiblemente como dosis únicas (por ejemplo, dos veces por semana, dosis semanales o mensuales; véase más adelante), pero puede variar significativamente, especialmente, dependiendo de los parámetros antes mencionados. Por lo tanto, en algunos casos puede ser suficiente usar menos de la dosis mínima dada anteriormente, mientras que en otros casos puede ser necesario exceder el límite superior. Cuando se administran grandes cantidades, puede ser aconsejable dividir las en varias dosis más pequeñas repartidas a lo largo del día.

Dependiendo del polipéptido específico de la invención y su farmacocinética específica y otras propiedades, se puede administrar diariamente, cada segundo, tercer, cuarto, quinto o sexto día, semanalmente, mensualmente y similares. Un régimen de administración podría incluir un tratamiento semanal a largo plazo. Por "largo plazo" se entiende al menos dos semanas y preferiblemente meses o años de duración.

La eficacia de los polipéptidos de la invención, y de las composiciones que los comprenden, se puede probar usando cualquier ensayo in vitro adecuado, ensayo basado en células, ensayo in vivo y/o modelo animal conocido per se, o cualquier combinación de los mismos, dependiendo de la enfermedad específica involucrada. Los ensayos y modelos animales adecuados serán claros para el experto y, por ejemplo, incluyen los ensayos y modelos animales usados en los ejemplos siguientes.

Preferiblemente, los polipéptidos de la invención tienen mejores características que los anticuerpos convencionales conocidos en la técnica (tales como los ligantes de LRP6 descritos en la sección anterior "Antecedentes de la invención") en al menos uno de estos ensayos o modelos, y preferiblemente en uno o más de los modelos in vivo.

Formulaciones

Para uso farmacéutico, los polipéptidos de la invención pueden formularse como una preparación farmacéutica que comprende (i) al menos un polipéptido de la invención y (ii) al menos un vehículo, diluyente, excipiente, adyuvante y/o estabilizador farmacéuticamente aceptable, y (iii) opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacológicamente activos adicionales. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende que el material respectivo no muestra ningún efecto biológico o indeseable de alguna otra forma cuando se administra a un individuo y no interactúa de manera perjudicial con ninguno de los otros componentes de la composición farmacéutica (como, por ejemplo, el ingrediente farmacéuticamente activo) en el que está contenido. Se pueden encontrar ejemplos específicos en manuales estándar, como, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Company, Estados Unidos (1990). Por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden formularse y administrarse de cualquier manera conocida per se para anticuerpos y fragmentos de anticuerpos convencionales y otras proteínas farmacéuticamente activas. Por tanto, según otra forma de realización, la invención se refiere a una composición o preparación farmacéutica que contiene al menos un polipéptido de la invención y al menos un vehículo, diluyente, excipiente, adyuvante y/o estabilizador farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente una o más sustancias farmacológicamente activas adicionales.

Las preparaciones farmacéuticas para administración parenteral, tales como inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea o infusión intravenosa pueden ser, por ejemplo, soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo y que son adecuados, opcionalmente después de una etapa adicional de disolución o dilución, para perfusión o inyección. Los vehículos o diluyentes adecuados para tales preparaciones incluyen, por ejemplo, sin limitación, agua estéril y soluciones y reguladores de pH acuosos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina fisiológica con pH regulado con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank; aceites de agua; glicerina; etanol; glicoles tales como propilenglicol, así como aceites minerales, aceites animales y aceites vegetales, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, así como mezclas adecuadas de los mismos.

Las soluciones de los polipéptidos de la invención también pueden contener un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos, tales como agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, p-hidroxibenzoatos,

parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tiomersal (sales de metales alcalinos de) ácido etilendiaminotetraacético y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, reguladores de pH o cloruro de sodio. Opcionalmente, se pueden usar emulsionantes y/o dispersantes. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. También se pueden añadir otros agentes de retraso de absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Las soluciones pueden introducirse en viales de inyección, ampollas, botellas de infusión y similares.

En todos los casos, la forma de dosificación final debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son el secado al vacío y las técnicas de liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional presente en las soluciones previamente esterilizadas filtradas.

Normalmente, se preferirán las soluciones o suspensiones acuosas. Generalmente, las formulaciones adecuadas para proteínas terapéuticas tales como los polipéptidos de la invención son soluciones proteicas con pH regulado, tales como soluciones que incluyen la proteína en una concentración adecuada (tal como de 0.001 a 400 mg/ml, preferiblemente de 0.005 a 200 mg/ml, más preferiblemente 0.01 a 200 mg/ml, más preferiblemente 1.0 - 100 mg/ml, tal como 1.0 mg/ml (administración i.v.) o 100 mg/ml (administración s.c.) y un regulador de pH acuoso tal como:

- solución salina con pH regulado con fosfato, pH 7.4,
- otros reguladores de pH de fosfato, pH 6.2 a 8.2,
- reguladores de pH de acetato, pH 3.2 a 7.5, preferiblemente pH 4.8 a 5.5
- reguladores de pH de histidina, pH de 5.5 a 7.0,
- reguladores de pH de succinato, pH 3.2 a 6.6, y
- reguladores de pH de citrato, pH 2.1 a 6.2,

y, opcionalmente, sales (por ejemplo, NaCl) y/o azúcares (como, por ejemplo, sacarosa y trehalosa) y/u otros polialcoholes (como, por ejemplo, manitol y glicerina) para proporcionar isotonicidad de la solución.

Las soluciones de proteína con pH regulado preferidas son soluciones que incluyen aproximadamente 0,05 mg/ml del polipéptido de la invención disuelto en regulador de pH de fosfato de 25 mM, pH 6.5, ajustado a isotonicidad añadiendo trehalosa de 220 mM. Además, otros agentes como un detergente, por ejemplo, Tween-80 o Tween-20 de 0.02 %, pueden incluirse en tales soluciones. Las formulaciones para aplicación subcutánea pueden incluir concentraciones significativamente más altas del polipéptido de la invención, como hasta 100 mg/ml o incluso por encima de 100 mg/ml. Sin embargo, resultará evidente para el experto en la técnica que los ingredientes y las cantidades de los mismos que se dan anteriormente sólo representan una opción preferida. Las alternativas y variaciones de las mismas serán inmediatamente evidentes para el experto en la materia, o pueden concebirse fácilmente a partir de la descripción anterior.

Además, en comparación con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos convencionales, una ventaja principal del uso de los polipéptidos de la invención es que también pueden administrarse fácilmente por vías distintas de la administración parenteral y pueden formularse fácilmente para tal administración. Por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente internacional WO2004/041867, dichos polipéptidos pueden formularse para administración oral, intranasal, intrapulmonar y transdérmica.

Según un aspecto adicional de la invención, un polipéptido de la invención puede usarse en combinación con un dispositivo útil para la administración del polipéptido, tal como una jeringa, bolígrafo inyector, microbomba u otro dispositivo.

Procedimientos de fabricación y purificación

La invención además proporciona procedimientos para fabricar un polipéptido de la invención; tales procedimientos generalmente comprenden las etapas de:

- cultivar células anfitrionas que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención (de aquí en adelante: "ácido nucleico de la invención") en condiciones que permitan la expresión del polipéptido de la invención; y,
- recuperar o aislar el polipéptido expresado por las células anfitrionas del cultivo; y
- opcionalmente purificar y/o modificar y/o formular adicionalmente el polipéptido de la invención.

Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN que comprende secuencias de codificación, así como secuencias reguladoras y opcionalmente intrones naturales o artificiales, o puede ser una molécula de ADNc. Puede tener sus codones originales o puede tener un uso de codón optimizado que se ha adaptado específicamente para la expresión en la célula anfitriona u organismo anfitrión destinado. Según una forma de realización de la invención, el ácido nucleico de la invención está en forma esencialmente aislada, como se definió anteriormente.

El ácido nucleico de la invención también puede estar en forma de, estar presente en y/o ser parte de un vector, tal como, por ejemplo, un plásmido, cósmido o YAC, que de nuevo puede estar en forma esencialmente aislada. El vector puede ser especialmente un vector de expresión; es decir, un vector que puede proporcionar la expresión del polipéptido in vitro y/o in vivo (por ejemplo, en una célula anfitriona, organismo anfitrión y/o sistema de expresión adecuados). Dicho vector de expresión generalmente comprende al menos un ácido nucleico de la invención que está operativamente unido a uno o más elementos reguladores adecuados, tales como promotor(es), potenciador(es), terminador(es) y similares. Ejemplos específicos de tales elementos reguladores y otros elementos, tales como factor(es) de integración, marcador(es) de selección, secuencia(s) de señal o líder, gen(es) marcador(es) y similares, útiles o necesarios para expresar polipéptidos de la invención, se divulgan, por ejemplo, en las páginas 131 a 133 del documento WO2006/040153.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar u obtener de una manera conocida per se (por ejemplo, mediante síntesis automatizada de ADN y/o tecnología de ADN recombinante), basándose en la información sobre las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de la invención que se dan en este documento.

Según otra forma de realización, la invención se refiere a una célula anfitriona o anfitrión que expresa o es capaz de expresar un polipéptido de la invención; y/o que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. Según una forma de realización particularmente preferida, dichas células anfitrionas son células bacterianas, células de levadura, células de hongos o células de mamífero.

Para la producción a escala industrial, los anfitriones heterólogos preferidos para la producción (industrial) de polipéptidos de dominio variable individual de inmunoglobulina y terapias proteicas que los contienen incluyen cepas de *E. coli*, *Pichia pastoris* y *S. cerevisiae* que son adecuadas para la expresión, producción y fermentación a gran escala y, en particular, para la expresión, producción y fermentación (bio) farmacéuticas a gran escala.

Los polipéptidos de la invención producidos en una célula como se ha establecido anteriormente pueden producirse intracelularmente (por ejemplo, en el citosol, en el periplasma o en cuerpos de inclusión) y luego pueden aislarse de las células anfitrionas y opcionalmente seguir purificándose; o pueden producirse extracelularmente (secretadas al medio en el que se cultivan las células anfitrionas) y luego aislarse del medio de cultivo y, opcionalmente, seguir purificándose.

Otros procedimientos y reactivos utilizados para la producción recombinante de polipéptidos, tales como vectores de expresión adecuados, procedimientos de transformación o transfección, marcadores de selección, procedimientos de inducción de la expresión de proteínas, condiciones de cultivo y similares, se conocen en la técnica. De manera similar, las técnicas de aislamiento y purificación de proteínas útiles en un procedimiento de fabricación de un polipéptido de la invención son bien conocidas por los expertos.

Producción de los polipéptidos de la invención mediante fermentación en los organismos anfitriones recombinantes convenientes tales como *E. coli* y levaduras son rentables, en comparación con los anticuerpos convencionales que normalmente requieren instalaciones costosas de cultivo de células de mamíferos. Además, los niveles de expresión alcanzables son altos y los rendimientos de los polipéptidos de la invención están en el intervalo de 1 a 10 g/l (*E. coli*) y hasta 10 g/l (levadura) y más.

Ejemplos

Ejemplo 1: Inmunización de llamas con LRP5 y LRP6 para la inducción de respuestas inmunes humorales

Se necesitaron elaborar e implementar varios protocolos para la inmunización de llamas para la identificación de dominios VHH de unión de reacción cruzada LRP5/LRP6: Las llamas se inmunizaron inicialmente con dominios extracelulares recombinantes de proteínas LRP6 y LRP5 (humana y de ratón). Sin embargo, la caracterización funcional de la proteína recombinante LRP5 mencionada anteriormente reveló que solo el epitopo de unión de la clase Wnt1 estaba correctamente plegado. Por el contrario, no hubo indicación de un plegamiento adecuado del dominio de unión de la clase LRP5-Wnt3a. Por tanto, era necesario seguir trabajando para desarrollar antígenos adecuados para la inmunización. Como solución alternativa, las llamas se inmunizaron con células HEK293 transfectadas de forma estable con LRP5 humana o LRP6 humana. Sin embargo, también entonces, solo se podría lograr una expresión muy baja de LRP5 humana, mediante transfección transitoria o estable, y usando diferentes líneas celulares (células HEK293, CHO y NIH-3T3). Por lo tanto, se requirió aún más trabajo para lograr una expresión suficiente de LRP5. Al final, y después de algunas pruebas y errores infructuosos, esto podría lograrse mediante el desarrollo de un protocolo que implique la co-transfección estable de células HEK293 con MesDC-2, una chaperona destinada a aumentar la

expresión exógena de LRP5. Incluso entonces, es decir, tras la co-expresión de MesDC-2 durante la generación de la línea celular transfectada estable LRP5, se observó repetidamente la inestabilidad de la expresión de la proteína. Esto dio lugar al problema de que la expresión de LRP5 podría perderse durante la inmunización y la selección. Para resolver este problema adicional, el paso de las células que expresan LRP5 se limitó tanto como fue posible y se realizó una clasificación celular adicional para enriquecer las células que expresan LRP5.

Las llamas se inmunizaron adicionalmente con ADN que codifica LRP5 y ADN que codifica LRP6 con y sin la chaperona hMesDC-2 en flancos opuestos. Se administraron estímulos adicionales a varias llamas en un intento de mejorar la respuesta inmune de reacción cruzada, con el objetivo de aumentar las posibilidades de identificar dominios VHH de reacción cruzada LRP5/LRP6.

Se tomaron muestras de sangre inmunitaria (PBL) a intervalos regulares, se determinaron las respuestas del suero y se preparó el ARN total a partir de la PBL aislada. Se observaron respuestas séricas medias a LRP6, en contraste con respuestas séricas bajas a LRP5 tras la inmunización con proteína recombinante. Se observó una respuesta inmune media de LRP5 para llamas inmunizadas con ADN. Por el contrario, se observó una respuesta inmune muy baja para las inmunizaciones celulares. Además, también se exploraron bibliotecas sintéticas. No obstante, finalmente, se podría lograr una diversidad suficiente del repertorio para continuar con las siguientes etapas, como se describe en el Ejemplo 2.

Ejemplo 2: Aislamiento de dominios VHH monovalentes (VHH) de unión de LRP5 y LRP6

Construcción de biblioteca:

El ARN total se extrajo inmediatamente después de la recolección de los tejidos inmunes y se verificó la integridad y concentración del ARN. Se hicieron muestras de ADNc a partir de estas preparaciones de ARN. Las secuencias de nucleótidos que codifican VHHs se amplificaron a partir de las muestras de ADNc en una reacción de RT-PCR de una sola etapa. Los amplicones de 700 pb específicamente amplificados a partir de los ADNc de IgG2 y IgG3 en la muestra se aislaron del gel de agarosa y posteriormente se usaron como plantilla en una reacción de PCR anidada. Los productos de la PCR se digirieron posteriormente con Sfil y BstEII y se ligaron en los correspondientes sitios de restricción del vector fagémido pAX50. Las mezclas de ligación se sometieron a electroporación en Escherichia coli TG-1. El conjunto resultante de transformantes constituyó la diversidad genética de la biblioteca de presentación de fagos.

pAX50 es un vector de expresión derivado de pUC119, que contiene un gen de resistencia para ampicilina y el promotor lac seguido de la secuencia codificante del péptido señal de la proteína pIL en marco con un sitio de clonación del dominio VHH cadena abajo. En marco con la secuencia de codificación del dominio VHH, el vector codifica para un Myc C-terminal y etiqueta de hexa-histidina y una proteína pIL del fago de coli. Después de la infección de los clones de la biblioteca TG-1 de E. coli con fagos auxiliares, la presencia de pAX50 permite la producción de partículas de fagos a partir de estos clones, mostrando los dominios VHH individuales como una proteína de fusión con la proteína pIL.

Selección:

Las bibliotecas de fagémidos de dominio VHH se construyeron y usaron para las selecciones. Dada la muy alta homología de especies entre especies (entre llama y LRP5 y LRP6 humanos), no estaba claro si la respuesta inmune generada en las llamas generaría suficiente diversidad de los dominios VHH. Por lo tanto, se utilizaron dos bibliotecas sintéticas en paralelo con las bibliotecas inmunes durante las selecciones.

Se utilizaron diferentes estrategias durante las selecciones de la siguiente manera:

- Alternancia de herramientas derivadas de LRP5 y LRP6 para mejorar las posibilidades de identificar dominios VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6; por ejemplo, selecciones en bibliotecas de llamas inmunizadas con LRP5 con proteínas derivadas de LRP6 o el uso de proteínas tanto LRP5 como LRP6 durante la selección en bibliotecas sintéticas.

- Alternancia de la fuente de especies para seleccionar dominios VHH de reacción cruzada de LRP5/LRP6 humano/ratón (reactividad cruzada en ratón de tal antagonista de LRP5 y LRP6 que permite evaluar la eficacia, es decir, la inhibición del crecimiento tumoral, y los perfiles de seguridad, necesarios para la evaluación de la ventana de tratamiento, en los mismos modelos preclínicos (es decir, en modelos de ratón de tumor de xenoinjerto)).

- Selecciones "en solución" con proteínas recombinantes para mantener los epítomos en su conformación nativa: Como obstáculo adicional, se encontró que las proteínas recombinantes LRP5 y LRP6 perdían su plegamiento adecuado si se recubrían directamente sobre placas de unión ELISA. Por lo tanto, las proteínas recombinantes se biotinilaron y, después de confirmar el plegamiento adecuado en ensayos funcionales, se usaron para la selección "en solución".

- Selecciones que utilizan células que sobreexpresan LRP5 o LRP6, para tener conformación nativa de los receptores. Sorprendentemente, esto resultó ser una estrategia importante, especialmente necesaria para mejorar la selección de ligantes al dominio de unión de la clase Wnt3a de LRP5, ya que los datos funcionales de la proteína recombinante mostraron una falta de plegamiento adecuado del epítipo de unión de Wnt3a.

5

Ejemplo 3: cribado de los VHH monovalentes

Después de la selección, los clones se cultivaron en placas de 96 pocillos profundos (volumen de 1 ml) y se indujo la expresión de VHH añadiendo IPTG. Se prepararon extractos periplasmáticos de clones individuales de acuerdo con procedimientos estándar como, por ejemplo, el informado en la publicación WO2011/107507, y se cribó para determinar su unión a LRP6 y LRP5 humanas. Inicialmente, los extractos periplásmicos se cribaron en ensayos ELISA de unión utilizando LRP5 y LRP6 recombinantes, que representan ensayos sensibles, robustos y de alto rendimiento, en comparación con los ensayos de unión basados en FACS. Después de la purificación, los VHH identificados en los ensayos ELISA se caracterizaron adicionalmente utilizando el ensayo de unión FACS para confirmar la unión de los VHH purificados a los receptores LRP5 y LRP6 en su conformación nativa.

Por lo general, se espera una buena correlación entre los ensayos de unión ELISA y FACS. Sin embargo, en el presente caso, los mejores VHH de unión de LRP5 y LRP6 en ensayos ELISA (es decir, con alta afinidad por el ectodominio de LRP5 o LRP6 recombinante) no mostraron ninguna unión o unión muy débil a LRP5 y LRP6 humanos en un ensayo de unión de FACS, como se muestra en la Figura 2 para los ligantes "2" del panel. El uso de diferentes reguladores de pH de recubrimiento (dPBS frente a regulador de pH de bicarbonato) y soluciones de bloqueo en la configuración de ELISA (Marvel vs. BSA) no resolvió la discrepancia observada. En cambio, se descubrió que los ligantes muy débiles en ELISA mostraban una alta afinidad por LRP5 y LRP6 en los ensayos de unión FACS usando células que expresan LRP5 y LRP6, como se muestra en la Figura 2 para los ligantes del panel "1". Estos datos y experimentos adicionales permitieron así la selección de ligantes de alta afinidad que reconocen la conformación nativa de los dos receptores. Además, de esta manera se obtuvo la confirmación de que estos ligantes de alta afinidad reconocen un epítipo de conformación dependiente, y no un epítipo lineal en las proteínas LRP5 y LRP6. Estos datos y experimentos adicionales no rutinarios permitieron así la selección de ligantes de LRP5 y LRP6 terapéuticamente relevantes que deberían tener una alta afinidad hacia LRP5 y LRP6 expresados en la membrana plasmática en su conformación nativa.

Por lo tanto, a pesar de (i) el bajo rendimiento de los ensayos de unión de FACS, (ii) la configuración del ensayo menos robusta y (iii) las dificultades descritas anteriormente encontradas debido a la pérdida de expresión de proteína recombinante tras el paso de las células que sobre-expresan LRP5, estos ensayos se utilizaron posteriormente para una mayor selección y caracterización de ligantes VHH de alta afinidad. Brevemente, las células se incubaron con diluciones de VHH purificadas (diluciones en serie 1:5 de 1 μ M a 1 pM, concentración final) durante 1.5 horas a 4°C en un agitador de placas. Después de lavar las células 5 x con regulador de pH FACS, que consiste en 1 x solución salina con pH regulado con fosfato (PBS) + suero bovino fetal (FBS) al 10% + azida sódica al 0,05%, se incubaron durante 30 minutos hasta 1 hora a 4°C con un anticuerpo policlonal de ratón que se une a las regiones marco de los VHH y, por lo tanto, se une a todos los ligantes LRP5 y/o LRP6 probados. Después de lavar las células 3X con regulador de pH FACS, las células se incubaron durante 30 minutos hasta 1 hora a 4°C con el anticuerpo secundario etiquetado (PE anti-ratón), seguido de un paso de lavado 3X con regulador de pH FACS. La fluorescencia se midió usando FACS Array (BD).

Se identificaron un total de cien familias/grupos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 a partir de bibliotecas inmunes y de origen sintético, basándose en los datos de unión de FACS y el análisis de secuencia. Más adelante se muestran ejemplos representativos de los mismos y se definen por su secuencia. Los VHH se expresaron en *E. coli* y se purificaron. En caso de que la expresión en *E. coli* resultara insuficiente, los VHH se produjeron en *Pichia pastoris*. Más adelante se proporciona una breve descripción de la expresión y purificación de VHH.

50

Expresión genérica de VHH en *E. coli*:

Las secuencias codificantes se clonaron en el vector de expresión pAX100 y se expresaron en *E. coli* como proteínas etiquetadas con hexahistidina de c-Myc. Se cultivaron células *E. coli* TG-1 que contenían los constructos VHH de interés (37°C, 250 rpm) en matraces agitados en medio TB suplementado con kanamicina y se indujeron mediante la adición de IPTG de 1 mM para la expresión. Después de centrifugar los cultivos celulares, se prepararon extractos periplásmicos mediante congelación-descongelación de las pellas y resuspensión en dPBS.

Expresión genérica de VHH en *Pichia (P.) pastoris*:

60

Las secuencias codificantes se clonaron en el vector de expresión pAX159 y se expresaron en *P. pastoris* como proteínas etiquetadas con hexahistidina de c-Myc. Se cultivaron células *P. pastoris* X-33 que contenían constructos de VHH de interés (30°C, 250 rpm) en BGCM (medio de complejo de glicerina con pH regulado; Invitrogen). Al tercer día, el medio se cambió a BMCM (medio de complejo de metanol con pH regulado; Invitrogen) y el cultivo se siguió cultivando y se indujo regularmente mediante la adición de metanol al 0.5% en volumen (100%). Después de centrifugar el cultivo celular, se recogió el sobrenadante (que contenía el VHH secretado).

65

Purificación de VHH:

5 Se purificaron los VHH marcados con hexahistidina en el Tecan EVO150 mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (RoboColumns 100ul Nickel Sepharose™ 6 FF, Atoll), se eluyeron de la columna con imidazol de 250 mM y posteriormente se desalaron hacia dPBS. La pureza e integridad de los VHH se verificó mediante SDS-PAGE y/o western blot (electrotransferencia) usando detección anti-Myc y anti-VHH.

10 Ejemplo 4: Caracterización in vitro de VHH monovalentes purificados

Después del cribado de VHH, los VHH purificados que tienen alta afinidad por las células que expresan LRP5 y LRP6 se caracterizaron mediante el uso de varios ensayos funcionales y biofísicos como se describe más adelante:

15 4.1 Potencia de unión y reactividad cruzada de LRP5 y LRP6: ensayo de competición DKK1 basado en FACS

20 Durante la caracterización de VHH monovalentes de reactividad cruzada con LRP5/LRP6, se observó que los datos obtenidos en el ensayo de unión FACS no siempre se correlacionaban con la potencia observada en los ensayos marcadores Wnt1 y Wnt3a, muy probablemente debido a la rápida tasa de apagado de algunos de los VHH. Por lo tanto, era necesario establecer este ensayo adicional (es decir, un FACS de competición DKK1), que demostró ser más confiable para la determinación de la selectividad y la potencia de unión y la comparación entre la unión de LRP5 y LRP6. El objetivo fue seleccionar VHH funcionales que se unan a LRP5 y LRP6 con una potencia similar, para lograr el bloqueo de ambos receptores a la misma concentración. Por tanto, los VHH funcionales de Wnt1 y Wnt3a identificados se caracterizaron en FACS de competición DKK-1 de la siguiente manera:

25 Para el ensayo de competición DKK1 basado en FACS, se usaron células HEK293 con sobreexpresión estable de LRP5 humana o LRP6 humana. Se añadió DKK1 recombinante humano (rhDKK1 - R&D Systems, Cat 5439-DK/CF) a las células a la concentración final constante de 1 nM. Las células se incubaron con diluciones de ligante rhDKK1 y LRP5 y/o LRP6 (dilución en serie 1:5 de los VHH purificados) durante 1.5 horas a 4°C en un agitador de placas. Después de lavar las células tres veces con regulador de pH FACS, se incubaron con DKK1 antihumano de cabra biotinilado (R&D Systems, Cat BAF1096) durante 30 minutos a 4°C en un agitador de placas. Después de lavar las células tres veces con regulador de pH FACS, se incubaron con estreptavidina PE (BD Biosciences, Cat 554061) durante 30 minutos a 1 hora a 4°C en un agitador de placas en la oscuridad. Las células se lavaron dos veces con regulador de pH FACS y se midió la fluorescencia usando FACS Array (BD) y se informaron los valores de MCF.

35 Se espera que los VHH de reacción cruzada con LRP5/LRP6 compitan con DKK1 humana por la unión a HEK293 que sobreexpresa LRP5 humana, así como por la unión a HEK293 que sobreexpresa LRP6 humana. Por el contrario, un VHH específico de LRP5 competiría con DKK1 humano por unirse a células HEK293 que sobreexpresan LRP5 humana, pero no, o con una potencia muy baja (>200 nM) por unirse a células HEK293 que sobreexpresan LRP6 humana (y lo mismo se aplicaría, viceversa, a VHH específicos de LRP6). Como resultado de este experimento, se pudo demostrar que los presentes VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 compitieron con DKK1 humano por unirse a células HEK293 que sobreexpresan LRP5 humana, así como a aquellas que sobreexpresan LRP6 humana (es decir, la disminución en el valor de MCF al aumentar la concentración del ligante con inhibición completa de la unión de DKK1 correspondió a ≤ 60 valores de MCF a la concentración más alta probada).

45 4.2 Reactividad cruzada de especies: ratón y mono cynomolgus

Para determinar si el panel seleccionado de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 era capaz de unirse a LRP5 y LRP6 de ratón y de origen de mono cynomolgus, la FACS de competición DKK1 se realizó de la siguiente manera:

50 Se incubaron diluciones en serie de VHH con células HEK293 que expresan de manera estable LRP5 de ratón, cyno LRP5, LRP6 de ratón o cyno LRP6 en presencia de hDKK1 de 1 y 0.3 nM (concentración por debajo del valor de EC50 de ratón y cyno, respectivamente). La unión de DKK1 a las células se detectó usando un anticuerpo anti-DKK1 biotinilado con estreptavidina-PE como detección secundaria como se describió anteriormente. Como resultado, se pudo demostrar tal reactividad cruzada.

55 4.3 Agrupación de epítomos

60 Se realizaron experimentos de agrupación para los VHH de reacción cruzada de LRP5/LRP6 que bloquean la señalización de Wnt1 más potentes, para identificar diferentes agrupaciones de epítomos. En particular, se analizó la capacidad de los VHH individuales para competir con otros VHH biotinilados (denominados VHH de referencia) por la unión al receptor LRP5 y LRP6 utilizando ensayos basados en FACS. Se incubaron diluciones en serie de los VHH individuales en HEK293 que expresaban de manera estable LRP5 o LRP6 humana junto con VHH de referencia biotinilado de 200 pM o 500 pM (concentraciones por debajo del valor de EC50). La unión de VHH de referencia biotinilada a las células se detectó usando estreptavidina-PE.

65

Un VHH que compite con los VHH de referencia por la unión a LRP5 y LRP6 muestra una disminución en la fluorescencia medida usando FACS Array.

5 Como resultado de estos experimentos, los bloqueadores de Wnt1 podrían clasificarse en tres grupos. Para los bloqueadores de Wnt3a, la menor afinidad de los VHH no permitió realizar experimentos de agrupamiento de epítomos.

4.4 Ensayos marcadores de Wnt1 y Wnt3a

10 La capacidad de los VHH de reacción cruzada con LRP5/LRP6 para inhibir la señalización de Wnt se probó en ensayos funcionales de Wnt1 y Wnt3a. Además, a este respecto no se pudo utilizar un protocolo establecido, pero se necesitaron varios intentos para establecer ensayos funcionales bioquímicos, como los ensayos de bloqueo de Wnt1/Wnt3a - LRP5/LRP6: Además de las dificultades encontradas con las proteínas recombinantes LRP5 y LRP6 (véase el Ejemplo 1), no está disponible un ligando Wnt1 recombinante funcional (incluido el disponible comercialmente). Las proteínas Wnt contienen muchas cisteínas conservadas y están modificadas por ácido graso monoin saturado (ácido palmitoleico), unido a una serina conservada. Estas modificaciones postraduccionales son necesarias para una señalización eficaz y para la secreción de Wnt. Los análisis estructurales muestran que uno de los dominios, que contiene el lípido del ácido palmitoleico, es necesario para unirse a los receptores Frizzled, lo que lleva a un cambio conformacional que permite la interacción de los ligandos Wnt con LRP5 y LRP6 en la superficie celular. Por tanto, resultó que dicha modificación postraducciona l es necesaria para los estudios funcionales que involucran a esta proteína, pero al mismo tiempo tales modificaciones postraduccionales basadas en lípidos hacen que estas proteínas sean muy difíciles de expresar y purificar (baja solubilidad). Por tanto, esto resultó ser un gran obstáculo para los ensayos bioquímicos.

25 Por tanto, se desarrolló un ensayo funcional basado en células para la caracterización de los VHH purificados: ensayo del gen marcador de beta-lactamasa Wnt. En particular para la inhibición de la vía Wnt1, se transfectaron células CellSensor LEF/TCF-bla Freestyle 293F (Invitrogen, cat. K1677) con Wnt1 humano y se seleccionaron clones con sobreexpresión estable de Wnt1 humano. Para probar la inhibición de la vía de Wnt3a, se generaron células CellSensor LEF/TCF-bla Freestyle 293F con sobreexpresión estable de Wnt3a humana. La línea celular CellSensor® LEF/TCF - bla Freestyle™ 293 contiene un gen marcador de beta-lactamasa bajo el control del promotor LEF/TCF inducible por Wnt, que está integrado de forma estable en las células Freestyle™ 293 (Invitrogen). La expresión de Wnt1 o Wnt3a en estas células da como resultado la expresión constitutiva y, por tanto, la actividad enzimática de la beta-lactamasa. Por tanto, se espera que el tratamiento con VHH funcionales de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 conduzca a la inhibición de las vías Wnt1 y Wnt3a que conducen a la inhibición de la actividad enzimática beta-lactamasa.

35 Para el ensayo, se sembraron 1E06 células /ml con sobreexpresión de Wnt1 o Wnt3a en una placa de cultivo de tejidos de 384 pocillos y se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se prepararon diluciones en serie de diversas soluciones de VHH de reacción cruzada con LRP5/LRP6 y se añadieron a las células en presencia de LiCl a la concentración final de 10 nM. Se añadió DKK1, como control positivo, a las células a la concentración final de 200 nM. El tratamiento con DKK1 dio como resultado una inhibición completa de la vía Wnt1 y Wnt3a y, por lo tanto, una inhibición completa de la actividad enzimática de la beta-lactamasa. Las células se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se midió la actividad enzimática de la beta-lactamasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Cat K1085). Para la emisión de fluorescencia, se obtuvieron valores a 460 nm y 530 nm usando un lector de placa de fluorescencia estándar y se trazaron las relaciones de emisión de 460/530 nm para el tratamiento indicado. Se calculó la eficacia frente al control positivo (DKK1; concentración final 200 nM).

50 Se seleccionaron un total de doce bloqueadores de Wnt1 de reacción cruzada con LRP5/LRP6 con plena eficacia y potencia mejor que 50 nM. Se identificaron catorce bloqueadores de Wnt3a con reactividad cruzada, principalmente con potencias bajas. Solo un bloqueador de Wnt3a mostró una buena potencia (por debajo de 5 nM).

4.5 Ensayos de fosforilación de Wnt1 y Wnt3a

55 Los conductores más potentes y eficaces de cada grupo para los bloqueadores de Wnt1 y los bloqueadores de Wnt3a más potentes y eficaces se probaron posteriormente en ensayos de fosforilación de LRP5 y LRP6 dependientes de Wnt1 y Wnt3a. En los ensayos de fosforilación se usaron células Cellsensor LEF/TCF 293F de Invitrogen (cat K1677), cotransfectadas con vectores de expresión que codifican para Wnt1 o Wnt3a. Dado que la formación del complejo Wnt-Frizzled-LRP5 o -LRP6 da como resultado la fosforilación de LRP5 o LRP6 y la posterior señalización en sentido descendente, la cuantificación de la fosforilación se puede utilizar para medir dicha señalización. Para obtener una lectura específica de LRP5 y LRP6, las células se lisaron y se realizó la inmunoprecipitación con un anticuerpo selectivo de LRP6 o LRP5 (dirigido contra el dominio intracelular de los dos receptores). En Western blot, se detectó LRP6 o LRP5 fosforilada usando un anticuerpo policlonal anti-fosfo-LRP6 (Ser1490) (Cell Signaling Technology), que detecta tanto la proteína fosforilada LRP6 como la LRP5. Un panel seleccionado de VHH que bloquean Wnt1 y Wnt3a purificados, que contiene al menos un VHH representativo de cada grupo, se probó a concentraciones finales de 10 a 100 nM. En particular, las células se incubaron durante la noche en presencia de los VHH bloqueadores antes de la lisis celular y la inmunoprecipitación de LRP5 y LRP6. Se calculó la eficacia de los VHH de bloqueo de Wnt1 y Wnt3a

en la fosforilación de LRP5 y LRP6 de bloqueo mediante la cuantificación de las bandas de electrotransferencia de Western contra el control positivo (DKK1, concentración final de 1 μ M).

4.6 Caracterización biofísica

Los VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 se caracterizaron adicionalmente para la expresión y purificación en *E. coli* y en *Pichia pastoris*, como se informa en el Ejemplo 3. En particular, los rendimientos de expresión para los VHH del panel de plomo monovalente se consideraron aceptables si estaban por encima de 0.1 mg/L. Los VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 seleccionados mostraron una expresión que variaba entre 0.1 y 8.2 mg/L en *E. coli* y más alta en *Pichia pastoris* (> 1 mg/L). La expresión se evaluó mediante análisis SDS-PAGE.

La estabilidad térmica de los VHH monovalentes de reacción cruzada con LRP5/LRP6 se determinó en un ensayo de desplazamiento térmico (TSA) basado en fluorescencia utilizando el Lightcycler (Roche). Los VHH se incubaron a diferentes valores de pH en presencia de Sypro Orange y se aplicó un gradiente de temperatura. Tras el despliegue inducido por calor, se exponen parches hidrófugos de las proteínas a las que se une Sypro Orange, lo que da como resultado un aumento en la intensidad de la fluorescencia (Ex/Em = 465/580). El punto de inflexión de la primera derivada de la curva de intensidad de fluorescencia sirve como medida de la temperatura de fusión (T_m). Para todos los VHH, la T_m aumentó al aumentar el pH y los niveles se redujeron a pH 6, un patrón típico de T_m observado para los VHH. Se obtuvo un promedio de 82°C a pH 7 para los VHH bloqueadores de Wnt1 de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 y VHH bloqueadores de Wnt3a.

La posible aparición de agregación y multimerización para VHH LRP5 y LRP6 se investigó mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño (SEC). Con este fin, se inyectaron 8 μ g de muestra de VHH purificada a 0,5 mg/ml a través del equipo Dionex Ultimate 3000 en una columna Agilent SEC-3. Se usó regulador de pH de L-arginina (fosfato 10 mM, Arg-HCl 300 mM, pH 6.0) como fase móvil y se aplicó un caudal de 1 ml/min. Ninguno de los VHH LRP5 /LRP6 mostró problemas importantes de agregación durante el análisis SEC: los perfiles indicaron más del 95% de monómero para la mayoría de las muestras.

Ejemplo 5: Generación y caracterización de constructos biparatópicos de vida media extendida

Los VHH de Wnt1 y Wnt3a de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 se utilizaron como bloques de construcción para generar un constructo biparatópico como se muestra en la Figura 1. Se utilizó una fusión genética con un VHH que se une a la albúmina sérica como metodología de extensión de la vida media. Los tres bloques de construcción (bloqueador de Wnt1, bloqueador de Wnt3a y ligante de albúmina) se enlazaron mediante un enlazador flexible. Los VHH se produjeron en *P. pastoris* y se purificaron como se describe en el Ejemplo 3. Los constructos resultantes, es decir, los constructos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 de vida media extendida y biparatópicos, se clonaron en el vector de expresión de *P. pastoris* pAX159, en forma de constructos de VHH etiquetados con cMyc-hexahistidina C-terminal, de acuerdo con los procedimientos estándar como se informan, por ejemplo, en la publicación WO2012/131078. Se exploraron diferentes orientaciones de los bloques de construcción y diferentes enlazadores, en especial, los enlazadores GS. Se seleccionó un enlazador GS relativamente largo, basado en datos de modelado que reflejan un área de superficie extendida entre los sitios de unión potenciales a Wnt1 y Wnt3a en LRP6 (es decir, las hélices beta 1 y 2 que no están muy próximas a la hélice beta 3). Los mejores resultados con respecto a la potencia en el ensayo de marcador de Wnt1 y Wnt3a combinados se obtuvieron colocando el VHH de unión de albúmina sérica humana/HSA en el medio. Se utilizó un enlazador 35 GS y los bloqueadores de VHH de Wnt1 y Wnt3a se dispusieron en un orden preferido.

Para la selección de ligantes de VHH óptimos y combinaciones de ligantes, se generó una biblioteca en la que la albúmina sérica humana (HSA) que se une a VHH se colocó entre los bloqueadores LRP5/LRP6 de Wnt1 -Wnt3a. En particular, el panel de ligantes de alta afinidad con alta potencia y eficacia en los ensayos Wnt1 o Wnt3a (ensayos marcadores y de fosforilación) se utilizó en la biblioteca para generar constructos biparatópicos de vida media prolongada diseñados como se muestra en la Figura 1. Después de la expresión en *Pichia pastoris* (como se informa en el Ejemplo 3) seguida de purificación, los constructos biparatópicos de vida media prolongada se cribaron posteriormente en los ensayos marcadores de Wnt1 y Wnt3a (descritos en el Ejemplo 4) en presencia de 30 μ M de HSA a tres diluciones (1/100, 1/1000, 1/7000), para evaluar la eficacia y la potencia relativa. En general, se observó una buena correlación entre los datos en los ensayos marcadores de Wnt1 y Wnt3a y se midieron las altas eficacias para numerosos formatos. Se seleccionaron un total de 11 constructos de LRP5 y LRP6 biparatópicos de vida media prolongada para su caracterización adicional, teniendo en cuenta la eficacia en ambos ensayos marcadores y la diversidad de los bloqueadores de Wnt1 y Wnt3a. Estos ensayos de caracterización adicional se describen más adelante.

Ensayos marcadores de Wnt1/Wnt3a:

Los ensayos marcadores de Wnt1 y Wnt3a se realizaron como se describe en el Ejemplo 4.4, en presencia de una concentración final de 30 μ M de HSA. Los constructos de LRP5/LRP6 biparatópicos purificados se probaron a 12 diluciones, comenzando desde 2.5 μ M.

La mayoría de los constructos mostraron una alta potencia, que variaba entre 1.7 nM y 0.16 nM, y una eficacia total en ambos ensayos marcadores, como se muestra en la Tabla IV más adelante. Las secuencias de los dominios VHH inhibidores de Wnt1 y Wnt3a individuales que se establecen allí se proporcionan en la Tabla V más adelante:

5 Tabla IV: Potencia y eficacia de constructos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatómicos de vida media prolongada seleccionados en los ensayos marcadores en presencia de HSA

Constructo	N-term	C-term	Ensayo marcador de Wnt1		Ensayo marcador de Wnt3a	
			IC ₅₀ (M)	% inh.	IC ₅₀ (M)	% inh.
F013500053	F0129093A01	F0130333G06	2,3E-10	102	4,1E-10	97
F013500039	F0129093A03	F0130333E06	1,7E-09	102	1,6E-09	82
F013500046	F0130332D03	F0129093A01	5,1E-10	102	6,0E-10	96
F013500016	F0130332D03	F0130367B10	3,1E-10	102	2,7E-10	99
F013500018	F0130332D03	F0130378B05	7,4E-10	102	1,3E-09	98
F013500047	F0130333E06	F0129093A01	8,8E-10	102	9,1E-10	94
F013500026	F0130333E06	F0130367B10	3,3E-10	102	2,6E-10	100
F013500021	F0130333G06	F0130367B10	1,6E-10	102	1,8E-10	102
F013500032	F0130378A04	F0130333G06	2,4E-10	102	4,3E-10	94
F013500033	F0130378B05	F0130333G06	1,8E-10	102	2,5E-10	88
F013500030	F0130378B05	F0130372C08	1,4E-09	102	1,3E-09	96

10 Tabla V: Secuencias de los dominios de VHH establecidos en la Tabla IV

Especificidad de ID VHH	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
F0129093A01 Wnt3a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKER EFVAAISWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDT AVYYCAASPIPYGSLLRRRNNYDWGQGLVTVSSAAAEQKLISEED <u>LNGAAHHHHHH</u>	28
F0130333G06 Wnt1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKER EFVAAIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA VYYCAAARRVRSSTRYNTGTWWWEYWGQGLVTVSSAAAEQKLI <u>SEEDLNGAAHHHHHH</u>	29
F0129093A03 Wnt3a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYVMGWFRQAPGKER EFVAAINWSSRSRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDT AVYYCAASRSSYAGRTYYELYDYWGQGLVTVSSAAAEQKLISEEDL <u>NGAAHHHHHH</u>	30
F0130333E06 Wnt1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKERE FVAAIRRRGSSTYYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAV YYCAADTRTVALLQYRYDYWGQGLVTVSSAAAEQKLISEEDLNGA <u>AHHHHHH</u>	31
F0130332D03 Wnt1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKER EFVAAINRSGGSTYYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA VYYCAADRRGRGENYSLLYSSNRYEYWGQGLVTVSSAAAEQKLISE <u>EDLNGAAHHHHHH</u>	32

ES 2 821 099 T3

(continuación)

Especificidad de ID VHH	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
F0130367B10 Wnt3a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKER EFVAAISWRSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEGT AVYYCAADPRGYGVAYVSAYYEWGQGLTVTVSSGAAEQKLISEED LNGAAHHHHH	33
F0130378B05 Wnt3a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGWFRQAPGKER EFVAAISRSGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA VYYCAADRRVYSTLPPTTSRYNYWGQGLTVTVSSAAAEQKLISEEDL NGAAHHHHH	34
F0130378A04 Wnt3a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKER EFVAAITRTGRRYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA VYYCAADRRGYYYYDSSFYDYWGQGLTVTVSSAAAEQKLISEEDLN GAAHHHHH	35
F0130372C08 Wnt1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYGMGWFRQAPGKE REFVAAISWSGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPED TAVYYCAAKRRRGRSVSPNSSRYNYWGQGLTVTVSSAAAEQKLIS EEDLNGAAHHHHH	36
F013500016	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKER EFVAAINRSGGSTYYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA VYYCAADRRGRGENYSLLYSSNRYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGN SLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREF VAAISWRSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEGTAV YYCAADPRGYGVAYVSAYYEWGQGLTVTVSSGAAEQKLISEEDLN GAAHHHHH	37
F013500018	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKER EFVAAINRSGGSTYYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA VYYCAADRRGRGENYSLLYSSNRYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGN SLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREF VAAISRSGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVY YCAADRRVYSTLPPTTSRYNYWGQGLTVTVSSGAAEQKLISEEDLN GAAHHHHH	38

ES 2 821 099 T3

(continuación)

Especificidad de ID VHH	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
F013500021	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKER EFVAAIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA VYYCAAARRVRSSTRYNTGTWWWWEYWGQGLVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG NSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYA DSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKERE FVAAISWRSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEGTA VYYCAADPRGYGVAYVSAYEYWGQGLVTVSSGAAEQKLISEEDL <u>NGAAHHHHH</u></p>	39
F013500026	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKERE FVAAIRRRGSSTYYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAV YYCAADTRTVALLQYRYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS ASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADSVKGRFT ISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREVAAISW RSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEGTA VYYCAADPRGYGVAYVSAYEYWGQGLVTVSSGAAEQKLISEEDL <u>NGAAHH</u></p>	40
F013500030	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGWFRQAPGKER EFVAAISRSGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA VYYCAADRRVYSTLPPTTSRYNYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADSVK GRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLVTV SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYGMGWFRQAPGKEREVAAI SWSGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCA AKRRGRGSVSPNSSRYNYWGQGLVTVSSGAAEQKLISEEDLNGA <u>AHHHHH</u></p>	41

ES 2 821 099 T3

(continuación)

Especificidad de ID VHH	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
F013500032	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKER EFVAAITRTGRRYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA VYYCAADRRGYYYYDSSFYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKG RFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVS SGGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAIR RSGRRYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA ARRVRSSSTRYNTGTWWWEYWGQGLVTVSSGAAEQKLISEEDLN <u>GAAHHHHHH</u></p>	42
F013500033	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGWFRQAPGKER EFVAAISRSGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA VYYCAADRRVYSTLPPTTSRYNYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTV SGGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAI RRSGRRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCA AARRVRSSSTRYNTGTWWWEYWGQGLVTVSSGAAEQKLISEEDL <u>NGAAHHHHHH</u></p>	43
F013500039	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYVMGWFRQAPGKER EFVAAINWGSRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDT AVYYCAASRSSYAGRTYYELYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTV SGGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKEREFVAAIR RRGSTYYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAD TRTVALLQYRYDYWGQGLVTVSSGAAEQKLISEEDLN <u>GAAHHHHH HH</u></p>	44

(continuación)

Especificidad de ID VHH	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
F013500046	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKER EFVAAINRSGGSTYYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA VYYCAADRRRGRGENYSLLYSSNRYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGN SLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREF VAAISWGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAV YCAASPIPYGSLRRRNNYDYGQGLTVTVSSGAAEQKLISEEDLN <u>GAAHHHHH</u>	45
F013500047	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKERE FVAAIRRRGSSTYYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAV YYCAADTRTVALLQRYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCA ASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISW SGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAS PIPYGSLRRRNNYDYGQGLTVTVSSGAAEQKLISEEDLN <u>GAAH HHHH</u>	46
F013500053	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKER EFVAAISWGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDT AVYYCAASPIPYGSLRRRNNYDYGQGLTVTVSSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAA IRRSGRRYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCA AARRVRSSTRYNTGTWWEYWGQGLTVTVSSGAAEQKLISEE <u>DLNGAAHHHHH</u>	47

(Nota: Las moléculas descritas en esta Tabla V incluyen una etiqueta myc-hexa-histidina (subrayada), para permitir una purificación más fácil de los polipéptidos expresados de manera recombinante; esta etiqueta no es necesaria para, ni suele interferir con, la unión de las moléculas a sus dianas)

5 Ejemplo 6: Optimización de secuencia de VHH y constructos de VHH

La optimización de la secuencia es un proceso en el que la secuencia parental se muta para hacerla más idéntica a la secuencia de consenso de la línea germinal IGHV3-IGHJ humana. Por ejemplo, los aminoácidos específicos en las regiones marco (con la excepción de los denominados residuos distintivos) se intercambian por sus homólogos humanos, de manera que se conserven la estructura, la actividad y la estabilidad de la proteína.

10

Estas mutaciones se pueden clasificar de la siguiente manera:

1. Estándar: No se espera que la optimización de la secuencia de estas posiciones cambie drásticamente la estabilidad o actividad o afinidad del VHH y, por lo tanto, se alteran todos a la vez, produciendo una variante básica.

5 2. Única: no se sabe si la optimización de la secuencia de estas posiciones afecta la estabilidad o la actividad o la afinidad del VHH y, por lo tanto, se investigan de forma individual encima de la variante básica.

Se sabe que los residuos distintivos son críticos para la estabilidad, actividad y afinidad del VHH y, por lo tanto, no están mutados.

10 Además, los aminoácidos presentes en las CDR para los que existe evidencia experimental de que son sensibles a modificaciones postraduccionales (PTM) se alteraron de tal manera que el sitio PTM se inactiva mientras que la estructura, actividad y estabilidad de la proteína permanecerán intactas. Las modificaciones postraduccionales más comunes descritas para anticuerpos y VHH se enumeran en la Tabla VI a continuación. La sensibilidad de los VHH para modificaciones postraduccionales se analizó en estudios de estrés acelerado, aplicando varias condiciones estándar, incluido el tratamiento con H₂O₂ para analizar la oxidación de la metionina, la temperatura alta, el pH alto y el almacenamiento prolongado para estudiar la desamidación de la asparagina y la isomerización del aspartato. El porcentaje de oxidación, desamidación e isomerización se midió de acuerdo con procedimientos estándar y se comparó con las muestras de referencia (VHH almacenados a -20°C). Se realizaron análisis de proteínas completas en cromatografía de fase inversa (RPC) y mapeo de péptidos mediante espectrometría de masas (MS) para identificar residuos potencialmente sensibles. En caso de modificaciones postraduccionales observadas en los VHH después de la prueba de esfuerzo, se mutaron los aminoácidos correspondientes.

Tabla VI: Posibles modificaciones postraduccionales y motivos que potencialmente las desencadenan

Motivo	Modificación
M	Met oxidación
N-S/G/H/N/A	Asn desamidación
D-S/G/H	Asp isomerización
N-X-S/T-X (X ≠ P),	Asn glicosilación
Q/E	piroglutamato

25 Como resultado, se introdujeron varias mutaciones en los constructos expuestos anteriormente, dando como resultado, entre otros, los tres constructos mostrados en la Tabla III anterior, que se eligieron para una caracterización in vitro e in vivo adicional, como se expone en los Ejemplos más adelante.

30 Ejemplo 7: Caracterización in vitro de tres constructos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media prolongada; Comparación con otras moléculas de unión a LRP6

Después de la optimización de la secuencia de VHH, tres constructos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media extendida se expresaron de manera recombinante y se purificaron, y se caracterizaron usando varios ensayos funcionales y biofísicos como se describe a continuación.

35 7.1 Ensayos de unión FACS

La unión a LRP5 y LRP6 humanas se determinó en células mediante análisis FACS, como se informa en las Figuras 3A y 3B. En particular, se probó la unión a LRP5 humana en células HEK293 con sobreexpresión estable de LRP5 humana. Para la unión de LRP6 humana, se utilizaron células HEK293 con sobreexpresión estable de LRP6 humana. Las células se incubaron con las diluciones de ligante de LRP5 y LRP6 (dilución en serie 1:5 de los ligantes correspondientes a las concentraciones finales indicadas en la Figura 3A y la Figura 3B) durante 1.5 horas a 4°C en un agitador de placas. Después de lavar las células 5 veces con regulador de pH FACS (1 x PBS (No. de catálogo de Invitrogen 141190-094) + FBS al 10% (No. de catálogo de Sigma. F7524) + azida de sodio al 0,05%), se incubaron durante 1 hora a 4°C con un anticuerpo policlonal de ratón que se une a las regiones marco de los VHH. Después de lavar las células 3 veces con regulador de pH FACS, las células se incubaron durante 1 hora a 4°C con el anticuerpo secundario etiquetado (PE anti-ratón (115-116-071), seguido de etapa de lavado 3 veces con regulador de pH FACS. La fluorescencia se midió usando FACS Array (BD). La unión a LRP5 y LRP6 humanas corresponde a valores de MCF ≥ 600 a la concentración más alta probada. El control negativo consistió en un ligante no direccionado (constructo VHH que se une a una proteína bacteriana que no se expresa en células HEK293). Como se muestra en la Figura 3A y la Figura 3B, respectivamente, la unión a LRP5 y LRP6 humanas corresponde a valores ≥ 600 MCF y ≥ 1600 MCF, respectivamente, a las concentraciones más altas probadas de los tres constructos VHH biparatópicos de reactividad cruzada con LRP5/LRP6. Estos datos confirman que las moléculas de unión formateadas, biparatópicas y de secuencia optimizada se unen tanto a LRP5 humana como a LRP6 humana en su conformación nativa en un sistema de ensayo celular. Los valores de EC50 de unión a hLRP5 y hLRP6 se indican en la Tabla VII a continuación.

Tabla VII: Valores de EC₅₀ de unión a LRP5 y LRP6 humanas determinados por ensayos de unión de FACS

Ensayo de unión basado en FACS	F013500571	F013500575	F013500720
hLRP5, EC ₅₀ (nM)	0.01	0.001	0.02
hLRP6, EC ₅₀ (nM)	0.02	0.01	0.02

7.2 Ensayo de competición FACS -DKK1

5 La potencia y eficacia de los tres constructos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 se analizaron adicionalmente utilizando el ensayo de competición DKK1 basado en FACS, como se describe en el Ejemplo 4.1. Se incubaron células HEK293 con sobreexpresión estable de LRP5 humana o LRP6 humana con dilución en serie de los constructos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 (dilución en serie 1:5 correspondiente a las concentraciones finales indicadas en la Figura 4A y la Figura 4B). Los VHH de reacción cruzada con LRP5/LRP6 compitieron con DKK1 humana por unirse a células HEK293 que sobreexpresan LRP5 humana, así como por unirse a células HEK293 que sobreexpresan LRP6 humana, como se muestra en las Figuras 4A y 4B, respectivamente. La inhibición completa de la unión de DKK1 se logró a las concentraciones más altas probadas (≥ 10 nM) y correspondió a valores de MCF ≤ 60 . Por el contrario, un VHH específico de LRP5 competiría con DKK1 humana por unirse a células HEK293 que sobreexpresan LRP5 humana, pero no, o con una potencia muy baja (> 200 nM) por unirse a células HEK293 que sobreexpresan LRP6 humana (y lo mismo se aplicaría, viceversa, a VHH específicos de LRP6). Como resultado de este experimento, se pudo demostrar que los VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 presentes compitieron con DKK1 humana por unirse a células HEK293 que sobreexpresan LRP5 humana, así como a aquellas que sobreexpresan LRP6 humana (es decir, disminución en el valor de MCF con concentración creciente del ligante, con inhibición completa de la unión de DKK1 correspondió a valores de MCF ≤ 60 a la concentración más alta probada).

10 Valores de IC₅₀ de la competencia de DKK1 por unirse a hLRP5 y hLRP6 de los tres constructos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 se describen en la Tabla VIII a continuación. Estos datos confirmaron la unión de los tres constructos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 a LRP5 humana y LRP6 humana y mostraron una afinidad muy similar (definida aquí por los valores de potencia de IC₅₀ en el ensayo de competición de DKK1) entre los dos receptores. Además, los datos refuerzan la noción de que las moléculas de unión formateadas, biparatópicas y de secuencia optimizada se unen a LRP5 humana, así como a LRP6 humana en su conformación nativa.

Tabla VIII: Valores de IC₅₀ de la competencia de DKK1 por la unión a LRP5 y LRP6 humanas, determinados mediante ensayos de unión de FACS

Ensayo de competencia de DKK1	F013500571	F013500575	F013500720
hLRP5, IC ₅₀ (nM)	0.03	0.03	0.3
hLRP6, IC ₅₀ (nM)	0.01	0.1	0.2

7.3 Ensayo de marcador de Wnt1 y Wnt3a combinados

35 La potencia y la eficacia de las moléculas de unión formateadas, biparatópicas y de secuencia optimizada se analizaron utilizando un ensayo de marcador de Wnt1 y Wnt3a combinados para permitir la prueba funcional de los bloqueadores de Wnt1 y Wnt3a en el mismo ensayo. El ensayo de marcador de Wnt1 y Wnt3a combinados se basa en el ensayo descrito en el Ejemplo 4.4 con los siguientes cambios en el protocolo. Se trataron 1E06/ml células con sobreexpresión de Wnt1, sembradas en una placa de cultivo tisular de 384 pocillos con Wnt3a humano recombinante (Wnt3a humano rec.: R&D # 5036-WN/CF) a la concentración final de 500 ng/ml y luego las células fueron incubadas durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se prepararon diluciones en serie de diversas soluciones de VHH biparatópico de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 y se añadieron a las células en presencia de LiCl a la concentración final de 10 nM. Se añadió DKK1, como control positivo, a las células a la concentración final de 200 nM. El tratamiento con DKK1 dio como resultado una inhibición completa de la ruta combinada de Wnt1 y Wnt3a y, por lo tanto, una inhibición completa de la actividad enzimática de la beta-lactamasa. Las células se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se midió la actividad enzimática de la beta-lactamasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como se indica en el Ejemplo 4.4., para la emisión de fluorescencia, se obtuvieron valores a 460 nm y 530 nm usando un lector de placas de fluorescencia estándar y se trazaron las relaciones de emisión de 460/530 nm para el tratamiento indicado. El valor de la relación de fluorescencia [460/535nm] informado como "línea de base" en la Figura 5A corresponde a la inhibición completa de la vía Wnt1 y Wnt3a, determinada por el tratamiento con el control positivo (DKK1; concentración final 200 nM). El valor de la proporción de fluorescencia [460/535nm] informado como "Wnt1" corresponde a la activación de la vía Wnt1 solamente, determinada a partir de las células que sobreexpresan Wnt1 (es decir, sin tratamiento con Wnt3a humano recombinante). El valor de la proporción de fluorescencia [460/535nm] informado como "Wnt1 + Wnt3a" corresponde a la activación combinada de las vías Wnt1 y Wnt3a, determinada por el tratamiento de células que sobreexpresan Wnt1 con Wnt3a humano recombinante. Como se muestra en la Figura 5A, la inhibición completa (es decir, la proporción de fluorescencia [460/535nm] correspondiente a la línea de base) se logra mediante el tratamiento con las tres moléculas de unión de secuencia optimizada, formateadas, biparatópicas, de reactividad cruzada con

LRP5/LRP6. Además, también se informa de alta potencia, como se muestra en la Tabla IX a continuación mediante los valores de IC₅₀.

Tabla IX: Valores de IC₅₀ de la inhibición de las vías Wnt1 y Wnt3a en el ensayo de marcador de Wnt1 y Wnt3a combinados

Ensayo marcado de Wnt1 y Wnt3 combinados	F013500571	F013500575	F013500720
IC ₅₀ (nM)	0.05	0.2	0.06

A continuación, se comparó la potencia y la eficacia de las moléculas de unión formateadas, biparatópicas y de secuencia optimizada, de reactividad cruzada con LRP5/LRP6, con las moléculas de unión de LRP6 descritas anteriormente, divulgadas en los documentos WO2011/138391 y WO2011/119661:

En el documento WO2011/138391, se describieron anticuerpos multivalentes que se unen a LRP6 e inhiben la interacción de ligando de la hélice 1 (por ejemplo, Wnt1) y la hélice 3 (por ejemplo, Wnt 3). Estos anticuerpos de unión a LRP6 multivalentes son moléculas de unión a LRP6 biparatópicas que constan de un anticuerpo IgG como primer dominio de unión al receptor y de un fragmento scFv como segundo dominio de unión al receptor, donde el anticuerpo IgG y el fragmento scFv están unidos por un enlazador. En la publicación WO2011/138391 se informa que todas las moléculas de unión de LRP6 tienen aproximadamente la misma potencia en el ensayo de marcador Wnt1 y Wnt3a (Fig.18 de la publicación WO2011/138391). Por tanto, cualquiera de esas moléculas de unión a LRP6 multivalentes podría elegirse para experimentos comparativos. Por tanto, se decidió utilizar el constructo "901" (denominado MOR08168IgG1 LALA 6475 scfv; también mostrado en la Fig. 27 del documento WO2011/138391) como primer compuesto comparativo.

Los derivados de este constructo "901" se muestran en la publicación WO2013/067355. Específicamente, se describen compuestos denominados 801T y 802T (véase la descripción en la página 132 de la especificación), ambos con dos dominios scFv de unión a LRP6, más un residuo que prolonga la vida media. Como 801T y 802T parecen tener la misma potencia in vitro y las mismas características biofísicas, solo una de ellas, la variante 802T, se incluyó en los experimentos que se describen a continuación.

En la publicación WO2011/119661 se describieron anticuerpos biespecíficos que se unen a LRP6 e inhiben la señalización por múltiples isoformas de Wnt. Estos anticuerpos anti-LRP6 biespecíficos se unen a dos regiones diferentes de LRP6 e inhiben la señalización inducida por isoformas de Wnt, entre ellas Wnt1 y Wnt3a. Se usó ingeniería de Knobs en agujeros (Atwell et al. "Heterodímeros estables de remodelación de la interfaz de dominio de un homodímero usando una biblioteca de presentación de fagos". J Mol Biol. 1997; 270(1):26-35) para construir estos anticuerpos anti-LRP6 biespecíficos. El Ejemplo 11 de la publicación WO2011/119661 describe un híbrido de IgG con heterodímeros de cadena pesada YW211.31.62 y YW210.09. Por lo tanto, con fines comparativos, se generaron dos anticuerpos híbridos IgG biespecíficos con heterodímeros de cadena pesada YW211.31.62 y YW210.09 con la tecnología de ingeniería de Knobs en agujeros, es decir, con cambios de aminoácidos diseñados para crear una Knob en el CH3 de la cadena pesada de YW210.09 y un agujero en el CH3 de la cadena pesada de YW211.31.62 o viceversa, y aquí denominado como Knob HC YW210.09 y Knob HC YW211.31.62, respectivamente. Estos dos constructos se caracterizaron en ensayos marcadores de Wnt1 y Wnt3a de acuerdo con el Ejemplo 4.4. Como era de esperar, los dos híbridos de IgG biespecíficos con heterodímeros de cadena pesada YW211.31.62 y YW210.09 mostraron potencias similares en los ensayos de Wnt1 y Wnt3a, como se indica en la Tabla X a continuación. Por tanto, para los ejemplos comparativos que se muestran más adelante, se seleccionó la Knob HC YW210.09 como segundo compuesto comparativo.

Tabla X: Valores de IC₅₀ de la inhibición de las vías de Wnt1 y Wnt3a en los ensayos marcadores de Wnt1 y Wnt3a

Ensayo marcador de Wnt	Knob HC YW210.09	Knob HC YW211.31.62
Wnt1, IC ₅₀ (nM)	4.8	4.6
Wnt3a, IC ₅₀ (nM)	0.7	0.9

La potencia y eficacia de los constructos de VHH de reacción cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media prolongada se compararon con la molécula de unión a LRP6 biparatópica LALA 6475 scfv MOR08168IgG1, con la molécula anti-LRP6 biespecífica, con la molécula anti-LRP6 biespecífica Knob HC YW210.09 y con la molécula anti-LRP6 biespecífica 802T usando el ensayo de marcador de Wnt1 y Wnt3a combinados. Como se muestra en la Figura 5B, la inhibición completa (es decir, la proporción de fluorescencia [460/535 nm] correspondiente a la línea base en la Figura 5B) se logró mediante el tratamiento con Knob HC YW210.09 (el anticuerpo híbrido IgG biespecífico con

heterodímeros de cadena pesada YW211.31.62 y YW210.09) similar a la molécula de unión F013500571 formateada, biparatópica y de secuencia optimizada, de reactividad cruzada con LRP5/LRP6. Sin embargo, F013500571 mostró una mayor potencia, como se indica en la Tabla XI a continuación. En cambio, MOR08168IgG1 LALA 6475 scfv y las moléculas de unión de LRP6 biparatópicas 802T mostraron una falta de inhibición completa de Wnt1 y Wnt3a (es decir, proporción de fluorescencia [460/535nm] significativamente mayor que la línea de base en la Figura 5B y en la Figura 5C, respectivamente). Estos datos indican que tanto MOR08168IgG1 LALA 6475 scfv como moléculas de unión a LRP6 biparatópicas 802T tienen una eficacia significativamente menor en la inhibición de las vías de Wnt1 y Wnt3a en comparación con F013500571. Por lo tanto, Knob HC YW210.09 se seleccionó como un compuesto comparativo para experimentos in vivo como se describe más adelante (Ejemplo 9; eficacia in vivo)

Tabla XI: Valores de IC₅₀ de la inhibición de las vías de Wnt1 y Wnt3a en el ensayo de marcador de Wnt1 y Wnt3a combinados

Ensayo marcado de Wnt1 y Wnt3a combinados	F013500571	Knob HC YW210.09	MOR08168IgG1LALA 6475 scfv	802T
IC ₅₀ (nM)	0.05	1.15	0.19	0.01

Ejemplo 8: Efectos de tres constructos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6, biparatópicos, de vida media prolongada sobre la señalización y viabilidad de Wnt en líneas de células cancerosas

La capacidad de los constructos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media prolongada para inhibir la señalización de Wnt activa se caracterizó adicionalmente utilizando líneas de células cancerosas con señalización de Wnt activa, como se describió anteriormente (Bafico et al. "Un mecanismo autocrino para la activación de la vía de Wnt constitutiva en células cancerosas humanas". *Cancer Cell* 2004;6(5):497-506; DeAlmeida et al. "El receptor soluble de wnt Frizzled8CRD-hFc inhibe el crecimiento de teratocarcinomas in vivo". *Cancer Res.* 2007;67(11):5371-9); Akiri et al. "Las aberraciones de la vía Wnt, que incluye la activación autocrina de Wnt, ocurren con alta frecuencia en el carcinoma de pulmón de células no pequeñas en humanos". *Oncogene.* 2009; 28(21):2163-72). Brevemente, las líneas de células cancerosas con señalización activa de Wnt, PA-1 y PA-TU-8988S, se sembraron en placas de 12 pocillos y se trataron durante dos días con los constructos de VHH de reacción cruzada con LRP5/LRP6 a la concentración final de 1 μ M. La capacidad de inhibir la señalización de Wnt se detectó mediante la inhibición de la expresión de ARNm de Axin2, el gen diana de Wnt endógeno. El análisis de expresión de qPCR se realizó usando técnicas estándar de ARN: el aislamiento de ARN se realizó usando el QIAGEN RNeasy Mini Kit de acuerdo con el protocolo proporcionado por QIAGEN; Síntesis de ADNc usando el kit de síntesis de ADNc Superscript VILO (Invitrogen, cat. No. 11754050) y qPCR usando TaqMan Gene Expression Assay (ensayo de expresión génica) con cebadores/sonda Axin2 TaqMan (Hs00610344_m1 AXIN2 FAM, Life Technologies) y con control endógeno eucariota 18s VIC-MGB (4319413E- 1307061, Applied Biosystems).

Como se muestra en la Figura 6A, tanto las células cancerosas PA-TU8988S como las PA-1 tratadas con tres constructos de VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media prolongada mostraron niveles de ARNm relativo de Axin2 significativamente reducidos (es decir, normalizados al control endógeno) en comparación con células no tratadas (control). Estos datos demostraron la capacidad de los constructos VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media prolongada para inhibir la señalización de Wnt en líneas de células cancerosas con señalización de Wnt activa. Además, se investigó el efecto del bloqueo de la señalización de Wnt sobre la viabilidad celular en las líneas de células cancerosas PA-TU8988S y YAPC, cuya proliferación se informó anteriormente que dependía de la señalización de Wnt activa (Jiang et al. "Mutaciones inactivadoras de RNF43 confieren dependencia de Wnt en el adenocarcinoma ductal pancreático". *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(31):12649-54). La viabilidad celular se midió realizando un ensayo de Alamar Blue (Invitrogen, 2359 # de cat. DAL1100) después de diez días de tratamiento con los constructos VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media prolongada (concentración final de 1 μ M) o con el compuesto comparativo 802T (concentración final 1 μ M). Como se muestra en la Figura 6B, las células cancerosas PA-TU8988S tratadas con tres constructos de VHH de reacción cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media extendida mostraron un porcentaje significativamente reducido de células viables (reducción \geq 75%) en comparación con las células no tratadas (control). Tras el tratamiento con 802T, no se detectó ningún efecto sobre la viabilidad celular (Figura 6B, diagrama en el lado derecho). Estos datos demuestran la capacidad de los constructos VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media prolongada para inhibir la proliferación celular de células cancerosas que dependen de la señalización Wnt activa, y también muestran un efecto superior de estos constructos en comparación con 802T.

Además, se evaluó la dependencia de la dosis de la viabilidad celular para F013500571 en comparación con 802T, en las líneas de células cancerosas PA-TU8988S (Figura 6C) y YAPC (Figura 6D), como se describió anteriormente. Se detectó una disminución dependiente de la dosis de la viabilidad celular tras el tratamiento con F013500571. Por el contrario, no se mostró ningún efecto sobre la viabilidad celular tras el tratamiento con el compuesto comparativo 802T en las líneas de células cancerosas PA-TU8988S y YAPC. Estos datos muestran que los constructos VHH de

reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media prolongada tienen un efecto superior en comparación con 802T.

Ejemplo 9: eficacia in vivo

5 Las moléculas de unión/constructos de VHH de reacción cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media prolongadas se caracterizaron además in vivo en un modelo de tumor impulsado por Wnt. Se realizaron experimentos para determinar si estas moléculas de unión inhiben el crecimiento tumoral in vivo. La eficacia del compuesto comparativo Knob HC YW210.09 también se determinó usando el mismo modelo de tumor impulsado por Wnt. La expresión transgénica de los ligandos Wnt usando un potenciador de LTR del virus del tumor mamario de ratón (promotor de MMTV) conduce en ratones a hiperplasia ductal extensa seguida de adenocarcinomas mamarios en ratones transgénicos (TG) a los 6 meses de edad. Estos tumores mamarios son impulsados por sobreexpresión de ligandos Wnt inducida por glucocorticoides y tienen características similares a los tumores TNBC, incluida la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales (fenotipo similar a basal) y señalización de Wnt activa según la evaluación de la localización intracelular de beta-catenina. En particular, los tumores mamarios derivados de ratones transgénicos MMTV-Wnt-1 son dependientes de Wnt1. De hecho, se informó que el bloqueo de la actividad de Wnt usando un receptor de Wnt soluble que comprende el dominio rico en cisteína Frizzled8 (CRD) fusionado al dominio Fc humano (F8CRDhFc) (DeAlmeida et al. "El receptor soluble de wnt Frizzled8CRD-hFc inhibe el crecimiento de teratocarcinomas in vivo". Cancer Res. 2007;67(11):5371-9) inhibe el crecimiento tumoral in vivo. Por lo tanto, los tumores aislados de ratones transgénicos MMTV-Wnt1 se pasaron por vía subcutánea como fragmentos de tumor en ratones desnudos durante 2 a 5 pases antes del inicio del experimento de eficacia. Entre 14 y 21 días después del implante, cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de aproximadamente 150 a 250 mm³, los ratones se aleatorizaron en grupos con 7 ratones por grupo y se dosificaron por vía i.v. con compuestos. Los constructos de VHH de reacción cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media prolongada se administraron a los ratones por vía i.v. dos veces por semana, con las dosis que se muestran en la Figura 7A para F013500571 y en la Figura 7B para F013500720. El compuesto comparativo Knob HC YW210.09 también se dosificó por vía i.v. dos veces por semana, pero a dosis más altas, es decir, 30 y 45 mg/kg (Figura 7C), debido a los datos obtenidos con este compuesto en los experimentos in vitro explicados anteriormente. El volumen del tumor y el peso corporal se controlaron durante el experimento de eficacia y los volúmenes tumorales medios se indican en las Figuras 7A a 7C. La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se determinó al final del experimento de eficacia. En particular, se determinó el TGI para cada grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control (tratamiento de ratones con regulador de pH de histidina - regulador de pH de histidina de 20 mM, pH 6.5 - en el experimento que se muestra en las Figuras 7A y 7B, o con regulador de pH de citrato para el experimento que se muestra en Figura 7C). Además, se realizó un análisis histopatológico gastrointestinal (TGI) (mediante tinción con H&E de secciones del tracto GI desde el duodeno hasta el recto) al final del experimento de eficacia para evaluar la toxicidad potencial de los antagonistas de LRP5 y LRP6. Se indicó la inhibición del crecimiento tumoral (TGI), el resultado del análisis histopatológico de GI al final del estudio de eficacia in vivo, la mortalidad que corresponde al número de ratones que debieron ser sacrificados debido a una pérdida significativa de peso corporal (> 18% de pérdida del peso corporal en comparación con el inicio del experimento de eficacia) y el número de regresiones tumorales (el volumen del tumor al final del experimento más pequeño que la medida del volumen del tumor al comienzo del tratamiento) para cada grupo de tratamiento en las Tablas XIA, XIIB y XIIC, en relación con los experimentos y los datos mostrados también en las Figuras 7A, 7B y 7C, respectivamente.

45 Tabla XIA: Eficacia in vivo de F013500571 administrada vía i.v. dos veces a la semana. Los resultados de este experimento también se muestran en la Figura 7A

	Dosis [mg/kg]	TGI [%]	Regresiones [x/7]	Mortalidad [x/7]	Evaluación histopatológica GI
Control	Regulador de pH histidina	-	-	-	-
F013500571	10	128	7	0	Sin hallazgos
	4	113	7	0	Sin hallazgos
	2	61	0	0	n.d.

50 Tabla XIIB: Eficacia in vivo de F013500720 administrada vía i.v. dos veces a la semana. Los resultados de este experimento también se muestran en la Figura 7B

	Dosis [mg/kg]	TGI [%]	Regresiones [x/7]	Mortalidad [x/7]	Evaluación histopatológica GI
Control	Regulador de pH histidina				
F013500720	1	128	7	0	Sin hallazgos
	0.4	60	0	0	Sin hallazgos
	0.2	17	0	0	n.d.

Tabla XIIC: Eficacia in vivo de Knob HC YW21 0.09 administrada vía i. v. dos veces por semana. Los resultados de este experimento también se muestran en la Figura 7C

i.v.	Dosis [mg/kg]	TGI [%]	Regresiones [x/7]	Mortalidad [x/7]	Evaluación histopatológica GI
Control	Regulador de pH citrato	-	-	-	-
Knob HC YW210.09	30	80	0	0	
	45	85	0	0	Sin hallazgos

- 5 Como se puede tomar de las Figuras 7A a 7C y de las Tablas XIIA a XIIC anteriores, el tratamiento con los constructos VHH de reacción cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media prolongada (F013500571 a 4 y 10 mg/kg y F013500720 a 1 mg/kg en un programa de 2x/semana) realmente dio como resultado una regresión del tumor (es decir, inhibición del crecimiento del tumor (TGI) > 100% que corresponde a la reducción del tumor; disminución del volumen del tumor al final del experimento de eficacia en comparación con el volumen del tumor al comienzo del experimento), sin cambios significativos en el peso corporal (< 10%) y sin hallazgos reportados después del análisis histopatológico de GI. Es importante destacar que, en contraste con esto, no se pudo observar ninguna regresión tumoral tras el tratamiento con el ligante específico de LRP6 Knob HC YW210.09, incluso a la dosis máxima administrable vía i.v. /programa en ratones, que corresponden a 90 mg/kg con programa de 3x/semana.
- 10
- 15 Para seguir investigando las diferencias en la eficacia in vivo observadas en el experimento explicado anteriormente, se estableció un experimento adicional que permitía una administración más frecuente (tres veces por semana) de una dosis aún mayor del compuesto comparativo a los ratones. En resumen, para lograr dicha exposición más alta, el compuesto comparativo se administró vía i.p., como se indica en la siguiente Tabla XIID:

20 Tabla XIID: Eficacia in vivo de Knob HC YW210.09 administrada vía i.p. dos o tres veces por semana, según se indique.

i.p.	Dosis [mg/kg]	Programa	TGI [%]	Regresiones [x/5]	Mortalidad [x/5]
Control	Regulador de pH citrato	Tres veces/semana	-	-	-
Knob HC YW210.09	45	Dos veces/ semana	55	1	0
	90	Dos veces/semana	85	0	0
	90	Tres veces/ semana	87	0	0

- 25 Como puede verse a partir de los datos que se muestran en la Tabla XIID, también en esta configuración no se obtuvo un efecto significativamente más fuerte en términos de TGI. En otras palabras, estos experimentos, datos y resultados indican claramente una mayor eficacia de los constructos de VHH biparatópicos de vida media prolongada en comparación con Knob HC YW210.09, y una capacidad sin precedentes de los polipéptidos de la invención para no solo reducir el crecimiento tumoral, sino incluso para inducir el encogimiento del tumor. Por supuesto, la contracción del tumor (es decir, la regresión del tumor) es el efecto terapéutico deseado (es decir, la eficacia) para el tratamiento de pacientes con cáncer. De hecho, en los estudios clínicos, los tratamientos que inducen la regresión del tumor que dan como resultado una respuesta patológica completa (pCR) conducen positivamente a una mejora significativa de la supervivencia libre de progresión y la supervivencia general en indicaciones de alta necesidad médica no satisfecha, como el cáncer de mama.

- 35 Los ejemplos comparativos anteriores también muestran que los constructos VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media extendida no solo son superiores en términos de sus características de unión, como afinidad o valores de K_D , sino que tienen propiedades muy ventajosas y superiores en una configuración in vivo.

- 40 A continuación, se investigó si el compuesto MOR08168IgG1 LALA 6475 scfv puede proporcionar un efecto ventajoso similar. Para este propósito, se realizó un estudio de tolerabilidad in vivo en ratones como sigue: se administró el compuesto MOR08168IgG1 LALA 6475 scfv por vía i.v. a 3 mg/kg, dos veces por semana (2qw); la misma dosis/régimen a la que se detectó la eficacia in vivo en un modelo de tumor de xenoinjerto en el documento WO2011/138391, como se describe en la Fig. 22 del mismo. Primer tratamiento con MOR08168IgG1 LALA 6475 scfv se realizó el día 1 y, a partir del día 6, se detectó una pérdida significativa de peso corporal en ratones. El día 10, algunos de los ratones tratados con el compuesto MOR08168IgG1 LALA 6475 scfv mostraron una pérdida de peso corporal significativa (> 10%). El día 11 se sacrificaron los ratones y el análisis histopatológico gastrointestinal (GI) reveló inflamación con erosión en el colon y en el ciego de los ratones. Estos datos sugieren que MOR08168IgG1 LALA 6475 scfv no se tolera en la dosis/régimen eficaz. Por lo tanto, los constructos VHH de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media prolongada son superiores con respecto a la ventana terapéutica; es decir,
- 50

inducen la regresión del tumor sin cambios significativos en el peso corporal (<10%) y no se informan hallazgos después del análisis histopatológico de GI.

Ejemplo 10: Inhibición de la vía Wnt in vivo

Para caracterizar adicionalmente el efecto de las moléculas de unión/constructos de VHH de reacción cruzada con LRP5/LRP6 biparatópicos de vida media extendida sobre la señalización de Wnt, se aislaron tumores al final del experimento de eficacia, descrito en el Ejemplo 9. En particular, los tumores se aislaron 16 horas después de la última inyección con los compuestos o con el tratamiento de control. La inhibición de la señalización de Wnt se determinó mediante la reducción de la expresión de ARNm de Axin2 en tumores, se analizó como se describe en el Ejemplo 8. El cambio de plegamiento de la expresión de ARNm de Axin2 en relación con el grupo de control se informa en la Figura 8A para la eficacia in vivo con F013500571 y en la Figura 8B para la eficacia in vivo con F013500720. La cuantificación de la reducción de ARNm de Axin2 para cada grupo de tratamiento se informa en las Tablas XIII A y XIII B a continuación.

Tabla XIII A: Reducción de la expresión de ARNm de Axin2 en tumores mediante tratamiento con F013500571. Los datos se refieren a las Figuras 7A y 8A.

	Dosis [mg/kg]	TGI [%]	Reducción de Axin2 (%)
Control	Regulador de pH de histidina	-	
F013500571	10	128	83
	4	113	77
	2	61	35

Tabla XIII B: Reducción de la expresión de ARNm de Axin2 en tumores mediante tratamiento con F013500720. Los datos se refieren a las Figuras 7B y 8B.

	Dosis [mg/kg]	TGI [%]	Reducción de Axin2 (%)
Control	Regulador de pH de histidina		
F013500720	1	128	92
	0,4	60	-21
	0,2	17	35

Como puede verse en las Figuras 8A y 8B y las Tablas XIII A y XIII B, se observó una reducción significativa y una disminución dependiente de la dosis (en particular para el tratamiento con F013500571) de expresión de ARNm de Axin2 en tumores tratados con las moléculas de unión de reacción cruzada con LRP5/LRP6, en comparación con el grupo de control. Estos resultados sugieren que las moléculas de unión de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 son realmente capaces de inhibir el crecimiento tumoral suprimiendo la señalización de Wnt en las células tumorales.

Ejemplo 11: procedimiento de fabricación industrial

11.1 Fermentación: Cualquiera de los polipéptidos establecidos en las Tablas III y V anteriores puede expresarse en el citoplasma de diferentes cepas de E. coli como W3110, TG1, BL21, BL21 (DE3), HMS174, HMS174(DE3), MM294 bajo el control de un promotor inducible. Este promotor se puede elegir entre lacUV5, tac, T7, trp, T5, araB. Preferiblemente, los medios de cultivo están completamente definidos de acuerdo con Wilms et al, 2001 (Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Syltatk, C, Mattes, R., Siemann, M. y Altenbuchner, J.: Fermentación de alta densidad celular para la producción de L-N-carbamoylase utilizando un sistema de expresión basado en el promotor rhaBAD de Escherichia coli. Biotechnology and Bioengineering, 73:95-103 (2001)), DeLisa et al, 1999 (DeLisa, MP, Li, J. C., Rao, G., Weigand, W.A., y Bentley, W.E.: Monitoreo de la expresión de proteína de fusión operon-GFP durante el cultivo de alta densidad celular de Escherichia coli utilizando un sensor óptico en línea. Biotechnology and Bioengineering, 65: 54-64. (1999)) o equivalente. Sin embargo, la suplementación del medio con aminoácidos como isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina o componentes de medios complejos como peptona de soja o extracto de levadura puede ser beneficioso. El proceso de fermentación se realiza en modo de lotes suministrados. Condiciones: Temperatura 30 - 40°C, pH 6 - 7.5, el oxígeno disuelto se mantiene por encima del 20 %. Después del consumo de la fuente de C inicial, el cultivo se alimenta con el medio de alimentación indicado anteriormente (o equivalente). Cuando se alcanza un peso de células secas en el fermentador de 40 a 90 g/L, el cultivo se induce con un inductor apropiado correspondiente al sistema promotor utilizado (por ejemplo, IPTG, lactosa, arabinosa). La inducción puede realizarse como una inducción completa pulsada o como una inducción parcial alimentando el inductor respectivo en el fermentador durante un tiempo prolongado. La fase de producción debe durar al menos 4 horas. Las células se recuperan por centrifugación en centrifugas de cuenco, centrifugas de cuenco tubular o centrifugas de pila de discos, el sobrenadante del cultivo se desecha.

11.2 Purificación: La masa de células de *E. coli* se resuspende en una cantidad de 6 a 8 veces de regulador de pH de lisis (regulador de pH fosfato o Tris, pH 7-8.5). La lisis celular se realiza preferiblemente mediante homogeneización a alta presión seguida de la eliminación de los restos celulares mediante centrifugación en centrifugas de cuenco, cuenco tubular o pila de discos. El sobrenadante que contiene la proteína diana se filtra opcionalmente usando un filtro de 0.22-10 μm y se separa mediante cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo, Toyopearl MegaCap® II SP-550EC, Toyopearl GigaCap S-650M, SP Sepharose BB, SP Sepharose FF o S HyperCel™) a pH 7-8.5. La elución se realiza mediante un gradiente lineal creciente de NaCl a pH 7-8.5. Las fracciones que contienen la proteína diana se combinan y posteriormente se incuban con DTT de 5-10 mM para prevenir la dimerización o agregación mediada por residuos de cisteína libres. Después de la adición adicional de sulfato de amonio de 0.8-1 M o NaCl de 2-3 M, la solución se separa mediante cromatografía de interacción hidrófila (por ejemplo, Fenil Sefarosa HP, Fenil Sefarosa FF, Butil Sefarosa HP, Butil Sefarosa FF, Butil Toyopearl 650 (S, M, C), Fenilo Toyopearl 650 (S, M, C)) a pH 7-8.5. La elución se lleva a cabo a pH 7-8.5 mediante un gradiente lineal decreciente de sulfato de amonio o NaCl en presencia de DTT de 5 mM. Las fracciones que contienen la proteína diana con un nivel de pureza mínimo del 90% se combinan y desalan mediante diafiltración en presencia de DTT de 5 mM seguido de concentración hasta aproximadamente 5 mg/ml. El replegamiento posterior se realiza diluyendo la solución de proteína 1:5-1:20 con Tris de 50 mM, NaCl de 150 mM, Cistamina de 4 mM, CHAPS de 10 mM a pH 8.5 hasta una concentración final de proteína de 0.25 -1 mg/ml. La solución de replegamiento se incuba con agitación durante 12-36 h a temperatura ambiente y luego se separa mediante cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo, SP Sepharose FF, SP Sepharose HP, Toyopearl SP-650 (S, M, C)) a pH 7-8.5.

La elución se realiza mediante un gradiente lineal creciente de NaCl a pH 7-8.5. Las fracciones que contienen la proteína diana monomérica se combinan y formulan en fosfato de sodio de 25 mM, trehalosa de 220 mM sin endotoxina, pH 7.5 mediante diafiltración. La solución se esteriliza por filtración y se almacena entre 2 y 8°C.

Ejemplo 12: Formulación farmacéutica para administración s.c.

Cualquiera de los constructos de polipéptidos biparatópicos anteriores de la invención se puede seleccionar para la fabricación de una formulación farmacéutica para aplicación subcutánea que tenga una composición como sigue:

Sustancia farmacológica:	100 mg/ml (1 a 3 nmol/ml)
Regulador de pH de acetato:	25 mM
Trehalosa:	220 mM
Tween-20:	0.02%

El fármaco se formula en una solución que tiene la composición anterior, se esteriliza y se almacena entre 2 y 8°C.

Ejemplo 13: Uso farmacéutico en humanos

La solución preparada en el Ejemplo 11.2 anterior se aplica a un paciente que la necesita, como un ser humano que padece un cáncer sensible a los inhibidores de la señalización de Wnt, mediante infusión intravenosa (dosis de 100 a 200 mg) cada dos a cuatro semanas.

Ejemplo 14: Efecto de la inhibición de la señalización de Wnt3a en la liberación de citocinas proinflamatorias por células dendríticas en un ensayo ex vivo

Las PBMC se obtuvieron de donantes sanos con consentimiento informado. Las células dendríticas derivadas de monocitos humanos (Mo-DC) se generaron como sigue: se cultivaron PBMC en medio X-VIVO suplementado con 50 ng/ml de GM-CSF y 50 ng/ml de IL-4. Después de 24 h de cultivo, el sobrenadante se eliminó cuidadosamente y se reemplazó con medio X-VIVO suplementado con el mismo GM-CSF e IL-4. Al cuarto día, el sobrenadante se eliminó cuidadosamente y se reemplazó con medio X-VIVO en presencia de LPS solo o en combinación con Wnt3a humano o con Wnt3a humano y moléculas de unión de reacción cruzada con LRP5/LRP6. Al día siguiente, se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a análisis de TNF-alfa mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como se informó anteriormente (Oderup et al. "Proteínas Wnt canónicas y no canónicas programan respuestas de las células dendríticas para la tolerancia". *J Immunol.* 2013;190(12):2595 6126 -34), y como se muestra en la Figura 9A, Wnt3a inhibe directamente la secreción de citocinas proinflamatorias (es decir, liberación de TNF-alfa) por células dendríticas diferenciadas (DC). La supresión impulsada por Wnt3a de la liberación de TNF-alfa de las CD se restauró mediante la adición de moléculas de unión de reacción cruzada con LRP5/LRP6.

Estos datos muestran que las moléculas de unión formateadas, biparatópicas y de secuencia optimizada son capaces de restaurar la secreción de TNF α por las células dendríticas tratadas con Wnt3a, suprimiendo así el efecto inhibitorio de Wnt sobre las células dendríticas. Es importante notar que el bloqueo de la vía Wnt en células dendríticas en el microambiente tumoral podría representar un enfoque terapéutico potencial para romper la supresión inmunológica mediada por tumores y aumentar la inmunidad antitumoral.

Para investigar los efectos de las CD en las células T (células T efectoras), las CD pretratadas con Wnt3a con o sin moléculas de unión de reacción cruzada con LRP5/LRP6 se cultivaron conjuntamente con células T, se aislaron de

PBMC, como se describió anteriormente (Oderup et al. al. "Proteínas Wnt canónicas y no canónicas programan respuestas de las células dendríticas para la tolerancia". J Immunol. 2013;190(12): 6126-34). Después de 3 días de co-cultivo de células DC/T, los sobrenadantes se recogieron y se sometieron a análisis de IFN gamma mediante ELISA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 La secreción de IFNgamma es un marcador de la activación de las células T. Como se muestra en la Figura 9B, la inhibición de DC mediada por Wnt3a conduce a una secreción reducida de IFNgamma por las células T (inhibición de la función de las células T), que se restaura completamente mediante el tratamiento con moléculas de unión de reacción cruzada con LRP5/LRP6.

10 En resumen, estos datos muestran que las moléculas de unión de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 suprimen el efecto inhibitorio de Wnt sobre las células dendríticas, lo que conduce a la restauración de la función de las células T.

15 Se sabe que la activación/estimulación continua de las células T induce la diferenciación terminal, lo que da como resultado un fenotipo de células T agotado, una pérdida progresiva de la función de las células T. Por lo tanto, se prevé que el efecto de las moléculas de unión de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 en las células T, mediado por la activación de las CD, podría estar limitado por el agotamiento de las células T. Por lo tanto, se espera que los tratamientos combinados, que combinan la administración de moléculas de unión de reactividad cruzada con LRP5/LRP6 con la administración de un inhibidor del punto de control inmune que bloquea el agotamiento de las células T, ayuden a activar y mantener la función de las células T, cambiando así el microambiente del tumor y, por lo tanto, apoyando el efecto terapéutico de las moléculas de la invención.

Listado de secuencias

25 <110> BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

<120> POLIPÉPTIDOS BIPARATÓPICOS QUE ANTAGONIZAN SEÑALIZACIÓN DE WNT EN CÉLULAS TUMORALES

30 <130> P12-0401/WO/1

<160>47

35 <170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 5

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> CDR1 de Wntl-333E06mod

<400> 1

Thr Tyr Thr Val Gly
1 5

50 <210> 2

<211> 17

55 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> CDR2 de Wntl-333E06mod

<400> 2

65

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

<210> 3

5 <211>14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> CDR3 de Wntl-333E06mod

15 <400> 3

Asp Thr Arg Thr Val Ala Leu Leu Gln Tyr Arg Tyr Asp Tyr
 1 5 10

<210> 4

20 <211>5

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de Wntl-333G06

30 <400> 4

Ser Tyr Ala Met Gly
 1 5

35 <210> 5

<211> 17

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> CDR2 de Wntl-333G06

<400> 5

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

50 <210> 6

<211>19

55 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de Wntl-333G06

5 <400> 6

Ala Arg Arg Val Arg Ser Ser Thr Arg Tyr Asn Thr Gly Thr Trp Trp
 1 5 10 15
 Trp Glu Tyr

10 <210> 7

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> CDR1 de Wntl-332D03mod

<400> 7

Arg Tyr Thr Met Gly
 1 5

25 <210> 8

<211> 17

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> CDR2 de Wntl-332D03mod

<400> 8

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

40 <210> 9

<211> 20

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> CDR3 de Wntl-332D03mod

<400> 9

55

Asp Arg Arg Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Ile Leu Leu Tyr Ser Ser Gly

1 5 10 15
 Arg Tyr Glu Tyr
 20

<210> 10
 5 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> CDR1 de Wnt3a-093A01
 15 <400> 10

Ser Tyr Ala Met Gly
 1 5

<210> 11
 20 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR2 de Wnt3a-093A01
 30 <400> 11

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

35 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> CDR3 de Wnt3a-093A01
 <400> 12

Ser Pro Ile Pro Tyr Gly Ser Leu Leu Arg Arg Arg Asn Asn Tyr Asp
 1 5 10 15
 Tyr

50 <210> 13

Ser Phe Gly Met Ser
1 5

- 5 <210> 17
- <211> 17
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>

- <223> CDR2 de Alb11
- 15 <400> 17

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

- 20 <210> 18
- <211> 6
- <212> PRT
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> CDR3 de Alb11
- <400> 18

Gly Gly Ser Leu Ser Arg
1 5

- 35 <210> 19
- <211> 123
- 40 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 45 <223> Dominio de VHH Wnt1-333E06mod
- <400> 19

ES 2 821 099 T3

```

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr
20          25          30
Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35          40          45
Ala Ala Ile Arg Arg Arg Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Ala Asp Thr Arg Thr Val Ala Leu Leu Gln Tyr Arg Tyr Asp Tyr
100          105          110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 20

5 <211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Dominio de VHH Wntl-333G06

15 <400> 20

```

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35          40          45
Ala Ala Ile Arg Arg Ser Gly Arg Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Ala Ala Arg Arg Val Arg Ser Ser Thr Arg Tyr Asn Thr Gly Thr
100          105          110
Trp Trp Trp Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120          125

```

<210>21

20

<211> 129

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Dominio de VHH Wntl-332D03mod

30

<400> 21

ES 2 821 099 T3

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Val Arg Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Arg Arg Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Ile Leu Leu Tyr Ser
 100 105 110
 Ser Gly Arg Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser

<210> 22

5

<211> 126

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio de VHH Wnt3a-093A01

15

<400> 22

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ser Pro Ile Pro Tyr Gly Ser Leu Leu Arg Arg Arg Asn Asn
 100 105 110
 Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

20 <210> 23

<211> 125

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 821 099 T3

<223> Dominio de VHH Wnt3a-367B10

<400> 23

```

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

```

5

```

      100      105      110
Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115      120      125

```

<210> 24

<211> 115

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Dominio de VHH Alb11

<400> 24

20

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
      20      25      30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
      100      105      110
Val Ser Ser
      115

```

<210> 25

25

<211> 435

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> constructo de VHH F013500575

5 <400> 25

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

Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
195 200 205
Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
210 215 220
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
225 230 235 240
Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
245 250 255
Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
260 265 270
Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
275 280 285
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
290 295 300
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
305 310 315 320
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr
325 330 335
Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
340 345 350
Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
355 360 365
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
370 375 380
Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
385 390 395 400
Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Pro Ile Pro Tyr Gly Ser Leu Leu Arg
405 410 415
Arg Arg Asn Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
420 425 430
Ser Ser Ala
435

<210> 26

<211> 439

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> constructo de VHH F013500571

15

<400> 26

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Arg Arg Ser Gly Arg Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ala Arg Arg Val Arg Ser Ser Thr Arg Tyr Asn Thr Gly Thr
 100 105 110
 Trp Trp Trp Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 165 170 175
 Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 180 185 190
 Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 195 200 205
 Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala
 210 215 220
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr
 225 230 235 240
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
 245 250 255
 Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr
 260 265 270
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 275 280 285
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 290 295 300
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
 305 310 315 320
 Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
 325 330 335
 Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln
 340 345 350
 Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Arg Ser
 355 360 365
 Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 370 375 380
 Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 385 390 395 400
 Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Pro Arg Gly Tyr
 405 410 415
 Gly Val Ala Tyr Val Ser Ala Tyr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 420 425 430
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 435

<211> 440

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> constructo de VHH F013500720

<400> 27

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Ile Val Arg Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Asp Arg Arg Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Ile Leu Leu Tyr Ser
100 105 110
Ser Gly Arg Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
145 150 155 160
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
165 170 175
Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
180 185 190
Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
195 200 205
Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
210 215 220
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
225 230 235 240
Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
245 250 255
Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
260 265 270
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
275 280 285
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
290 295 300
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
305 310 315 320
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
325 330 335
Ala Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg
340 345 350
Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Arg
355 360 365
Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
370 375 380
Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
385 390 395 400
Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Pro Arg Gly
405 410 415
Tyr Gly Val Ala Tyr Val Ser Ala Tyr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
420 425 430
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
435 440

5 <210> 28
 <211>149
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Dominio de VHH F0129093A01
 15 <400> 28

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
      20      25      30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
      35      40      45
Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Ala Ser Pro Ile Pro Tyr Gly Ser Leu Leu Arg Arg Arg Asn Asn
      100      105      110
Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala

      115      120      125
Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His
      130      135      140
His His His His His
145
  
```

20 <210> 29
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Dominio de VHH F0130333G06
 30 <400> 29

```

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

```

<210> 30

5 <211>148

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Dominio de VHH F0129093A03

15

<400> 30

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr
20          25          30
Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35          40          45
Ala Ala Ile Asn Trp Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Ala Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Gly Arg Thr Tyr Tyr Glu Leu Tyr
100         105         110
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala
115         120         125
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His
130         135         140

His His His His
145

```

<210> 31

ES 2 821 099 T3

<211>146

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Dominio de VHH F0130333E06

<400> 31

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr
20      25      30
Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35      40      45
Ala Ala Ile Arg Arg Arg Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Ala Asp Thr Arg Thr Val Ala Leu Leu Gln Tyr Arg Tyr Asp Tyr
100     105     110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Gln
115     120     125
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His
130     135     140
His His
145
    
```

15

<210> 32

<211> 152

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Dominio de VHH F0130332D03

<400> 32

```

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

```

<210> 33

5 <211>148

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Dominio de VHH F0130367B10

15 <400> 33

```

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

```

<210> 34

20

<211>149

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio de VHH F0130378B05

10

<400> 34

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
          35          40          45
Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Ala Asp Arg Arg Val Tyr Ser Thr Leu Pro Pro Thr Thr Ser Arg
          100          105          110
Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala
          115          120          125
Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His
          130          135          140
His His His His His
145
    
```

15 <210> 35

<211>147

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Dominio de VHH F0130378A04

<400> 35

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

<210> 36

5 <211> 150

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Dominio de VHH F0130372C08

15

<400> 36

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

<210> 37

<211> 462

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> constructo de VHH F013500016

<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Asn Arg Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Arg Arg Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Ser Leu Leu Tyr Ser
 100 105 110
 Ser Asn Arg Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 165 170 175
 Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 180 185 190
 Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 195 200 205
 Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
 210 215 220
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
 225 230 235 240
 Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
 245 250 255
 Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
 260 265 270
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 275 280 285
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 290 295 300
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
 305 310 315 320
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 325 330 335
 Ala Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg
 340 345 350
 Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Arg
 355 360 365
 Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 370 375 380
 Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 385 390 395 400
 Arg Pro Glu Gly Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Pro Arg Gly
 405 410 415
 Tyr Gly Val Ala Tyr Val Ser Ala Tyr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 420 425 430
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 435 440 445
 Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His
 450 455 460

<210> 38

<211> 463

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> constructo de VHH F013500018

15

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Asn Arg Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Arg Arg Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Ser Leu Leu Tyr Ser
 100 105 110
 Ser Asn Arg Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 165 170 175
 Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 180 185 190
 Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 195 200 205
 Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
 210 215 220
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
 225 230 235 240
 Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
 245 250 255
 Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
 260 265 270
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 275 280 285
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 290 295 300
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
 305 310 315 320
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 325 330 335
 Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg
 340 345 350
 Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Arg Ser
 355 360 365
 Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 370 375 380
 Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 385 390 395 400
 Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Arg Arg Val
 405 410 415
 Tyr Ser Thr Leu Pro Pro Thr Thr Ser Arg Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln
 420 425 430
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile

435 440 445
 Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His
 450 455 460

<211>461

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> constructo de VHH F013500021

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Arg Arg Ser Gly Arg Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ala Arg Arg Val Arg Ser Ser Thr Arg Tyr Asn Thr Gly Thr
 100 105 110
 Trp Trp Trp Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 165 170 175
 Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 180 185 190
 Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 195 200 205
 Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala
 210 215 220
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr
 225 230 235 240
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
 245 250 255
 Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr
 260 265 270
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 275 280 285
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 290 295 300
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
 305 310 315 320
 Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
 325 330 335
 Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln
 340 345 350
 Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Arg Ser
 355 360 365
 Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 370 375 380
 Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 385 390 395 400

ES 2 821 099 T3

```
Pro Glu Gly Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Pro Arg Gly Tyr
      405                               410           415
Gly Val Ala Tyr Val Ser Ala Tyr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      420                               425           430
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
      435                               440           445
Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His
      450                               455           460
```

<210> 40

5 <211> 456

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> constructo de VHH F013500026

15 <400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Arg Arg Arg Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Thr Arg Thr Val Ala Leu Leu Gln Tyr Arg Tyr Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val
 145 150 155 160
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu
 165 170 175
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met
 180 185 190
 Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
 195 200 205
 Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 210 215 220
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
 245 250 255
 Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 260 265 270
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser
 275 280 285
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 290 295 300
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 305 310 315 320
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr
 325 330 335
 Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
 340 345 350
 Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr

 355 360 365
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 370 375 380
 Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Gly Thr Ala
 385 390 395 400
 Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Val Ala Tyr Val
 405 410 415
 Ser Ala Tyr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 420 425 430
 Ser Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly
 435 440 445
 Ala Ala His His His His His His
 450 455

<210> 41

<211>461

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> constructo de VHH F013500030

<400> 41

15

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35          40          45
Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Ala Asp Arg Arg Val Tyr Ser Thr Leu Pro Pro Thr Thr Ser Arg
100         105         110
Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
115         120         125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130         135         140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145         150         155         160
Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
165         170         175
Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
180         185         190
Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
195         200         205
Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser
210         215         220
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu
225         230         235         240
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
245         250         255
Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val
260         265         270
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
275         280         285
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
290         295         300
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
305         310         315         320

```

Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser
				325					330					335	
Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	Gly	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro
			340					345					350		
Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Ala	Ile	Ser	Trp	Ser	Gly	Gly	Arg
		355					360					365			
Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
	370					375					380				
Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu
385					390					395					400
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Gly	Ser
			405						410					415	
Val	Ser	Pro	Asn	Ser	Ser	Ser	Arg	Tyr	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			420					425					430		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu
		435				440						445			
Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala	His	His	His	His	His	His			
	450					455						460			

<210> 42

5 <211> 460

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> constructo de VHH F013500032

15 <400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Thr Arg Thr Gly Arg Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Arg Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Phe Tyr Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 145 150 155 160
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser
 165 170 175
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
 180 185 190
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 195 200 205
 Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 210 215 220
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu
 225 230 235 240
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 245 250 255
 Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 260 265 270
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

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

<211> 462

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> constructo de VHH F013500033

<400> 43

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35          40          45
Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Ala Asp Arg Arg Val Tyr Ser Thr Leu Pro Pro Thr Thr Ser Arg
100         105         110
Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
115         120         125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130         135         140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145         150         155         160
Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
165         170         175
Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
180         185         190
Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
195         200         205
Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser
210         215         220
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu
225         230         235         240

```

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

<210> 44

5 <211> 456

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> constructo de VHH F013500039

15

<400> 44

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr
			20						25				30		
Val	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val
		35					40					45			
Ala	Ala	Ile	Asn	Trp	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Ala	Ser	Arg	Ser	Ser	Tyr	Ala	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Tyr
			100					105					110		
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly
		115					120						125		
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
	130					135					140				
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
145					150					155					160
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asn
			165						170					175	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe
			180					185					190		
Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			195					200					205		
Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	210					215					220				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Thr	Thr	Leu	Tyr
225					230				235					240	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			245						250					255	
Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
			260					265					270		
Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
		275					280					285			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
	290					295					300				
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly
305					310					315					320
Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly
			325						330					335	
Arg	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Thr	Val	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
			340					345					350		
Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Ala	Ile	Arg	Arg	Arg	Gly	Ser	Ser	Thr
		355				360						365			
Tyr	Tyr	Ser	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn
	370					375					380				
Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp
385					390					395				400	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Asp	Thr	Arg	Thr	Val	Ala	Leu	Leu
			405						410					415	
Gln	Tyr	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
			420					425					430		
Ser	Gly	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly
		435					440					445			
Ala	Ala	His	His	His	His	His	His								
	450						455								

<211> 463

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> constructo de VHH F013500046

<400> 45

```

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

Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val
				165					170					175	
Gln	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr
			180					185					190		
Phe	Ser	Ser	Phe	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly
		195					200					205			
Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr
	210					215					220				
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys
225				230						235					240
Thr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala
				245					250					255	
Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly
			260					265					270		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
		275					280					285			
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
	290					295					300				
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu
305				310						315					320
Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys
				325					330					335	
Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala	Met	Gly	Trp	Phe	Arg
			340					345					350		
Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Ala	Ile	Ser	Trp	Ser
		355					360					365			
Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile
	370					375					380				
Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu
385				390						395					400
Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Ser	Pro	Ile	Pro
				405					410					415	
Tyr	Gly	Ser	Leu	Leu	Arg	Arg	Arg	Asn	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			420					425					430		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile
		435					440					445			
Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala	His	His	His	His	His	His	
	450					455						460			

<210> 46

5 <211>457

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> constructo de VHH F013500047

15

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Arg Arg Arg Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Thr Arg Thr Val Ala Leu Leu Gln Tyr Arg Tyr Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser

 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val
 145 150 155 160
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu
 165 170 175
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met
 180 185 190
 Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
 195 200 205
 Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 210 215 220
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
 245 250 255
 Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 260 265 270
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 275 280 285
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 290 295 300
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 305 310 315 320
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr
 325 330 335
 Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
 340 345 350
 Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
 355 360 365
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 370 375 380
 Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
 385 390 395 400
 Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Pro Ile Pro Tyr Gly Ser Leu Leu Arg
 405 410 415
 Arg Arg Asn Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 420 425 430
 Ser Ser Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 435 440 445
 Gly Ala Ala His His His His His His
 450 455

<210> 47

<211> 462

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> constructo de VHH F013500053

<400> 47

15

```

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

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Ala	Ser	Pro	Ile	Pro	Tyr	Gly	Ser	Leu	Leu	Arg	Arg	Arg	Asn	Asn
			100					105					110		
Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly
		115					120					125			
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
		130					135				140				
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
145						150					155				160
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
				165							170				175
Asn	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser
			180					185						190	
Phe	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
		195					200					205			
Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser
		210				215					220				
Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Thr	Thr	Leu
225					230					235					240
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				245						250					255
Cys	Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			260					265					270		
Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
		275					280						285		
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
		290				295					300				
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly
305					310						315				320
Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser
				325						330				335	
Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro
			340					345					350		
Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Ala	Ile	Arg	Arg	Ser	Gly	Arg	Arg
		355					360					365			
Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
		370				375					380				
Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu
385					390					395					400
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Ala	Arg	Arg	Val	Arg	Ser	Ser
			405						410					415	
Thr	Arg	Tyr	Asn	Thr	Gly	Thr	Trp	Trp	Trp	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			420					425					430		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser
		435					440					445			
Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala	His	His	His	His	His	His		
		450				455						460			

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que se une específicamente a LRP5 o LRP6, que comprende

5 - un primer dominio variable individual de inmunoglobulina seleccionado del grupo de dominios variables individuales de inmunoglobulina (i) a (iii) definidos por comprender las siguientes secuencias de CDR:

(i):

10 CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)
 CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)
 CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

(ii):

15 CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)
 CDR2: AIRRSGRRYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)
 CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6)

(iii):

20 CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)
 CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)
 CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYDY (= SEQ ID NO:9),

y

- un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina seleccionado del grupo de dominios variables individuales de inmunoglobulina (iv) y (v) definidos porque comprenden las siguientes secuencias de CDR:

30 (iv):

35 CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)
 CDR2: AISWSSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)
 CDR3: SPIPYGSLRRRRNNDY (= SEQ ID NO:12)

(v):

40 CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)
 CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)
 CDR3: DPRGYGVAYVSAYYDY (= SEQ ID NO:15).

2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que

45 - dicho primer dominio variable individual de inmunoglobulina comprende las siguientes secuencias de CDR:

50 CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)
 CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)
 CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

y en el que

- dicho segundo dominio variable individual de inmunoglobulina comprende las siguientes secuencias de CDR:

55 CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)
 CDR2: AISWSSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)
 CDR3: SPIPYGSLRRRRNNDY (= SEQ ID NO:12).

3. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que

60 - dicho primer dominio variable individual de inmunoglobulina comprende las siguientes secuencias de CDR:

65 CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)
 CDR2: AIRRSGRRYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)
 CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6)

y en el que

- dicho segundo dominio variable individual de inmunoglobulina comprende las siguientes secuencias de CDR:

5 CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)
 CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)
 CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEEY (= SEQ ID NO:15).

4. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que

10 - dicho primer dominio variable individual de inmunoglobulina comprende las siguientes secuencias de CDR:

15 CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)
 CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)
 CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEEY (= SEQ ID NO:9)

y en el que

- dicho segundo dominio variable individual de inmunoglobulina comprende las siguientes secuencias de CDR:

20 CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)
 CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)
 CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEEY (= SEQ ID NO:15).

25 5. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichos dominios variables individuales de inmunoglobulina son dominios VHH, y preferiblemente dominios VHH humanizados.

6. El polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que

30 - dicho primer dominio variable individual de inmunoglobulina tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 19 y

- dicho segundo dominio variable individual de inmunoglobulina tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 22.

35 7. El polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que

40 - dicho primer dominio variable individual de inmunoglobulina tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 20 y

- dicho segundo dominio variable individual de inmunoglobulina tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 23.

45 8. El polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, en el que

- dicho primer dominio variable individual de inmunoglobulina tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 21 y

50 - dicho segundo dominio variable individual de inmunoglobulina tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 23.

9. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho primer y segundo dominios variables individuales de inmunoglobulina están unidos covalentemente por un péptido enlazador, en el que dicho péptido enlazador opcionalmente comprende o consiste en un tercer dominio variable individual de inmunoglobulina.

55 10. El polipéptido según la reivindicación 9, en el que dicho tercer dominio variable individual de inmunoglobulina es un dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina, y preferiblemente el dominio Alb11, definido por la SEC id NO: 24.

60 11. Un polipéptido seleccionado del grupo de polipéptidos que comprende o consiste en SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, y SEQ ID NO: 27

12. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

65 13. Célula anfitriona portadora de un vector de expresión según la reivindicación 12.

14. Un procedimiento de fabricación de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende las etapas de
- 5 - cultivar una célula anfitriona según la reivindicación 13 en condiciones que permitan la expresión de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11; y
- recuperar y opcionalmente purificar dicho polipéptido.
- 10 15. Una composición farmacéutica que comprende (i) como ingrediente activo, el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente (iii) un diluyente, excipiente, adyuvante y/o estabilizador.
- 15 16. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso como medicamento en un procedimiento para el tratamiento, prevención o alivio de una enfermedad, trastorno o afección en un ser humano o un animal, preferiblemente para su uso en un procedimiento (a) para el tratamiento de cáncer, como cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, sarcomas, cáncer de ovario o carcinoma hepatocelular, o (b) para el tratamiento de enfermedad pulmonar idiopática, o (c) para el tratamiento de una retinopatía causada por una señalización de Wnt anormal.
- 20 17. Un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos anti-PD1, anticuerpos anti-PDL 1, anticuerpos anti-CTLA4, anticuerpos anti-BTLA, anticuerpos anti-LAG3 y anticuerpos anti-TIM3, o en combinación con una vacuna contra el cáncer.
- 25

Figura 1

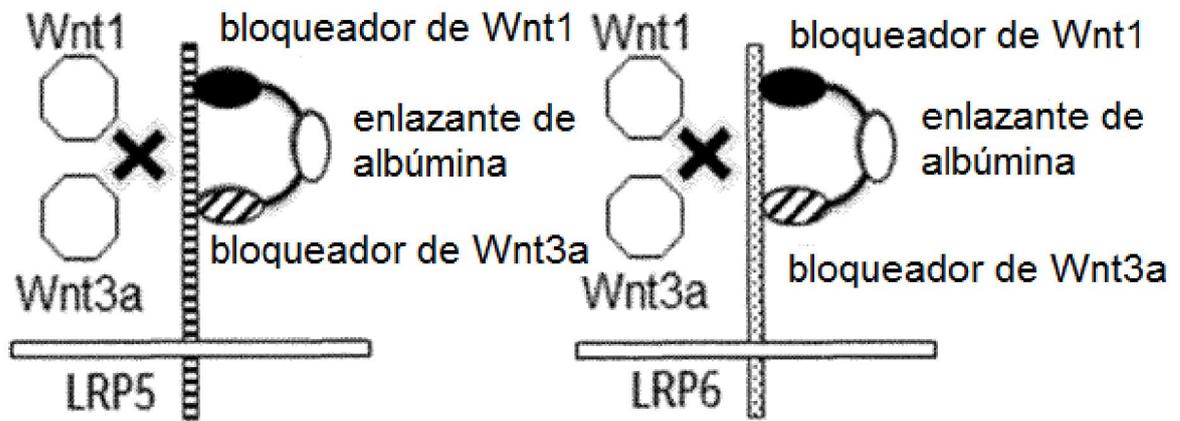


Figura 2

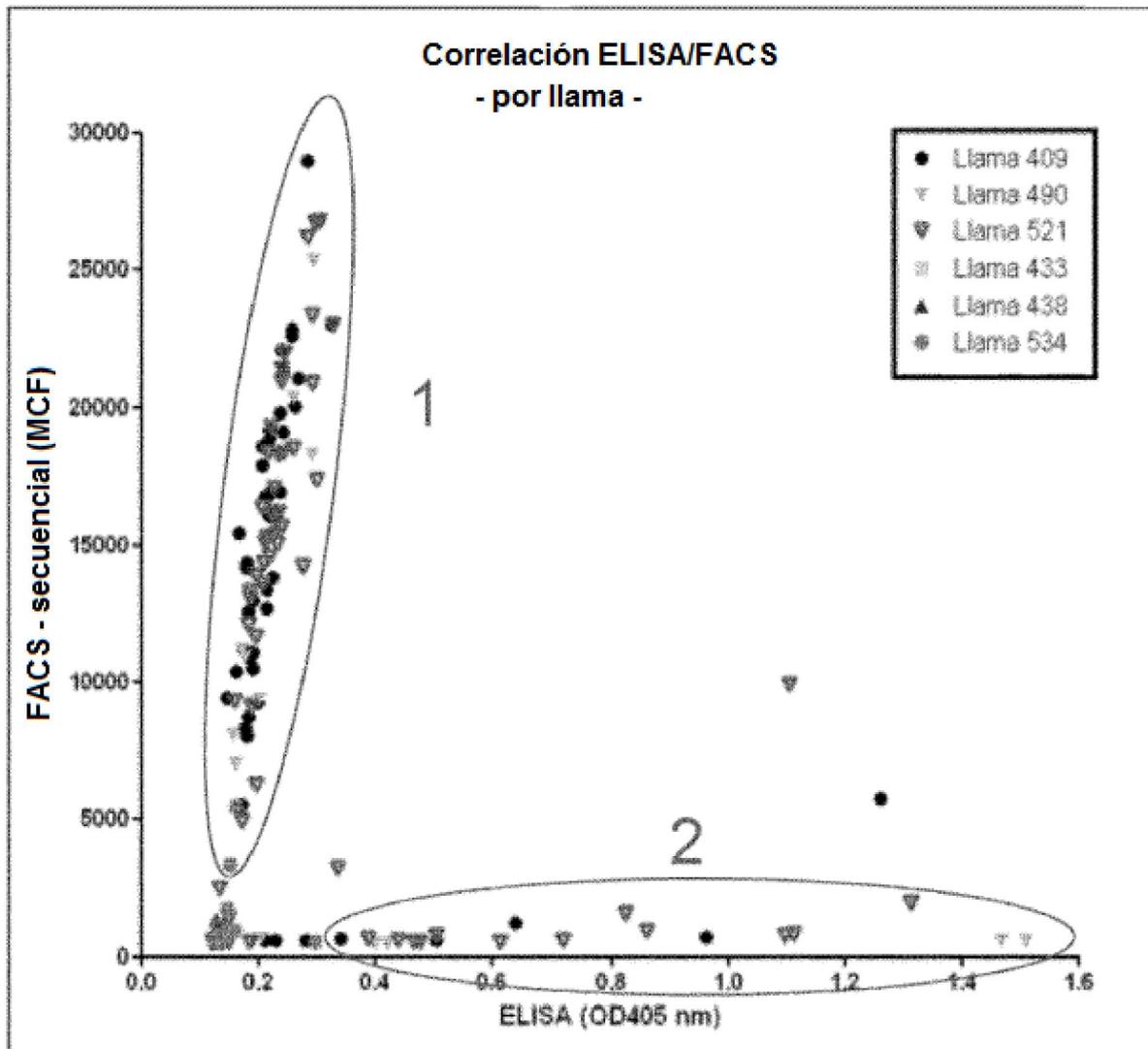


Figura 3A

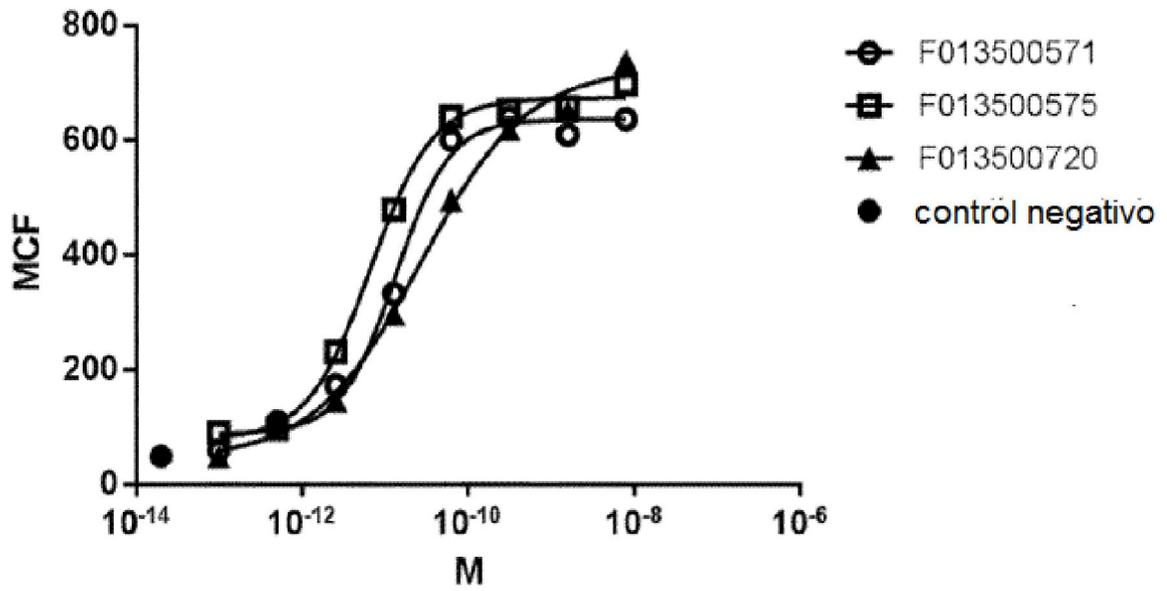


Figura 3B

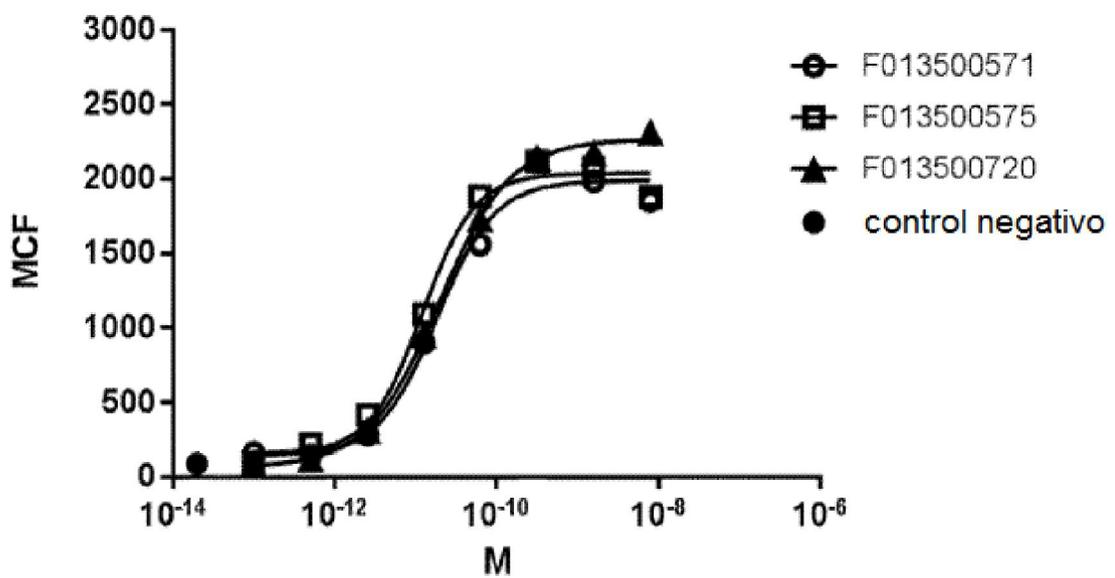


Figura 4A

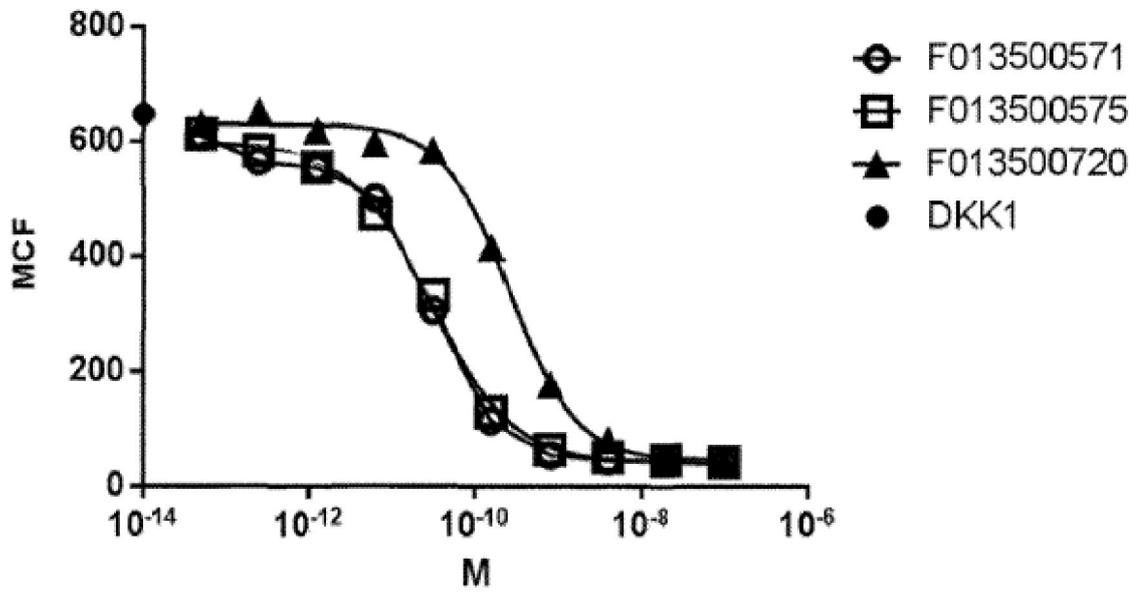


Figura 4B

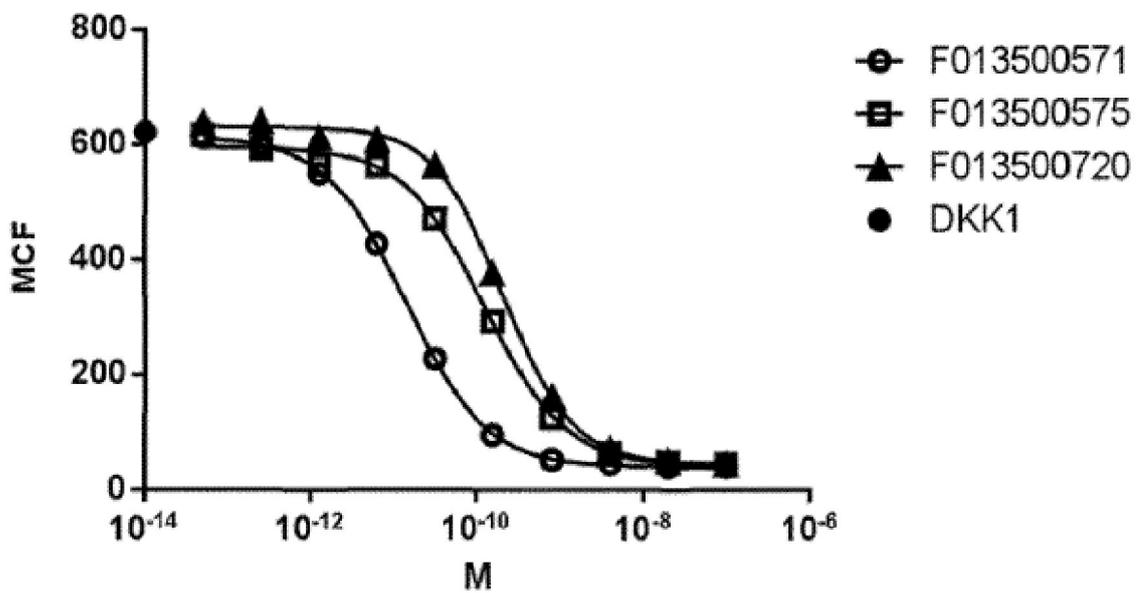


Figura 5A

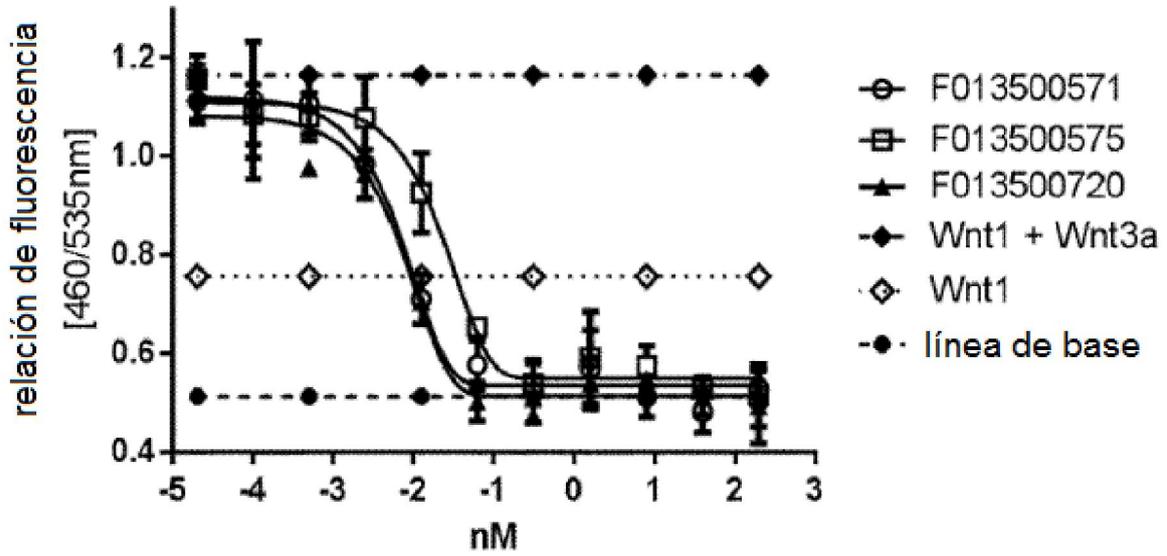


Figura 5B

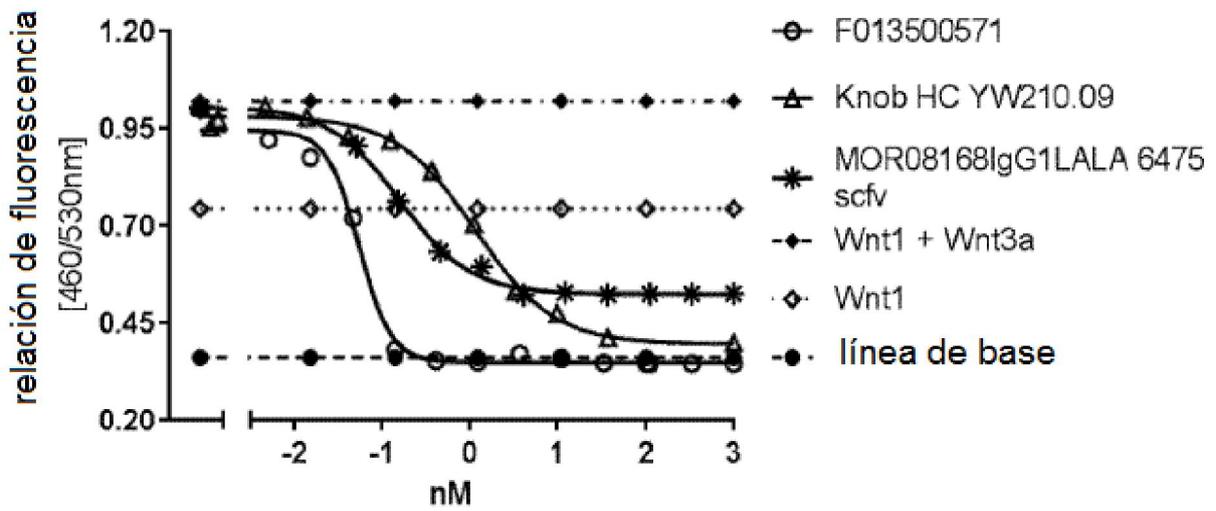


Figura 5C

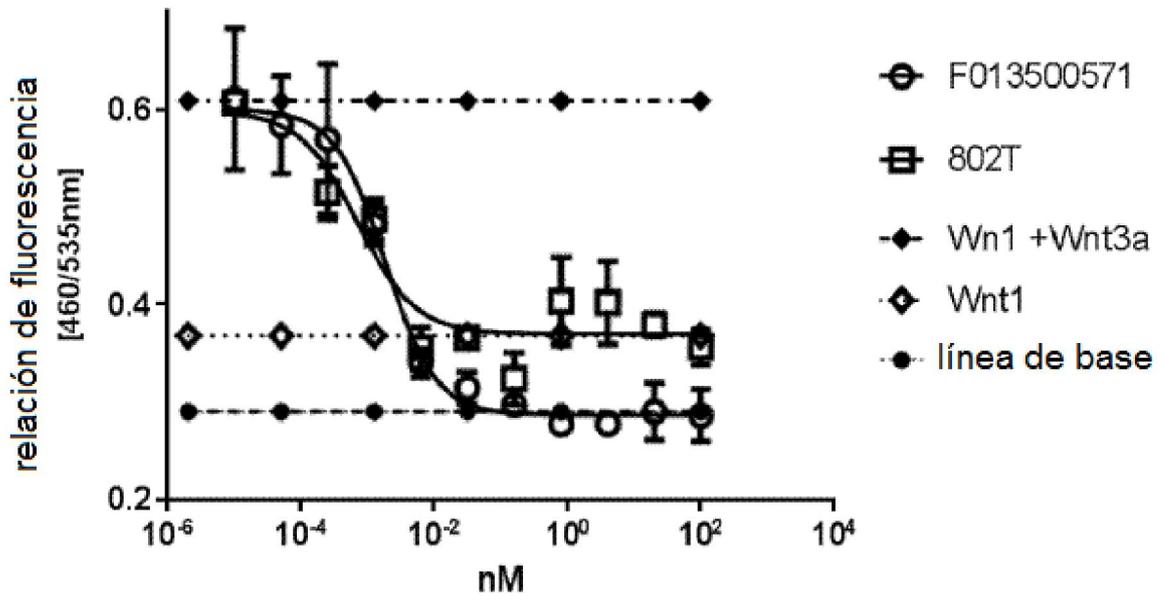


Figura 6A

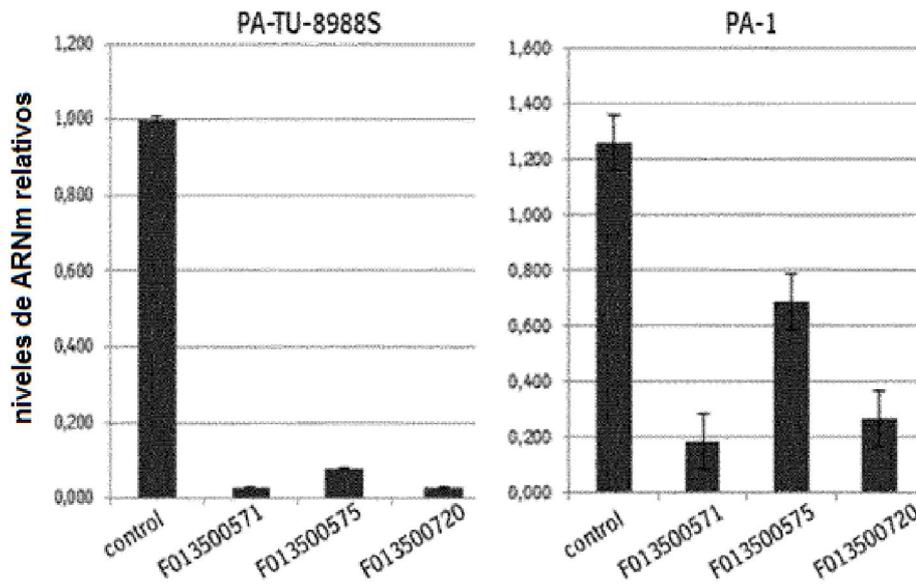


Figura 6B

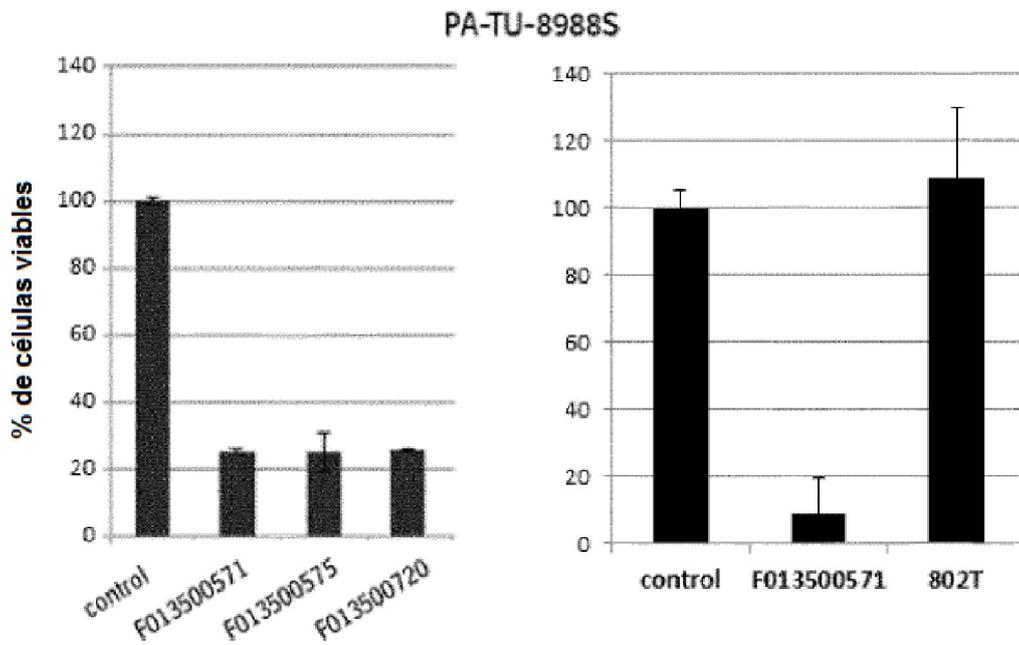


Figura 6C

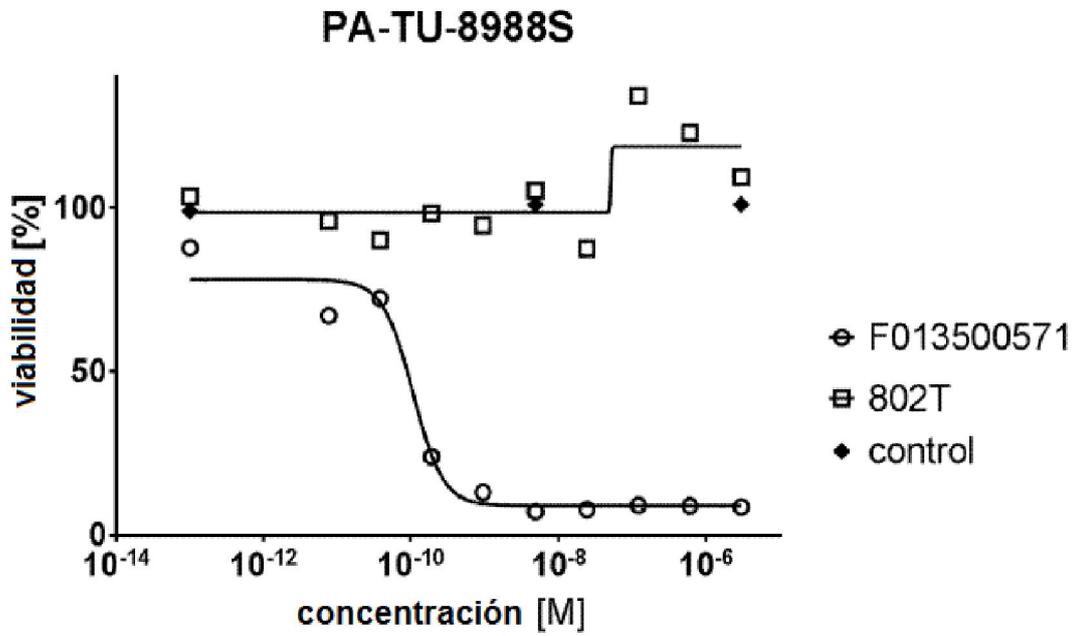


Figura 6D

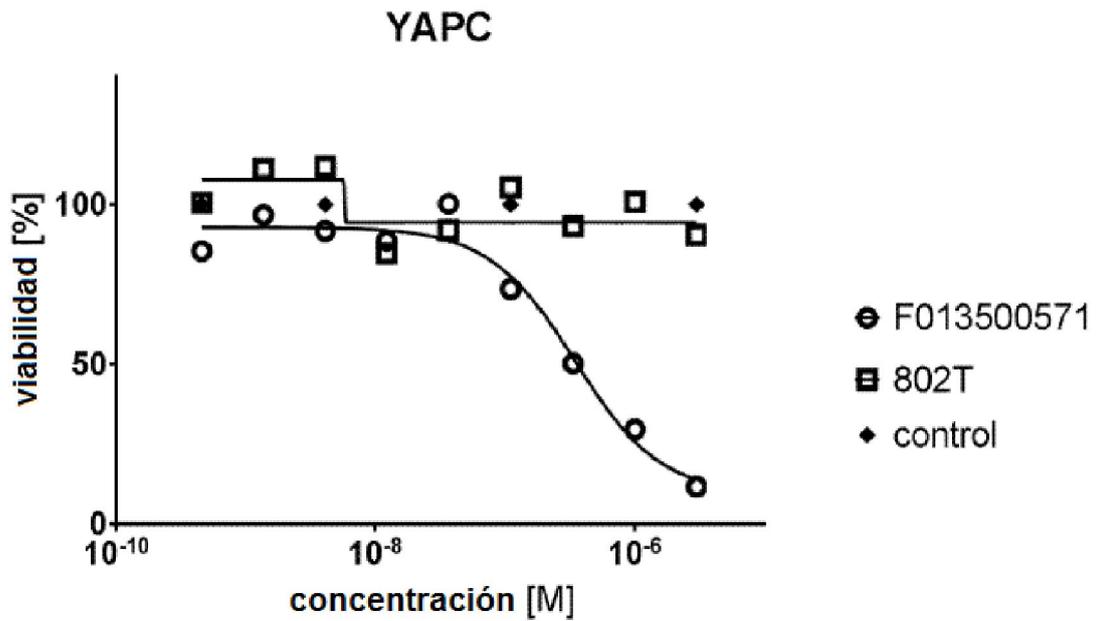


Figura 7A

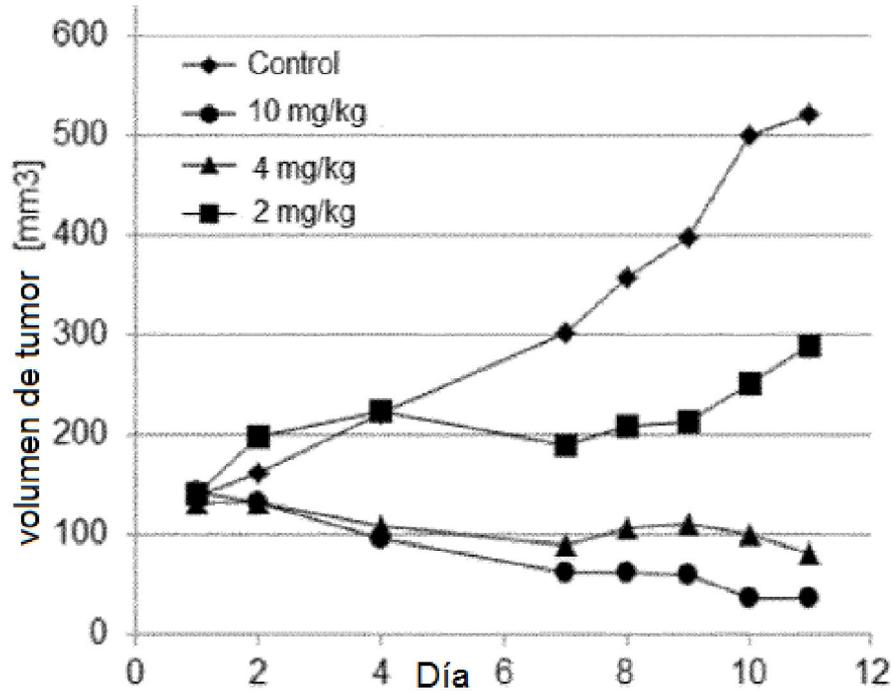


Figura 7B

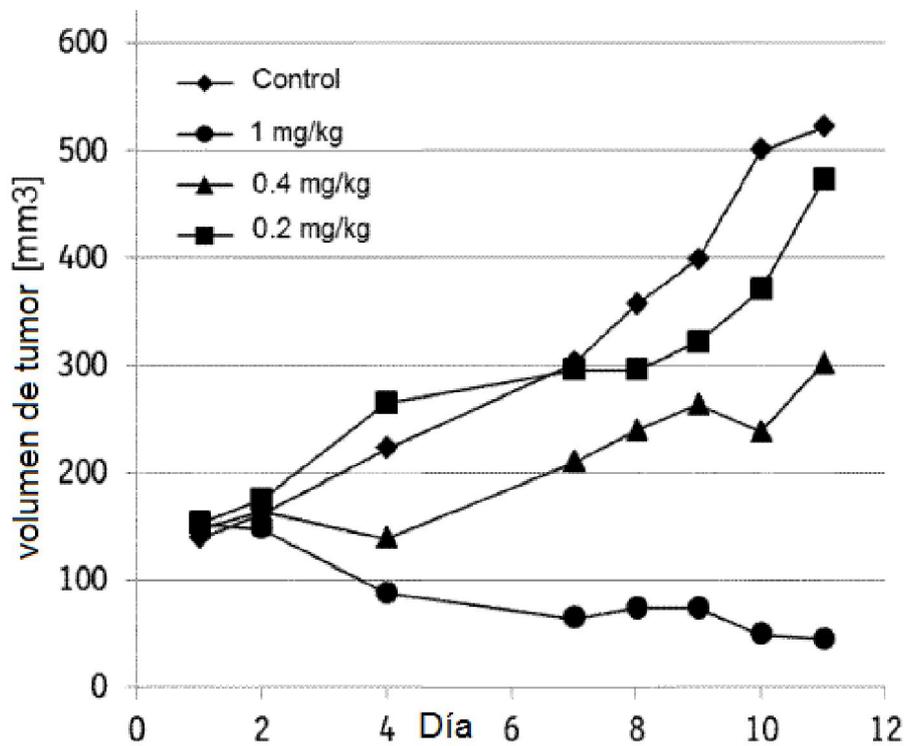


Figura 7C

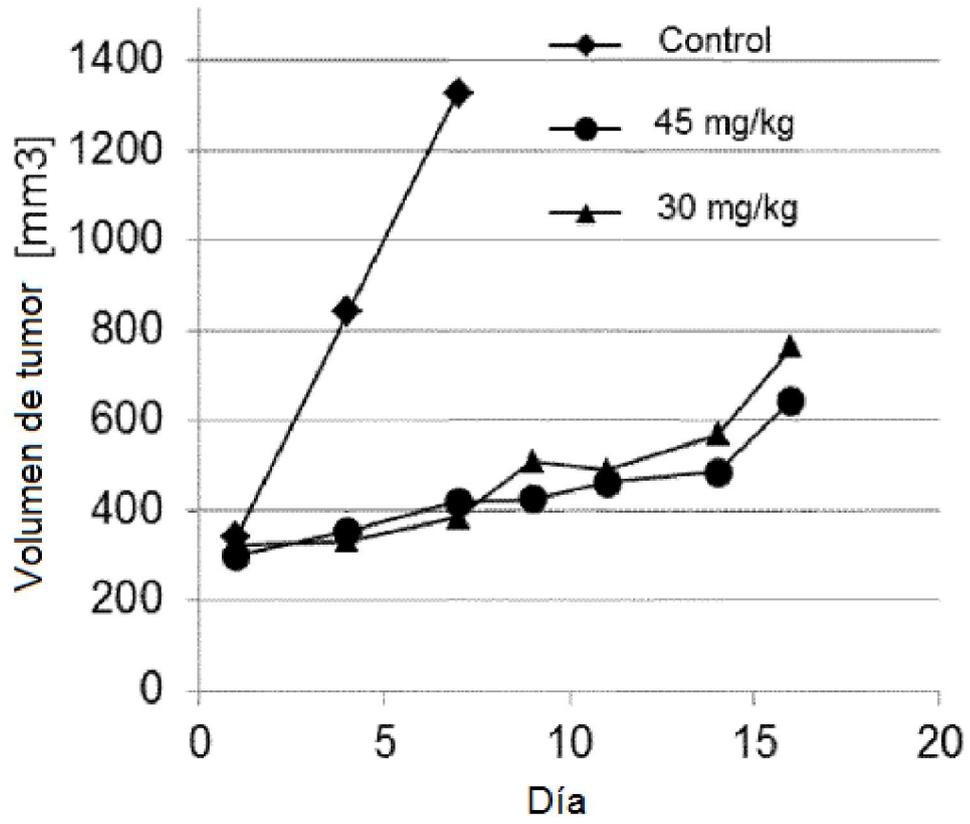


Figura 8A

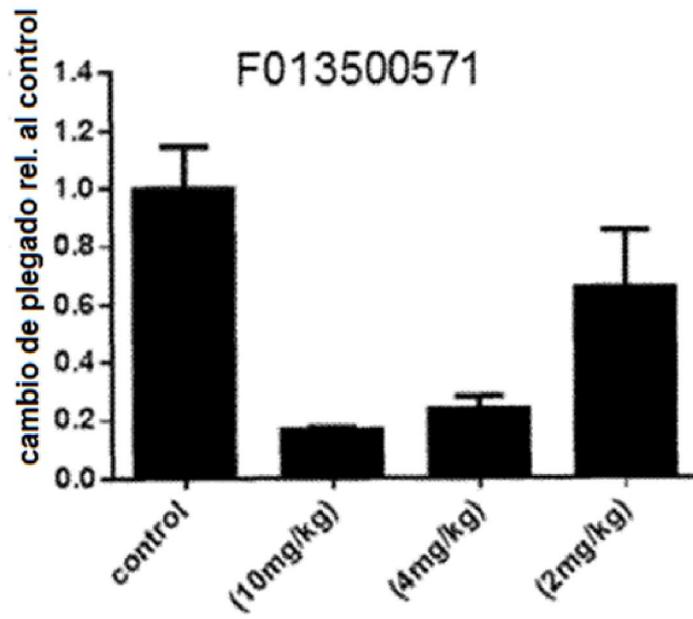


Figura 8B

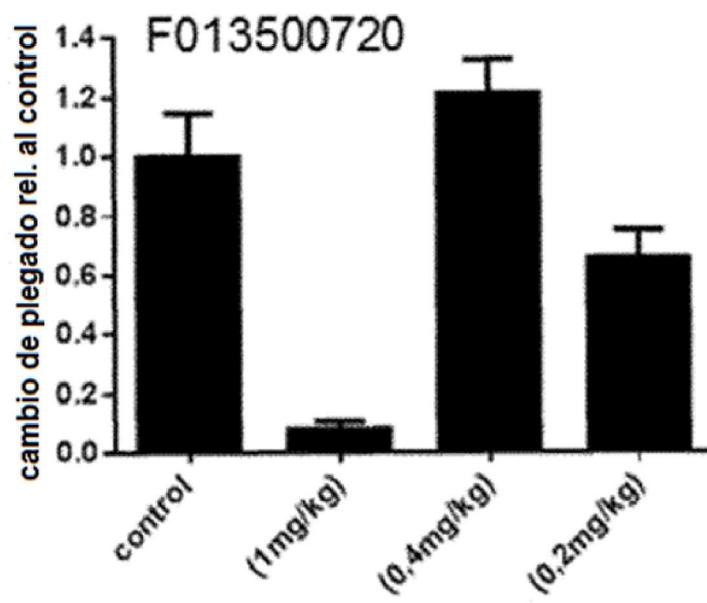


Figura 9A

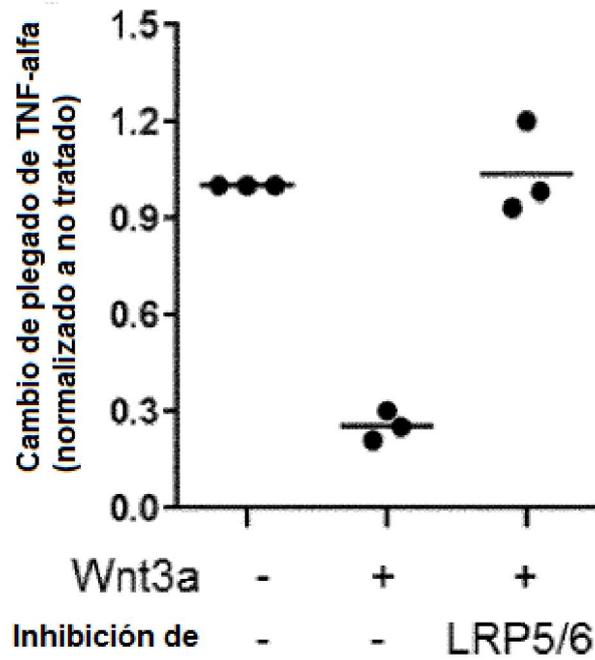


Figura 9B

