

COMPUESTO ESPECÍFICO DE RECEPTOR WNT Y MÉTODO RELACIONADO CON ESTE

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica la prioridad de: La solicitud provisional estadounidense N.º: 62/295.805, presentada el 31 de diciembre de 2021; la solicitud provisional estadounidense N.º: 63/298.570, presentada el 11 de enero de 2022; la solicitud provisional estadounidense N.º: 63/398.754, presentada el 17 de agosto de 2022. El contenido de dichas solicitudes se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[002] La presente invención se refiere a compuestos que se unen específicamente a uno o más receptores Wnt y métodos relacionados con estos. Específicamente, la presente invención proporciona moduladores de señal Wnt para su uso en el tratamiento de diversos trastornos oculares. En particular, se proporcionan tratamientos para enfermedades vasculares del ojo, que incluyen retinopatías.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[003] La retina vertebral es una capa delgada de tejido nervioso en la parte posterior del ojo. Es responsable de detectar los estímulos visuales y es la primera estación para el procesamiento de información visual. Para su función adecuada, la vasculatura de la retina es una fuente indispensable de nutrientes y oxígeno. Desde el punto de vista metabólico, la retina es altamente activa. Debido a los fotorreceptores que consumen la gran mayoría de oxígeno, un gramo de retina presenta la máxima tasa de consumo de oxígeno en comparación con cualquier otro órgano del cuerpo. Para suministrar nutrientes y oxígeno de manera eficaz, la vasculatura de la retina se ubica en la retina como una estructura estereotipada que consiste en tres plexos vasculares planos en un lado y los coriocapilares en el otro. La vascularización interna comienza inicialmente en la superficie vítrea de la retina, para dar lugar a un plexo vascular primario. Después de la expansión radial superficial del plexo vascular, la penetración vertical de los vasos en la retina forma dos plexos capilares intrarretinianos adicionales en la capa plexiforme interna (IPL) y la capa plexiforme externa (OPL). Debido a la relación funcional y estructural entre los vasos sanguíneos y la retina, el desarrollo de vasos anómalo y/o el

daño vascular están directamente vinculados a la función anómala o deficiente de la retina, que puede producir diversos tipos de retinopatías y degeneración de la retina.

[004] La señalización Wnt está implicada como una vía importante para el desarrollo vascular en la retina. Cada vez más evidencia genética de estudios en humanos y roedores respalda también la importancia de la señalización Wnt en la vasculatura de la retina (Wang *et al.*, 2018, *Prog Retin Eye Res.* 1 de diciembre de 2018. pii: S1350-9462(18)30046-6). Las mutaciones en genes humanos que codifican diversos receptores (Fzd4, Lrp5, Tspan12) y un ligando (norrin) que participan en la señalización Wnt producen una diversidad de vitreorretinopatías hereditarias. También se observó que las mutaciones genéticas específicas en los ortólogos murinos de estos genes (Fzd4, Lrp5, Tspan12, norrin) causan los fenotipos característicos de vasculatura anómala visto en la retinopatía humana. Este descubrimiento facilitó a los investigadores obtener una mejor comprensión de la progresión de la enfermedad de retinopatía, así como abrió la posibilidad de tratamiento de retinopatía a través de la modulación de señal Wnt.

[005] La retinopatía es cualquier daño en la retina de los ojos, que pueda causar trastornos visuales. La retinopatía abarca enfermedad vascular de la retina y daño en la retina causado por flujo sanguíneo anormal. La degeneración macular relacionada con la edad se considera una retinopatía, pero a veces se trata como una entidad separada. La retinopatía, que incluye retinopatía diabética, puede dividirse en etapa temprana y tardía. En la etapa temprana, también conocida como retinopatía no proliferativa, puede haber un leve deterioro en los vasos sanguíneos pequeños de la retina, y porciones de los vasos pueden expandirse y filtrar fluido en el tejido circundante de la retina. La retinopatía de etapa tardía implica una neovascularización significativa, así como microaneurismas y hemorragias en el área de la retina (ver, por ejemplo, Grading Diabetic Retinopathy from Stereoscopic Color Fundus Photographs—An Extension of the Modified Airlie House Classification. (1991) *Ophthalmology*, 98(5), 786–806). La retinopatía puede ser una manifestación ocular de enfermedades sistémicas o metabólicas, como se observa en la diabetes y la hipertensión. La diabetes es una causa común de retinopatía, y la retinopatía diabética es una de las causas principales de ceguera en personas en edad laboral y se designó como una enfermedad ocular prioritaria por la Organización Mundial de la Salud.

[006] La vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR) es una enfermedad ocular genética caracterizada por una formación deficiente de la vasculatura intraocular. Más de 50 % de pacientes con FEVR presentan mutaciones en uno de los genes que

codifican Fzd4, Lrp5, Tspan12 o norrin. Norrin, un ligando de señal Wnt, transmite una señal a las células endoteliales a través de un complejo de receptores compuesto de Fzd4/Lrp5/Tspan12 para el desarrollo normal de la vascularización de la retina en el ojo. Sin embargo, en pacientes con FEVR, las mutaciones en uno o más de los genes de norrin, Fzd4, Lrp5 y/o Tspan12 producen desarrollo vascular inmaduro en la retina. La formación resultante de la región avascular crea un área isquémica en la retina, que produce daño primario de la retina. Esta afección isquémica induce la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y angiopoyetina2 (Ang2), que produce la neovascularización y formación del penacho vascular. Los vasos sanguíneos anormales apenas generados pueden romperse fácilmente, lo que genera daño secundario de la retina debido a exudación y hemorragia. La progresión de la enfermedad de retinopatía diabética (DR) es similar a la de FEVR y otras malformaciones vasculares genéticas o enfermedades de deficiencias. La hiperglucemia induce el daño de los vasos de la retina, lo que produce vaso-obliteración, isquemia, neovascularización y hemorragia, y finalmente produce retinopatía.

[007] Si bien los datos genéticos señalan la importancia de la señalización Wnt en el establecimiento de la estructura vascular adecuada en el ojo, se desconoce si la activación de la señalización Wnt posterior al desarrollo produciría una mejora en la estructura vascular. Algunos informes sugieren que antagonizar una señalización Wnt en vez de antagonizarla sería beneficiosa en el tratamiento de retinopatía. Por lo tanto, una mayor comprensión de la retinopatía, progresión de la enfermedad y participación de la señal Wnt en esta sería beneficioso, ya que esto podría producir potencialmente nuevos tratamientos. Para un tratamiento efectivo de la retinopatía en particular, existe la necesidad de modular la señalización del agonista y antagonista Wnt durante etapas específicas de la enfermedad. La presente invención aborda estas necesidades y proporciona métodos para modular el agonismo y antagonismo de la señalización Wnt durante diferentes etapas de la retinopatía y progresión de la enfermedad.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

[008] En un aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de anticuerpos.

[009] Un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede comprender al menos: (A) una primera región de unión al antígeno que se une específicamente a un receptor de clase Frizzled 4 (Fzd4) y comprende un primer dominio variable de la cadena pesada (VH1) y un primer dominio

variable de la cadena liviana (VL1), (B) una segunda región de unión al antígeno que se une específicamente a la proteína relacionada con receptor de lipoproteínas de baja densidad 5 y/o 6 (LRP5 y/o LRP6) y comprende al menos un segundo dominio variable de la cadena pesada (VH2).

[0010] En algunas formas de realización, el VH1 comprende: (i) una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 1 (CDRH1) que tiene una secuencia de aminoácidos que: (i-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121, o la secuencia de aminoácidos de CDRH1 contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente definida de acuerdo con Kabat; (i-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente, S, A, Q o N; o (i-3) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121, 122, 123 o 124, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de CDRH1 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 181-188, opcionalmente definida de acuerdo con Kabat; (ii) una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 2 (CDRH2) tiene una secuencia de aminoácidos que: (ii-1) tiene al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141, o la secuencia de aminoácidos de CDRH2 contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente definida de acuerdo con Kabat; (ii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente, E, A, S o D; o (ii-3) comprende o consiste en: la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 141 o 142, 143 o 144; o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de CDRH2 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 181-188, opcionalmente definida por Kabat; y (iii) una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 3 (CDRH3) tiene una secuencia de aminoácidos que: (iii-1) tiene al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 161, o la secuencia de aminoácidos de CDRH3 contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente definida por Kabat; (iii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 160, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente D o cualquier aminoácido que no sea S, E, A, R, T, L, H, Y, Q o K; (iii-3)

comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 161 o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de CDRH3 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 181-188, opcionalmente definida por Kabat.

[0011] En algunas formas de realización, el VL1 comprende: (iv) una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana 1 (CDRL1) que tiene una secuencia de aminoácidos que: (iv-1) tiene al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 221, o la secuencia de aminoácidos de CDRL1 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente definida por Kabat; o (iv-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 221, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de CDRL1 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente definida de acuerdo con Kabat; (v) una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana 2 (CDRL2) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (v-1) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 241; o (v-2) la secuencia de aminoácidos de CDRL2 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y (vi) una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana 3 (CDRL3) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (vi-1) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 261; o (vi-2) la secuencia de aminoácidos de CDRL3 contenida en SEQ ID NO: 281, definida opcionalmente de acuerdo con Kabat.

[0012] En algunas formas de realización, el VH2 comprende: (i) una CDRH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (i-1) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 321; o (i-2) la secuencia de aminoácidos de CDRH1 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381, 386 y 393-396, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (ii) una CDRH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que: (ii-1) tiene al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 341, o la secuencia de aminoácidos de CDRH3 contenida en SEQ ID NO: 381, definida opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (ii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 341; o (ii-3) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de CDRH2 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381, 386 y 393-396, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y (iii) una CDRH3 que tiene una secuencia de aminoácidos que: (iii-1) tiene al menos 90 %, al menos 91 %, al menos

92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 361, o la secuencia de aminoácidos de CDRH3 contenida en SEQ ID NO: 381, opcionalmente definida de acuerdo con IMGT o MGT o Kabat; (iii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 360, en donde X_1 , X_2 y X_3 son individualmente cualquier aminoácido, siempre que (a) X_1 y X_2 sean D y E, respectivamente, (b) X_1 y X_3 sean D y D, respectivamente, y/o (c) X_2 y X_3 sean E y D, respectivamente, opcionalmente en donde X_1 , X_2 y X_3 sean D, E y D, respectivamente, D, D y D, respectivamente, D, E y E, respectivamente, D, E y S, respectivamente, D, E y A, respectivamente, o D, E y T, respectivamente; o (iii-3) comprenda o consista en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ IDS NO: 361, 362, 363, 364, 365 y 366, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de CDRH3 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381, 382, 388, 393, 394, 395 y 396, opcionalmente definida de acuerdo con IMGT o Kabat.

[0013] En algunos casos, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo puede comprender el VH1 descrito anteriormente, el VL1 descrito anteriormente y el VH2 descrito anteriormente.

[0014] En algunos casos, el VH2 es, comprende o está compuesto de un nanocuerpo.

[0015] En algunos casos, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo biespecífico o fragmento de anticuerpo.

[0016] En algunas formas de realización, el VH1 comprende una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3 que tienen las secuencias de aminoácidos de: (i) SEQ ID NO: 121, 141 y 161, respectivamente, (ii) SEQ ID NO: 122, 142 y 161, respectivamente, (iii) SEQ ID NO: 121, 142 y 161, respectivamente, (iv) SEQ ID NO: 123, 142 y 161, respectivamente, (v) SEQ ID NO: 124, 142 y 161, respectivamente, (vi) SEQ ID NO: 122, 141 y 161, respectivamente, (vii) SEQ ID NO: 122, 143 y 161, respectivamente, (viii) SEQ ID NO: 122, 144 y 161, respectivamente; (ix) SEQ ID NO: 121, 143 y 161, respectivamente, (x) SEQ ID NO: 121, 144 y 161, respectivamente, (xi) SEQ ID NO: 123, 141 y 161, respectivamente, (xii) SEQ ID NO: 123, 143 y 161, respectivamente, (xiii) SEQ ID NO: 123, 144 y 161, respectivamente, (xiv) SEQ ID NO: 124, 141 y 161, respectivamente, (xv) SEQ ID NO: 124, 143 y 161, respectivamente, o (xvi) SEQ ID NO: 124, 144 y 161, respectivamente.

[0017] En algunas formas de realización, el VL1 comprende una CDRL1, una CDRL2 y una CDRL3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 221, 241 y 261, respectivamente.

[0018] En algunas formas de realización, el VH2 comprende una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3 que tienen las secuencias de aminoácidos de: (i) SEQ ID NO: 321, 341 y 361, respectivamente, (ii) SEQ ID NO: 321, 341 y 362, respectivamente, (iii) SEQ ID NO: 321, 341 y 363, respectivamente, (iv) SEQ ID NO: 321, 341 y 364, respectivamente, (v) SEQ ID NO: 321, 341 y 365, respectivamente, o (vi) SEQ ID NO: 321, 341 y 366, respectivamente.

[0019] En algunos casos, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo puede comprender el VH1 descrito anteriormente, el VL1 descrito anteriormente y el VH2 descrito anteriormente.

[0020] En algunas formas de realización, el VH1 comprende: (i) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 del VH1 que comprenden la secuencia de aminoácidos contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 181-188, opcionalmente de acuerdo con Kabat; o (ii) una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de: (ii-1) SEQ ID NO: 121, 141 y 161, respectivamente, (ii-2) SEQ ID NO: 122, 142 y 161, respectivamente, (ii-3) SEQ ID NO: 121, 142 y 161, respectivamente, (ii-4) SEQ ID NO: 123, 142 y 161, respectivamente, (ii-5) SEQ ID NO: 124, 142 y 161, respectivamente, (ii-6) SEQ ID NO: 122, 141 y 161, respectivamente, (ii-7) SEQ ID NO: 122, 143 y 161, respectivamente, o (ii-8) SEQ ID NO: 122, 144 y 161, respectivamente.

[0021] En algunas formas de realización, el VL1 comprende: (i) la CDRL1, la CDRL2 y la CDRL3 del VL1 que comprenden la secuencia de aminoácidos contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat, (ii) una CDRL1, una CDRL2 y una CDRL3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 221, 241 y 261, respectivamente.

[0022] En algunas formas de realización, el VH2 comprende: (i) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 del VH2 que comprenden la secuencia de aminoácidos contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381, 386, 393, 394, 395 y 396, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; o (ii) una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de: (ii-1) SEQ ID NO: 321, 341 y 361, respectivamente, (ii-2) SEQ ID NO: 321, 341 y 362, respectivamente, (ii-3) SEQ ID NO: 321, 341 y 363, respectivamente, (ii-4) SEQ ID NO: 321, 341 y 364, respectivamente, (ii-5) SEQ ID NO: 321, 341 y 365, respectivamente, (ii-6) SEQ ID NO: 321, 341 y 366, respectivamente.

[0023] En algunos casos, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo puede comprender el VH1 descrito anteriormente, el VL1 descrito anteriormente y el VH2 descrito anteriormente.

[0024] En formas de realización particulares, (A) el VH1 comprende: (i) la CDRH1, la

CDRH2 y la CDRH3 del VH1 que comprenden la secuencia de aminoácidos contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente de acuerdo con Kabat; o (ii) una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 121, 141 y 161, respectivamente, y el VL1 comprende: (i) la CDRL1, la CDRL2 y la CDRL3 del VL1 que comprenden la secuencia de aminoácidos contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat, o (ii) una CDRL1, una CDRL2 y una CDRL3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 221, 241 y 261, respectivamente; y (B) el VH2 comprende: (i) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 del VH2 que comprenden la secuencia de aminoácidos contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381, 393, 394, 395 o 396, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; o (ii) una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 321, 341 y 361, respectivamente, SEQ ID NO: 321, 341 y 363, respectivamente, SEQ ID NO: 321, 341 y 364, respectivamente, SEQ ID NO: 321, 341 y 365, o SEQ ID NO: 321, 341 y 366, respectivamente.

[0025] En algunas formas de realización, el VH1 comprende: (i) una región estructural de la cadena pesada 1 (FRH1) que tiene una secuencia de aminoácidos que: (i-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111, o la secuencia de aminoácidos de FRH1 contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente de acuerdo con Kabat; (i-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente Q o K; (i-3) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111 o 112, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRH1 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 181-188, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (i-4) consiste en, o deriva de la FRH1 codificada por la línea germinal humana IGHV3-23*04; (ii) una región estructural de la cadena pesada 2 (FRH2), que tiene una secuencia de aminoácidos que: (ii-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131, o la secuencia de aminoácidos de FRH2 contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente de acuerdo con Kabat; (ii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 o 131, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRH2 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 181-188, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (ii-3)

consiste en, o deriva de la FRH2 codificada por la línea germinal humana IGHV3-23*04; (iii) una región estructural de la cadena pesada 3 (FRH3), que tiene una secuencia de aminoácidos que: (iii-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151, o la secuencia de aminoácidos de FRH3 contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente de acuerdo con Kabat; (iii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 150, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente N o D, X_2 es cualquier aminoácido, opcionalmente R o K, y X_3 es cualquier aminoácido, opcionalmente A o T; (iii-3) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151 o 152, comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRH3 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 181-188, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (iii-4) consiste en, o deriva de la FRH3 codificada por la línea germinal humana IGHV3-23*04; y/o (iv) una región estructural de la cadena pesada 4 (FRH4), que tiene una secuencia de aminoácidos que: (iv-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171, o la secuencia de aminoácidos de FRH4 contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente de acuerdo con Kabat; (iv-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 170 o 171, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRH4 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 181-188, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (iv-3) consiste en, o deriva de la FRH4 codificada por la línea germinal humana IGHJ4*01.

[0026] En algunas formas de realización, el VL1 comprende: (v) una región estructural de la cadena liviana 1 (FRL1) que tiene una secuencia de aminoácidos que: (v-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 211, o la secuencia de aminoácidos de FRL1 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; o (v-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 211, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRL1 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; (vi) una región estructural de la cadena liviana 2 (FRL2), que tiene una secuencia de aminoácidos que: (vi-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al

menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 231, o la secuencia de aminoácidos de FRL2 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; o (vi-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 231, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRL2 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; (vii) una estructura de cadena liviana 3 (FRL3), que tiene una secuencia de aminoácidos que: (vii-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 251, o la secuencia de aminoácidos de FRL3 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; o (vii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 251, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRL3 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (viii) una estructura de la cadena liviana 4 (FRL4), que tiene una secuencia de aminoácidos que: (viii-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 271, o la secuencia de aminoácidos de FRL4 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; o (viii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 271, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRL4 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat.

[0027] En algunas formas de realización, el VH2 comprende: (i) una FRH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que: (i-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 311, o la secuencia de aminoácidos de FRH1 contenida en SEQ ID NO: 381, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (i-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 310, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente E o D, X_2 es cualquier aminoácido, opcionalmente A o T, y X_3 es cualquier aminoácido, opcionalmente S, opcionalmente en donde la FRH1 no consiste en la secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 310 en donde X_1 , X_2 y X_3 son E, A y A, respectivamente; (i-3) comprende o

consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 311 o 312, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRH1 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381, 382-386 y 393-396, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (i-4) consiste en, o deriva de la FRH1 codificada por la línea germinal humana IGHV3- 66*01;

(ii) una FRH2, que tiene una secuencia de aminoácidos que: (ii-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 331, o la secuencia de aminoácidos de FRH2 contenida en SEQ ID NO: 381, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (ii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 330, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente Y, X_2 es cualquier aminoácido, opcionalmente Q, X_3 es cualquier aminoácido, opcionalmente R, X_4 es cualquier aminoácido, opcionalmente L, X_5 es cualquier aminoácido, opcionalmente I, y X_6 es cualquier aminoácido, opcionalmente A, opcionalmente en donde la FRH2 no consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 330 en donde X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 y X_6 son V, G, L, W, V y S, respectivamente; (ii-3) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 331, 332 o 333, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRH2 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381, 382-386 y 393-396, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii-4) consiste en, o deriva de la FRH2 codificada por la línea germinal humana IGHV3- 66*01; (iii) una FRH3, que tiene una secuencia de aminoácidos que: (iii-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 351, o la secuencia de aminoácidos de FRH3 contenida en SEQ ID NO: 381, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (iii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 350, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente D o G; X_2 es cualquier aminoácido, opcionalmente L; X_3 es cualquier aminoácido, opcionalmente M; X_4 es cualquier aminoácido, opcionalmente T; X_5 es cualquier aminoácido, opcionalmente D o E; X_6 es cualquier aminoácido, opcionalmente N o S; X_7 es cualquier aminoácido, opcionalmente S o A; X_8 es cualquier aminoácido, opcionalmente M; X_9 es cualquier aminoácido, opcionalmente R o K; y X_{10} es cualquier aminoácido, opcionalmente A o P, opcionalmente en donde la FRH3 no consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 350 en donde X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , X_9 y X_{10} son D, V, I, R, D, N, S, L, R y A, respectivamente; (iii-3) comprende

o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 351 o 352, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRH3 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381, 382-386 y 393-396, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (iii-4) consiste en, o deriva de la FRH3 codificada por la línea germinal humana IGHV3- 66*01; y/o (iv) una FRH4, que tiene una secuencia de aminoácidos que: (iv-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 371, o la secuencia de aminoácidos de FRH4 contenida en SEQ ID NO: 381, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (iv-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 370, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente R o W; y X_2 es cualquier aminoácido, opcionalmente Q o L; (iv-3) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 351 o 352, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRH4 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381, 382-386 y 393-396, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (iv-4) consiste en, o deriva de la FRH4 codificada por la línea germinal humana IGHV3- 66*01.

[0028] En algunos casos, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo puede comprender el VH1 descrito anteriormente, el VL1 descrito anteriormente y el VH2 descrito anteriormente.

[0029] En algunas formas de realización, el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que: (i) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 181-188; y/o (ii) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 180, en donde: X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente Q o K; X_2 es cualquier aminoácido, opcionalmente S, A, Q o N; X_3 es cualquier aminoácido, opcionalmente E, A, S o D; X_4 es cualquier aminoácido, opcionalmente N o D; X_5 es cualquier aminoácido, opcionalmente R o K; X_6 es cualquier aminoácido, opcionalmente E o T; y X_7 es cualquier aminoácido, opcionalmente D o cualquier aminoácido que no sea S, E, A, R, T, L, H, Y, Q o K.

[0030] En algunas formas de realización, el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281.

[0031] En algunas formas de realización, el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que: (i) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 381, 386 y 393-396; y/o (ii) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 380, en donde: X₁ es cualquier aminoácido, opcionalmente E o D; X₂ es cualquier aminoácido, tal como A o T; y X₃ es cualquier aminoácido, tal como S; X₄ es Q; X₅ es cualquier aminoácido, tal como Y; X₆ es cualquier aminoácido, tal como Q o G; X₇ es cualquier aminoácido, tal como R; X₈ es cualquier aminoácido, tal como L o W; X₉ es cualquier aminoácido, tal como I; y X₁₀ es cualquier aminoácido, tal como A; X₁₁ es M; X₁₂ es M; X₁₃ es cualquier aminoácido, tal como D o G; X₁₄ es cualquier aminoácido, tal como L; X₁₅ es cualquier aminoácido, tal como M; X₁₆ es cualquier aminoácido, tal como T; X₁₇ es cualquier aminoácido, tal como D o E; X₁₈ es cualquier aminoácido, tal como N o S; X₁₉ es cualquier aminoácido, tal como S o A; X₂₀ es cualquier aminoácido, tal como M; X₂₁ es cualquier aminoácido, tal como R o K; y X₂₂ es cualquier aminoácido, tal como A o P; X₂₃, X₂₄ y X₂₅ son individualmente cualquier aminoácido siempre que (a) X₂₃ y X₂₄ sean D y E, respectivamente, (b) X₂₃ y X₂₅ son D y D, respectivamente, y/o (c) X₂₄ y X₂₅ son E y D, respectivamente, opcionalmente en donde X₂₃, X₂₄ y X₂₅ son D, E y D, respectivamente, D, D y D, respectivamente, D, E y E, respectivamente, D, E y S, respectivamente, D, E y A, respectivamente, o D, E y T, respectivamente; X₂₆ es cualquier aminoácido, tal como R o W; y X₂₇ es cualquier aminoácido, tal como Q o L.

[0032] En algunos casos, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo puede comprender el VH1 descrito anteriormente, el VL1 descrito anteriormente y el VH2 descrito anteriormente.

[0033] En algunas formas de realización particulares, (A) el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 181-188; y/o el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281; y/o (B) el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 381, 386 y 393-396.

[0034] En formas de realización particulares, (A) el VH1 comprende: (i) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 del VH1 que comprenden la secuencia de aminoácidos contenida

en SEQ ID NO: 181, opcionalmente de acuerdo con Kabat; o (ii) una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 121, 141 y 161, respectivamente, y el VL1 comprende: (i) la CDRL1, la CDRL2 y la CDRL3 del VL1 que comprenden la secuencia de aminoácidos contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat, o (ii) una CDRL1, una CDRL2 y una CDRL3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 221, 241 y 261, respectivamente; y (B) el VH2 comprende: (i) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 del VH2 que comprenden la secuencia de aminoácidos contenida en SEQ ID NO: 381, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; o (ii) una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 321, 341 y 361, respectivamente.

[0035] En algunas formas de realización, el VH1 comprende: (i) una FRH1, que tiene una secuencia de aminoácidos que: (i-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111, o la secuencia de aminoácidos de FRH1 contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente de acuerdo con Kabat; (i-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRH1 contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (i-3) consiste en, o deriva de la FRH1 codificada por la línea germinal humana IGHV3-23*04; (ii) una FRH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que: (ii-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131, o la secuencia de aminoácidos de FRH2 contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente de acuerdo con Kabat; (ii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRH2 contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (ii-3) consiste en, o deriva de la FRH2 codificada por la línea germinal humana IGHV3-23*04; (iii) una FRH3 que tiene una secuencia de aminoácidos que: (iii-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151, o la secuencia de aminoácidos de FRH3 contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente de acuerdo con

Kabat; (iii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRH3 contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (iii-3) consiste en, o deriva de la FRH3 codificada por la línea germinal humana IGHV3-23*04; y/o (iv) una FRH4 que tiene una secuencia de aminoácidos que: (iv-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171, o la secuencia de aminoácidos de FRH4 contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente de acuerdo con Kabat; (iv-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRH4 contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (iv-3) consiste en, o deriva de la FRH4 codificada por la línea germinal humana IGHJ4*01.

[0036] En algunas formas de realización, el VL1 comprende: (v) una FRL1, que tiene una secuencia de aminoácidos que: (v-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 211, o la secuencia de aminoácidos de FRL1 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; o (v-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 211, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRL1 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; (vi) una FRL2 que tiene una secuencia de aminoácidos que: (vi-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 231, o la secuencia de aminoácidos de FRL2 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; o (vi-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 231, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRL2 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; (vii) una FRL3 que tiene una secuencia de aminoácidos que: (vii-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 251, o la secuencia de aminoácidos de FRL3 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con

Kabat; o (vii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 251, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRL3 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (viii) una FRL4 que tiene una secuencia de aminoácidos que: (viii-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 271, o la secuencia de aminoácidos de FRL4 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; o (viii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 271, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRL4 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat.

[0037] En algunas formas de realización, el VH2 comprende: (i) una FRH1, que tiene una secuencia de aminoácidos que: (i-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 311, o la secuencia de aminoácidos de FRH1 contenida en SEQ ID NO: 381, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (i-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 311, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRH1 contenida en SEQ ID NO: 381, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (i-3) consiste en, o deriva de la FRH1 codificada por la línea germinal humana IGHV3- 66*01; (ii) una FRH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que: (ii-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 331, o la secuencia de aminoácidos de FRH2 contenida en SEQ ID NO: 381, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (ii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 331, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRH2 contenida en SEQ ID NO: 381, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii-3) consiste en, o deriva de la FRH2 codificada por la línea germinal humana IGHV3- 66*01; (iii) una FRH3 que tiene una secuencia de aminoácidos que: (iii-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 351, o la secuencia de aminoácidos de FRH3 contenida en SEQ ID NO: 381,

opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (iii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 351, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRH3 contenida en SEQ ID NO: 381, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (iii-3) consiste en, o deriva de la FRH3 codificada por la línea germinal humana IGHV3- 66*01; y/o (iv) una FRH4 que tiene una secuencia de aminoácidos que: (iv-1) tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 371, o la secuencia de aminoácidos de FRH4 contenida en SEQ ID NO: 381, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (iv-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 351, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de FRH4 contenida en SEQ ID NO: 381, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (iv-3) consiste en, o deriva de la FRH4 codificada por la línea germinal humana IGHV3- 66*01.

[0038] En algunos casos, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo puede comprender el VH1 descrito anteriormente, el VL1 descrito anteriormente y el VH2 descrito anteriormente.

[0039] En algunas formas de realización particulares, (A) el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 181; y/o el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281; y/o (B) el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 381.

[0040] En algunas formas de realización particulares, (A) el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181; y/o el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281; y/o (B) el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la

secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 381.

[0041] En formas de realización particulares, (A) el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181; y el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281; y (B) el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 381.

[0042] En algunas formas de realización particulares, un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede comprender: (A) una primera región de unión al antígeno que se une específicamente a Fzd4 y comprende un VH1 y un VL1; y (B) una segunda región de unión al antígeno que se une específicamente a LRP5 y/o LRP6 y comprende al menos un VH2, en donde: (i) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 del VH1 son idénticas a las del dominio variable de la cadena pesada (VH) que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181;

(ii) la CDRL1, la CDRL2 y la CDRL3 del VL1 son idénticas a las del dominio variable de la cadena liviana (VL) que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281; y (iii) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 del VH2 son idénticas a las de VH que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 381. En formas de realización particulares: (i) el VH1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181; (ii) el VL1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281; y (iii) el VH2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 381.

[0043] En algunas formas de realización, (A) la primera región de unión al antígeno es, comprende, o está compuesta de un fragmento de unión al antígeno (Fab), un fragmento Fab', un F(ab')₂, un Fab monocatenario (scFab), un fragmento variable (Fv), un Fv monocatenario (scFv), un diacuerpo o un triacuerpo; y/o (B) la segunda región de unión al antígeno: (i) es, comprende, o está compuesto de un nanocuerpo o un fragmento Fd; o (ii) comprende además un segundo dominio variable de la cadena liviana (VL2) y es, comprende, o está compuesto de un Fab, un fragmento Fab', un F(ab')₂, un scFab, un Fv, un scFv, un diacuerpo o un triacuerpo.

[0044] En algunas formas de realización, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo comprende uno o más de los siguientes: (a) un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina 1 (CH1) o una variante de este; (b) una bisagra de inmunoglobulina o una variante de esta; (c) un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina 2 (CH2) o una variante de este; (d) un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina 3 (CH3) o una variante de este; y/o (e) un dominio

constante de la cadena liviana de inmunoglobulina (CL) o una variante de este.

[0045] En algunas formas de realización, el CH1 o una variante de este: (a-1) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano; y/o (a-2) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 o 22 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o es 100 % de identidad con respecto a esta;

[0046] En algunas formas de realización, la bisagra o una variante de esta: (b-1) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano; y/o (b-2) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o es 100 % de identidad con respecto a esta.

[0047] En algunas formas de realización, el CH2 o una variante de este: (c-1) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano; y/o (c-2) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 41-46 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o es 100 % de identidad con respecto a esta.

[0048] En algunas formas de realización, el CH3 o una variante de este: (d-1) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano; y/o (d-2) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 51-54, 61-64 y 66-69 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C) o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con respecto a esta.

[0049] En algunas formas de realización, el CL o una variante de este: (e-1) es de un dominio constante de la cadena liviana kappa (CL_k), opcionalmente CL_k humano y que

comprende opcionalmente una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con respecto a esta; y/o (e-2) es de un dominio constante de la cadena liviana lambda (CL λ), opcionalmente CL λ humano y que comprende opcionalmente una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con respecto a esta.

[0050] En algunas formas de realización particulares, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo comprende las secuencias CH2 y CH3 de SEQ ID NO: 42 y 51, respectivamente, SEQ ID NO: 43 y 51, respectivamente, SEQ ID NO: 45 y 61, respectivamente, SEQ ID NO: 45 y 66, respectivamente, SEQ ID NO: 46 y 61, respectivamente, o SEQ ID NO: 46 y 66, respectivamente.

[0051] En algunas formas de realización, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo comprende una región de fragmento cristizable (Fc).

[0052] En algunas formas de realización, la región Fc es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano, o una variante de este.

[0053] En algunas formas de realización, la región Fc de una IgG1 o una variante de esta puede comprender una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: N297A, N297Q, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, G236-eliminada, P238A, A327Q, A327G, P329A, P329G, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, P331S, F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L, S239D, I332E, S298A, E333A, K334A, L234Y, L235Q, G236W, S239M, H268D, D270E, K326D, A330M, K334E, G236A, K326W, S239D, E333S, S267E, H268F, S324T, E345R, E430G, S440Y, M428L, N434S, H310A, L328F, M252Y, I253A, S254T, T256E, H435Q, H435A y/o cualquier combinación de esta, de acuerdo con la numeración de EU;

[0054] En algunas formas de realización, la región Fc de una IgG2 o una variante de esta puede comprender una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: P238S, V234A, G237A, H268A, H268Q, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E y/o cualquier combinación de estas, de acuerdo con la numeración de EU.

[0055] En algunas formas de realización, la región Fc de una IgG3 o una variante de esta puede comprender la sustitución de aminoácidos E235Y, de acuerdo con la numeración de EU.

[0056] En algunas formas de realización, la región Fc de una IgG4 o una variante de esta puede comprender una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: E233P, F234V, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q y/o cualquier combinación de estas, de acuerdo con la numeración de EU.

[0057] En algunas formas de realización, la región Fc puede comprender una o más sustituciones de aminoácido que reducen una función efectora de Fc.

[0058] En algunas formas de realización particulares, la una o más sustituciones de aminoácido están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 234, 235, 236, 237, 265, 297 y 329, de acuerdo con la numeración de EU.

[0059] En algunas formas de realización particulares, la una o más sustituciones de aminoácido comprenden al menos las siguientes sustituciones de aminoácido de acuerdo con la numeración de EU: (ii-1) L234A, L235A y P329G; (ii-2) L234A y L235A; (ii-3) I253A, H310A y H435Q; (ii-4) I253A, H310A y H435A; (ii-5) D265A y P329A; (ii-6) M252Y, S254T y T256E; y/o (ii-7) M428L y N434S. Opcionalmente, dichas sustituciones pueden ser relativas a una región Fc de IgG1 humana y/o a cualquiera de SEQ ID NO: 71-74 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C).

[0060] En algunas formas de realización particulares, la región Fc puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácido de cualquiera de SEQ ID NO: 71-74, 81-84, 86-89, 91-94, 96-99, 471-474, 476-479, 481-484 y 486-489 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C) o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o es 100 % de identidad con respecto a esta.

[0061] En algunas formas de realización, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede comprender una estructura como se representa en cualquiera de las **Figuras 24-35**, opcionalmente cualquiera de las estructuras representadas en la **Figura 24**.

[0062] En algunas formas de realización, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede comprender: (a) un primer polipéptido que comprende dicho VH1; y (b) un segundo polipéptido que comprende dicho VH2 y dicho VL1, en donde el primer y segundo polipéptidos interactúan entre sí,

opcionalmente a través de uno o más enlaces disulfuro, lo que permite que dichos VH1 y VL1 formen dicha primera región de unión al antígeno.

[0063] En algunas formas de realización, (a) el primer polipéptido comprende lo siguiente en el orden del extremo N al extremo C: (a-1) dicho VH1 y (a-2) una CH1 o una variante de esta, opcionalmente en donde la CH1 o una variante de esta: (i) es de una IgG, opcionalmente de una IgG1 o una IgG4, además opcionalmente de IgG1 o IgG4 humana; y/o (ii) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 o 22 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o es 100 % de identidad con respecto a esta; (a-3) una bisagra de inmunoglobulina o una variante de esta, opcionalmente en donde la bisagra o una variante de esta: (i) es de una IgG, opcionalmente de una IgG1 o una IgG4, además opcionalmente de IgG1 o IgG4 humana; y/o (ii) que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con respecto a esta; (a-4) una CH2 o una variante de esta, opcionalmente en donde la CH2 o una variante de esta: (i) es de una IgG, opcionalmente de una IgG1 o una IgG4, además opcionalmente de IgG1 o IgG4 humana; y/o (ii) que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 41-46 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o es 100 % de identidad con respecto a esta; y (a-5) una CH3 o una variante de esta, opcionalmente en donde la CH3 o una variante de esta: (i) es de una IgG, opcionalmente de una IgG1 o una IgG4, además opcionalmente de IgG1 o IgG4 humana; y/o (ii) que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 51-54, 61-64 y 66-69 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C) o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o es 100 % de identidad con respecto a esta.

[0064] En algunas formas de realización, (b) el segundo polipéptido comprende lo siguiente en el orden del extremo N al extremo C: (B-1) dicho VH2; (b-2) opcionalmente

un ligador, que es opcionalmente un ligador peptídico, además opcionalmente un ligador flexible, opcionalmente en donde el ligador: (i) comprende uno o más aminoácidos, opcionalmente uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce aminoácidos; (ii) consiste en pequeños aminoácidos que consisten en G, S y/o A; (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, G, GG, GGG, GS, SG, GGS, GSG, SGG, GSS, SGS y SSG; y/o (iv) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en múltiples repeticiones de la secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, G, GG, GGG, GS, SG, GGS, GSG, SGG, GSS, SGS y SSG; (b-3) dicho VL1; y (b-4) una CL o una variante de esta, opcionalmente en donde la CL o una variante de esta: (i) es de un CL_h, opcionalmente CL_h humano y que comprende opcionalmente una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con respecto a esta; o (ii) es de un CL_λ, opcionalmente CL_λ humano y que comprende opcionalmente una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con respecto a esta.

[0065] En algunos casos, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo puede comprender el primer polipéptido descrito anteriormente y el segundo polipéptido descrito anteriormente.

[0066] En algunas formas de realización particulares, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo comprende: dos de dichos primeros polipéptidos que forman un dímero entre sí opcionalmente mediante uno o más enlaces disulfuro; y dos de dichos segundos polipéptidos, en donde uno de los segundos polipéptidos interactúa con uno de los primeros polipéptidos opcionalmente mediante un enlace disulfuro y el otro de los segundos polipéptidos interactúa con el otro de los primeros polipéptidos opcionalmente mediante un enlace disulfuro.

[0067] En algunas formas de realización, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo comprende una región Fc, en donde la región Fc: (I) es de una IgG,

opcionalmente de una IgG1 o una IgG4, además opcionalmente de ser humano, o una variante de esta; (II) comprende al menos las siguientes sustituciones de aminoácido de acuerdo con la numeración de EU: (ii-1) L234A, L235A y P329G; (ii-2) L234A y L235A; (ii-3) I253A, H310A y H435Q; (ii-4) I253A, H310A y H435A; (ii-5) D265A y P329A; (ii-6) M252Y, S254T y T256E; y/o (ii-7) M428L y N434S, opcionalmente con respecto a una región Fc de IgG1 humana y/o con cualquiera de SEQ ID NO: 71-74 (opcionalmente no incluyen K de extremo C); y/o (III) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 71-74, 81-84, 86-89, 91-94, 96-99, 471-474, 476-479, 481-484 y 486-489 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C) o comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con respecto a esta.

[0068] En algunas formas de realización particulares, (a) el primer polipéptido; (i) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a cualquiera de SEQ ID NO: 2, 7, 8, 9, 450, 451, 452 y 453 (opcionalmente sin K de extremo C); (ii) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 402, 407, 408, 409, 460, 461, 462 y 463 (opcionalmente sin K de extremo C), en donde: X₁ es cualquier aminoácido, opcionalmente Q o K; X₂ es cualquier aminoácido, opcionalmente S, A, Q o N; X₃ es cualquier aminoácido, opcionalmente E, A, S o D; X₄ es cualquier aminoácido, opcionalmente N o D; X₅ es cualquier aminoácido, opcionalmente R o K; X₆ es cualquier aminoácido, opcionalmente E o T; y X₇ es cualquier aminoácido, opcionalmente D o cualquier aminoácido que no sea S, E, A, R, T, L, H, Y, Q o K; y/o (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 2, 7, 8, 9, 450, 451, 452 y 453 (opcionalmente sin K de extremo C).

[0069] En algunas formas de realización particulares, (b) el segundo polipéptido (i) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a SEQ ID NO: 1; y/o (ii) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:

401, en donde: X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente E o D; X_2 es cualquier aminoácido, tal como A o T; y X_3 es cualquier aminoácido, tal como S; X_4 es Q; X_5 es cualquier aminoácido, tal como Y; X_6 es cualquier aminoácido, tal como Q o G; X_7 es cualquier aminoácido, tal como R; X_8 es cualquier aminoácido, tal como L o W; X_9 es cualquier aminoácido, tal como I; y X_{10} es cualquier aminoácido, tal como A; X_{11} es M; X_{12} es M; X_{13} es cualquier aminoácido, tal como D o G; X_{14} es cualquier aminoácido, tal como L; X_{15} es cualquier aminoácido, tal como M; X_{16} es cualquier aminoácido, tal como T; X_{17} es cualquier aminoácido, tal como D o E; X_{18} es cualquier aminoácido, tal como N o S; X_{19} es cualquier aminoácido, tal como S o A; X_{20} es cualquier aminoácido, tal como M; X_{21} es cualquier aminoácido, tal como R o K; y X_{22} es cualquier aminoácido, tal como A o P; X_{23} , X_{24} y X_{25} son individualmente cualquier aminoácido siempre que (a) X_{23} y X_{24} sean D y E, respectivamente, (b) X_{23} y X_{25} son D y D, respectivamente, y/o (c) X_{24} y X_{25} son E y D, respectivamente, opcionalmente en donde X_{23} , X_{24} y X_{25} son D, E y D, respectivamente, D, D y D, respectivamente, D, E y E, respectivamente, D, E y S, respectivamente, D, E y A, respectivamente, o D, E y T, respectivamente; X_{26} es cualquier aminoácido, tal como R o W; y X_{27} es cualquier aminoácido, tal como Q o L; y/o (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

[0070] En formas de realización particulares, (a) el primer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 7, 450 y 451 (opcionalmente sin el K de extremo C); y (b) el segundo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

[0071] En otras formas de realización particulares, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo comprende: dos de dichos primeros polipéptidos que forman un dímero entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro; y dos de dichos segundos polipéptidos, en donde uno de los segundos polipéptidos interactúa con uno de los primeros polipéptidos mediante un enlace disulfuro y el otro de los segundos polipéptidos interactúa con el otro de los primeros polipéptidos mediante un enlace disulfuro.

[0072] En otras formas de realización, un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede comprender: (A) dos o más regiones de unión a Fzd4, en donde al menos una de dichas regiones de unión a Fzd4 es, comprende o está compuesta en dicha primera región de unión al antígeno; y/o (B) dos o más regiones de unión a LRP5 y/o LRP6, en donde al menos una de dicha

regiones de unión a LRP5 y/o LRP6 es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno.

[0073] En algunos casos, la relación de la cantidad de dichas una o más regiones de unión a Fzd4 y la cantidad de dichas una o más regiones de unión a LRP5 y/o LRP6 incluidas en el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo pueden seleccionarse del grupo que consiste en 2:1, 1:2, 2:2, 3:1, 1:3, 3:2, 2:3, 3:3, 4:1, 1:4, 4:2, 2:4, 4:3, 3:4 y 4:4.

[0074] En algunos casos, la cantidad de dichas una o más regiones de unión a Fzd4 y la cantidad de dichas una o más regiones de unión a LRP5 y/o LRP6 incluidas en el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo pueden ser: 2 y 1, respectivamente; 1 y 2, respectivamente; 2 y 2, respectivamente; 3 y 1, respectivamente; 1 y 3, respectivamente; 3 y 2, respectivamente; 2 y 3, respectivamente; 3 y 3, respectivamente; 4 y 1, respectivamente; 1 y 4, respectivamente; 4 y 2, respectivamente; 2 y 4, respectivamente; 4 y 3, respectivamente; 3 y 4, respectivamente; o 4 y 4 respectivamente.

[0075] En algunos casos, un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede comprender: dos regiones de unión a Fzd4 idénticas, cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y una región de unión a LRP5 y/o LRP6 que es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno.

[0076] En algunos casos, un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede comprender: dos regiones de unión a Fzd4, que son diferentes entre sí y (i) al menos una de las cuales es, comprende o está incluida o (ii) cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y una región de unión a LRP5 y/o LRP6 que es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno.

[0077] En algunos casos, un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede comprender: una región de unión a Fzd4 que es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y dos regiones de unión a LRP5 y/o LRP6 idénticas, cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno.

[0078] En algunos casos, un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede comprender: una región de unión a Fzd4 que es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y dos regiones de unión a LRP5 y/o LRP6, que son diferentes entre sí y (i) al menos una de

las cuales es, comprende o está compuesta o (ii) cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno.

[0079] En algunos casos, un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede comprender: dos regiones de unión a Fzd4 idénticas, cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y dos regiones de unión a LRP5 y/o LRP6 idénticas, cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno.

[0080] En algunos casos, un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede comprender: dos regiones de unión a Fzd4, que son diferentes entre sí y (i) al menos una de estas es, comprende o está incluida o (ii) cada una de estas es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y dos regiones de unión a LRP5 y/o LRP6 idénticas, cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno.

[0081] En algunos casos, un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede comprender: dos regiones de unión a Fzd4 idénticas, cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y dos regiones de unión a LRP5 y/o LRP6, que son diferentes entre sí y (i) al menos una de las cuales es, comprende o está incluida o (ii) cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno.

[0082] En algunos casos, un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede comprender: dos regiones de unión a Fzd4, que son diferentes entre sí y (i) al menos una de las cuales es, comprende o está compuesta o (ii) cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y dos regiones de unión a LRP5 y/o LRP6, que son diferentes entre sí y (i) al menos una de las cuales es, comprende o está incluida o (ii) cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno.

[0083] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona ácidos nucleicos opcionalmente en donde un ácido nucleico o una combinación de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente divulgación puede codificar cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos y fragmentos de anticuerpo descritos en la presente.

[0084] En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos pueden ser ADN, cADN, ARN, mARN, mARN modificado o un híbrido de ADN/ARN.

[0085] En algunas formas de realización, una combinación de ácidos nucleicos ácido

nucleico o una combinación de ácidos nucleicos puede comprender: (a) un primer ácido nucleico que codifica cualquiera de los primeros polipéptidos descritos en la presente; y (b) un segundo ácido nucleico que codifica cualquiera de los segundos polipéptidos descritos en la presente.

[0086] En otro aspecto, la presente descripción proporciona vectores que comprenden estos ácidos nucleicos.

[0087] En algunas formas de realización, un vector o una combinación de vectores de acuerdo con la presente divulgación puede comprender cualquiera de los ácidos nucleicos o cualquiera de las combinaciones de ácidos nucleicos descritos en la presente.

[0088] En algunas formas de realización, los vectores comprenden uno o más promotores ligados operativamente a los ácidos nucleicos.

[0089] En algunas formas de realización, los vectores son vectores de expresión.

[0090] En algunas formas de realización, los vectores comprenden un plásmido, un vector viral (opcionalmente viral adenoasociado, adenoviral, lentiviral o retroviral), un vector a base de lípido, un vector de ARN de autorreplicación, una partícula tipo virus, un vector a base de polímero y/o una nanopartícula, opcionalmente una nanopartícula a base de lípidos.

[0091] En algunas formas de realización, una combinación de vectores puede comprender: (a) un primer vector que comprende un primer ácido nucleico que codifica el primer polipéptido; y (b) un segundo vector que comprende un segundo ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido.

[0092] En otro aspecto, la presente descripción proporciona células huésped y poblaciones de células que comprenden dichos ácidos nucleicos o vectores.

[0093] Una célula huésped de acuerdo con la presente divulgación puede comprender: (A) cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos y fragmentos de anticuerpo descritos en la presente; (B) cualquiera de los ácidos nucleicos o cualquiera de las combinaciones de ácidos nucleicos descritos en la presente; y/o (C) cualquiera de los vectores o cualquiera de las combinaciones de vectores descritas en la presente.

[0094] En algunas formas de realización, la célula huésped es de mamífero, opcionalmente de ser humano, primate no humano, mono, conejo, roedor, hámster, rata o ratón.

[0095] En algunas formas de realización, la célula huésped no es de mamífero, opcionalmente es de planta, bacteriana, fúngica, de levadura, protozoos o insectos.

[0096] En algunas formas de realización, la célula huésped es: (i) una célula de riñón

embrionario humano (HEK), opcionalmente una célula HEK293, o una variante de esta, además opcionalmente una célula Expi293F™; (ii) una célula CHO (ovario de hámster chino); (iii) una célula inmunitaria o (iv) un hibridoma.

[0097] En algunas formas de realización, una población de células de acuerdo con la presente divulgación puede comprender dos o más de cualquiera de las células huésped descritas en la presente.

[0098] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que contienen cualquiera de los anteriores. Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación puede comprender: (A) cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos y fragmentos de anticuerpo descritos en la presente; (B) cualquiera de los ácidos nucleicos o cualquiera de las combinaciones de ácidos nucleicos descritos en la presente; (C) cualquiera de los vectores o cualquiera de las combinaciones de vectores descritas en la presente; y/o (D) cualquiera de las células huésped o poblaciones de células descritas en la presente; y (II) un portador y/o excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0099] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos *in vivo*, tales como métodos para tratar a un sujeto, métodos para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o una afección en un sujeto, y métodos para inducir, promover, estimular, potenciar y/o favorecer una señalización Wnt en una célula diana de un sujeto.

[00100] En algunos aspectos, un método para tratar un sujeto que necesita dicho tratamiento de acuerdo con la presente divulgación puede comprender administrar al sujeto una cantidad eficaz de: (A) cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de anticuerpo descritos en la presente; (B) cualquiera de los ácidos nucleicos o combinaciones de ácidos nucleicos descritas en la presente; (C) cualquiera de los vectores o combinaciones de vectores descritas en la presente; (D) cualquiera de las células huésped o poblaciones de células descritas en la presente; y/o (E) cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente.

[00101] En algunas formas de realización, el sujeto comprende o tiene riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o una afección, por ejemplo, por transmisión hereditaria, o una enfermedad subyacente o comorbilidad.

[00102] En algunas formas de realización, la invención proporciona métodos para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o una afección en un sujeto que necesita dicho tratamiento que puede comprender administrar una cantidad eficaz de: (A) cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de anticuerpo descritos en la presente; (B) cualquiera de los ácidos nucleicos o combinaciones de ácidos nucleicos

descritas en la presente; (C) cualquiera de los vectores o las combinaciones de vectores descritas en la presente; (D) cualquiera de las células huésped o poblaciones de células descritas en la presente; y/o (E) cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente.

[00103] En algunos aspectos, un método para inducir, promover, estimular, potenciar y/o favorecer la señalización Wnt en un célula diana de un sujeto de acuerdo con la presente divulgación puede comprender administrar al sujeto una cantidad eficaz de: (A) cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de anticuerpo descritos en la presente; (B) cualquiera de los ácidos nucleicos o combinaciones de ácidos nucleicos descritas en la presente; (C) cualquiera de los vectores o combinaciones de vectores descritas en la presente; (D) cualquiera de las células huésped o poblaciones de células descritas en la presente; y/o (E) cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente.

[00104] En algunas formas de realización, la señalización Wnt es o comprende señalización Wnt/ β -catenina.

[00105] En algunas formas de realización, el método promueve, estimula, potencia y/o respalda el reclutamiento de múltiples complejos receptores, en donde cada uno comprende (i) Fzd4 y (ii) LRP5 o LRP6.

[00106] En cualquiera de los métodos *in vivo* divulgados en la presente, el sujeto es en general un mamífero, opcionalmente un ser humano, un primate no humano, un mono, un caballo, una vaca, oveja, una cabra, un cerdo, un perro, un gato, un conejo, un roedor, un hámster, una rata o un ratón.

[00107] En cualquiera de los métodos *in vivo* divulgados en la presente, el sujeto puede comprender un vertebrado no mamífero, opcionalmente un ave, pez, un anfibio o un reptil.

[00108] En cualquiera de los métodos *in vivo* divulgados en la presente, en algunos casos, el sujeto comprende o tiene riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o una afección, por ejemplo, por transmisión hereditaria u otra enfermedad subyacente o comorbilidad.

[00109] En cualquiera de los métodos *in vivo* divulgados en la presente, el método puede comprender además administrar al sujeto un agente adicional, opcionalmente un adyuvante o un agente terapéutico.

[00110] En cualquiera de los métodos *in vivo* divulgados en la presente, la enfermedad, trastorno o afección puede comprender una retinopatía, opcionalmente una enfermedad vascular retiniana (opcionalmente generada por la inhibición de

desarrollo vascular o angiogénesis excesiva) y/u opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en vitreorretinopatía exudativa, vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR), retinopatía de premadurez, enfermedad de Norrie, retinopatía diabética (DR), edema macular diabético, isquemia macular diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD) (que incluye AMD húmeda y AMD seca), retinopatía de premadurez (ROP), síndrome de osteoporosis con pseudoglioma (OPPG), oclusión de la vena retiniana y enfermedad de Coats.

[00111] En cualquiera de los métodos *in vivo* divulgados en la presente, la enfermedad, trastorno o afección puede comprender un trastorno vascular, opcionalmente malformación vascular o deficiencia vascular, además opcionalmente asociada con neovascularización inducida por isquemia.

[00112] En cualquiera de los métodos *in vivo* divulgados en la presente, la enfermedad, trastorno o afección puede comprender una enfermedad ósea o fractura, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en osteoporosis (que incluye síndrome de osteoporosis con pseudoglioma (OPPG) y osteoporosis primaria juvenil), variabilidad de densidad mineral ósea y osteolisis asociada con cáncer.

[00113] En cualquiera de los métodos *in vivo* divulgados en la presente, la enfermedad, trastorno o afección puede comprender una enfermedad de desgaste muscular, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en sarcopenia, caquexia y distrofias musculares.

[00114] En cualquiera de los métodos *in vivo* divulgados en la presente, la enfermedad, trastorno o afección puede comprender una enfermedad neuronal o neurodegenerativa, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en apoplejía, lesión cerebral traumática, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia de Friedreich, enfermedad de cuerpo de Lewy, atrofia muscular espinal, enfermedad de las neuronas motoras, esclerosis múltiple, enfermedad de Batten y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

[00115] En cualquiera de los métodos *in vivo* divulgados en la presente, la administración del agente activo puede ser a uno o más de los ojos del sujeto, opcionalmente por vía intravítrea o mediante gotas oculares.

[00116] En cualquiera de los métodos *in vivo* divulgados en la presente, la administración del agente activo puede efectuarse por vía local, opcionalmente al ojo, oído, nariz (opcionalmente por vía intranasal), piel (opcionalmente por vía transdérmica o epicutánea), mucosa, piel o vagina, o mediante inhalación.

[00117] En cualquiera de los métodos *in vivo* divulgados en la presente, la administración del agente activo puede efectuarse por vía parenteral, opcionalmente mediante inyección (opcionalmente por administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intratecal, intraarterial, intraarticular, intraósea o intraperitoneal) o mediante inhalación.

[00118] En cualquiera de los métodos *in vivo* divulgados en la presente, la administración del agente activo puede efectuarse por vía entérica, opcionalmente por vía oral, sublingual, bucal o rectal.

[00119] En cualquiera de los métodos *in vivo* divulgados en la presente, la administración del agente activo puede comprender administrar cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos y fragmentos de anticuerpo descritos en la presente a uno o más de los ojos del sujeto a alrededor de 0,1-100000 ng por ojo, alrededor de 1-100000 ng por ojo, alrededor de 1-10000 ng por ojo, alrededor de 10-10000 ng por ojo, alrededor de 1-100 ng por ojo, alrededor de 200-300 ng por ojo, alrededor de 300-400 ng por ojo, alrededor de 400-500 ng por ojo, alrededor de 500-600 ng por ojo, alrededor de 600-700 ng por ojo, alrededor de 700-800 ng por ojo, alrededor de 800-900 ng por ojo, alrededor de 900-1000 ng por ojo, alrededor de 1000-2000 ng por ojo, alrededor de 2000-3000 ng por ojo, alrededor de 3000-4000 ng por ojo, alrededor de 4000-5000 ng por ojo, alrededor de 5000-6000 ng por ojo, alrededor de 6000-7000 ng por ojo, alrededor de 7000-8000 ng por ojo, alrededor de 8000-9000 ng por ojo, alrededor de 9000-10000 ng por ojo, alrededor de 10000-20000 ng por ojo, alrededor de 20000-30000 ng por ojo, alrededor de 30000-40000 ng por ojo, alrededor de 40000-50000 ng por ojo, alrededor de 50000-60000 ng por ojo, alrededor de 60000-70000 ng por ojo, alrededor de 70000-80000 ng por ojo, alrededor de 80000-90000 ng por ojo o alrededor de 90000-100000 ng por ojo.

[00120] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para inducir, promover, estimular, potenciar y/o modular la señalización Wnt en una célula diana.

[00121] En algunos aspectos, un método para inducir, promover, estimular, potenciar y/o favorecer la señalización Wnt en un célula diana puede comprender poner en contacto la célula diana con una cantidad eficaz de: (A) cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de anticuerpo descritos en la presente; (B) cualquiera de los ácidos nucleicos o combinaciones de ácidos nucleicos descritas en la presente; (C) cualquiera de los vectores o combinaciones de vectores descritas en la presente; (D) cualquiera de las células huésped o poblaciones de células descritas en la presente; y/o

(E) cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente.

[00122] En algunas formas de realización, el contacto sucede *in vitro*.

[00123] En algunas formas de realización, el contacto sucede *ex vivo*.

[00124] En algunas formas de realización, el contacto sucede *in vivo*.

[00125] En algunas formas de realización, el método comprende (i) preparar una célula y/o tejido para implantación, (ii) diferenciación de una célula madre y/o (iii) preparación de un organoide.

[00126] En algunas formas de realización, el método produce o promueve la formación ósea, formación vascular y/o formación neuronal y/o diferenciación.

[00127] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para elaborar cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos y fragmentos de anticuerpo descritos en la presente.

[00128] En algunos aspectos, un método para elaborar cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos y fragmentos de anticuerpo descritos en la presente puede comprender: (a) cultivar células que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos o combinaciones de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo en condiciones que permiten la expresión de dicho anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo; y (b) recolectar y purificar el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo resultante del cultivo celular de (a).

[00129] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para elaborar cualquiera de las células huésped o cualquiera de las poblaciones de células descritas en la presente.

[00130] En algunos aspectos, un método para elaborar cualquiera de las células huésped o las poblaciones de dichas células descritas en la presente puede comprender introducir cualquiera de los ácidos nucleicos o las combinaciones de ácidos nucleicos descritas en la presente y/o los vectores o combinaciones de vectores descritas en la presente en una o más células.

[00131] En algunas formas de realización, la introducción sucede *in vitro*.

[00132] En algunas formas de realización, la introducción sucede *ex vivo*.

[00133] En algunas formas de realización, la introducción sucede *in vivo*.

[00134] Cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de anticuerpo descritos en la presente, cualquiera de los ácidos nucleicos o combinaciones de ácidos nucleicos descritas en la presente, cualquiera de los vectores o combinaciones de vectores descritas en la presente, cualquiera de las células huésped o poblaciones de células descritas en la presente y/o composiciones farmacéuticas

descritas en la presente puede ser para su uso en medicina.

[00135] Cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de anticuerpo descritos en la presente, cualquiera de los ácidos nucleicos o combinaciones de ácidos nucleicos descritas en la presente, cualquiera de los vectores o combinaciones de vectores descritas en la presente, cualquiera de las células huésped o poblaciones de células descritas en la presente y/o composiciones farmacéuticas descritas en la presente puede ser para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección, por ejemplo, una que involucre señalización Wnt.

[00136] En algunas formas de realización, la enfermedad, trastorno o afección comprende una o más de cualquiera de las enfermedades descritas en la presente.

[00137] La presente divulgación comprende además el uso de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de anticuerpo descritos en la presente, cualquiera de los ácidos nucleicos o combinaciones de ácidos nucleicos descritas en la presente, cualquiera de los vectores o combinaciones de vectores descritas en la presente, cualquiera de las células huésped o poblaciones de células descritas en la presente y/o composiciones farmacéuticas descritas en la presente para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección.

[00138] En algunas formas de realización, la enfermedad, trastorno o afección comprende una o más de cualquiera de las enfermedades descritas en la presente.

[00139] La presente invención se basa, en parte, en el uso de agonistas y antagonistas de señalización Wnt para regular la formación vascular anómala en indicaciones de retinopatía.

[00140] En algunas formas de realización, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto que tiene una retinopatía que comprende administrar al sujeto un agonista de señalización Wnt modificado por ingeniería genética. En otras formas de realización, el agonista Wnt modificado por ingeniería genética comprende composiciones de unión que se unen a uno o más receptores Fzd y composiciones de unión que se unen a uno o más receptores LRP.

[00141] En un aspecto, la divulgación proporciona un agonista de señalización Wnt modificado por ingeniería genética, en donde el agonista de señalización Wnt comprende: dos cadenas livianas, en donde cada una comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos 95 % de identidad con respecto a SEQ ID NO: 1, y dos cadenas pesadas, en donde cada una comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos 95 % de identidad con respecto a SEQ ID NO: 2, en donde las dos cadenas pesadas se unen entre sí, y cada una de las dos cadenas livianas se une a una

cadena pesada diferente del agonista de señalización Wnt. En algunas formas de realización, cada una de las dos cadenas livianas comprende un dominio VHH que comprende una o más de las siguientes modificaciones de residuos de aminoácidos: N29Q y/o hVHH3-H4 DDD (aminoácidos 101-103) sustituidos con DED. En algunas formas de realización, cada una de las dos cadenas pesadas comprende uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos: una CDR1 S31, una CDR2 E62 y/o CDR3 D108.

[00142] En otro aspecto, la divulgación proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una o más cadenas livianas y/o una o más cadenas pesadas del agonista de señalización Wnt modificado por ingeniería genética divulgado en la presente, por ejemplo, hp4SD1-03, o un fragmento o una variante de este. En algunas formas de realización, el ácido nucleico es un mARN, por ejemplo, un mARN modificado.

[00143] En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona un vector que comprende un ácido nucleico divulgado en la presente, por ejemplo, un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una o más cadenas livianas y/o una o más cadenas pesadas de hp4SD1-03, o un fragmento o variante de este. En formas de realización particulares, el vector es un vector de expresión que comprende un promotor que está ligado operativamente al ácido nucleico, tal como, por ejemplo, un vector viral.

[00144] En una forma de realización relacionada, la divulgación proporciona una célula huésped que comprende un vector o ácido nucleico divulgado en la presente, por ejemplo, un vector o ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una o más cadenas livianas y/o una o más cadenas pesadas de hp4SD1-03, o un fragmento o variante de este. En algunas formas de realización, la célula huésped es una célula recombinante. En algunas formas de realización, la célula huésped es una célula de mamífero o una célula de insecto.

[00145] En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un diluyente, excipiente o portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, y:

- a) un agonista de señalización Wnt modificado por ingeniería genética divulgado en la presente;
- b) un ácido nucleico divulgado en la presente; y/o
- c) un vector divulgado en la presente.

[00146] En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende hp4SD1-03, o un fragmento o variante de este, o el ácido nucleico codifica una o más cadenas livianas y/o una o más cadenas pesadas de hp4SD1-03, o un

fragmento o variante de este, o el vector comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una o más cadenas livianas y/o una o más cadenas pesadas de hp4SD1-03, o un fragmento o variante de este.

[00147] En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar una retinopatía en un sujeto, que comprende administrar al sujeto:

- a) un agonista de señalización Wnt modificado por ingeniería genética divulgado en la presente;
- b) un ácido nucleico divulgado en la presente;
- c) un vector divulgado en la presente y/o
- d) una composición farmacéutica divulgada en la presente.

[00148] En algunas formas de realización, el agonista de señalización Wnt modificado por ingeniería genética es hp4SD1-03, o un fragmento o una variante de este, o la composición farmacéutica comprende hp4SD1-03, o un fragmento o variante de este, o el ácido nucleico codifica una o más cadenas livianas y/o una o más cadenas pesadas de hp4SD1-03, o un fragmento o variante de este, o el vector comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una o más cadenas livianas y/o una o más cadenas pesadas de hp4SD1-03, o un fragmento o variante de este.

[00149] En algunas formas de realización de los métodos de tratamiento divulgados, la retinopatía tratada es una enfermedad vascular de la retina. En algunas formas de realización, la enfermedad vascular de la retina es causada por la inhibición del desarrollo vascular. En algunas formas de realización, la retinopatía es causada por angiogénesis excesiva. En algunas formas de realización, la retinopatía es una retinopatía de etapa temprana o una retinopatía de etapa tardía. En algunas formas de realización, la enfermedad vascular de la retina se selecciona del grupo que consiste en: vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR), vitreorretinopatía exudativa, enfermedad de Norrie, retinopatía diabética (DR), edema macular diabético, isquemia macular diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD) (que incluye AMD húmeda y AMD seca), retinopatía de premadurez (ROP), síndrome de osteoporosis con pseudoglioma (OPPG), oclusión de la vena retiniana y enfermedad de Coats. El agonista de señalización Wnt modificado por ingeniería genética se puede administrar mediante diversas vías de administración, que incluyen, entre otras, por vía sistemática o local, tal como por vía intravenosa, subcutánea, oral, tópica, nasal, intravítrea, supracoroidea o subretinal. En algunas formas de realización, el agonista de señalización Wnt modificado por ingeniería genética se administra a uno o más de los ojos del sujeto, por ejemplo, por vía intravítrea.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[00150] La **Figura 1** proporciona las secuencias de aminoácidos de un agonista de señalización Wnt biespecífico tetravalente, 4SD1-03_LALAPG, que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas de un anticuerpo anti-Fzd4, 4SD1, en donde un dominio anti-LRP5/6 VHH se fusiona con el extremo N de cada cadena liviana de anticuerpo anti-Fzd4 por medio de la secuencia ligadora, GGSGS (SEQ ID NO: 102), y su estructura de anticuerpo tipo IgG asociada, en donde las dos cadenas pesadas se unen mediante enlaces disulfuro, y cada cadena liviana se une a una cadena pesada por medio de un enlace disulfuro. El dominio VHH se muestra en cursiva; la secuencia ligadora es GGSGS (SEQ ID NO: 102); las CDR están subrayadas y en negrita; las mutaciones LALAPG en el dominio Fc de la cadena pesada se muestran en gris; y el dominio Fc se resalta en gris; cada uno de los dominios VL y VH anti-Fzd4 comprende tres CDR y también se resaltan (las CDR anti-Fzd4 se definen con base en la numeración Kabat).

[00151] La **Figura 2A** muestra diversas modificaciones de aminoácidos realizadas al dominio VHH3 de 4SD1-03_LALAPG para humanizar las secuencias de camélido VHH. VHH representa la secuencia de camélido de origen; 3-66*01 representa la secuencia humana más cercana identificada en bases de datos de genoma humano; y hVHH3-H1 a hVHH3-H4 incluyen las sustituciones de aminoácido indicadas. Los números de residuo de aminoácidos basados en el número de residuo real dentro de VH ("seq") y basados en la numeración Martin "AbM" se muestran sobre las secuencias.

[00152] La **Figura 2B** muestra los perfiles SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) de diversas formas humanizadas de VHH3 mostradas en la **Figura 2A** luego de purificación de proteína A. El eje x muestra el volumen de elución en ml; el eje y muestra miliunidades de absorbancia (mAU). hVHH3-H4 mostró la mejor expresión y mayor pureza, según se indica mediante el único pico y valor de mAU alto. Las flechas indican volumen de retención esperado.

[00153] La **Figura 3** muestra los perfiles SEC de VHH asociados con la modificación de un potencial motivo de desamidación, NS, en hVHH3-H4. El eje x muestra el volumen de elución en ml; el eje y muestra miliunidades de absorbancia (mAU). Los gráficos muestran que N29 en hVHH3-H4 puede reemplazarse, por ejemplo, mediante Q sin afectar la pureza.

[00154] La **Figura 4** proporciona perfiles SEC de VHH asociados con la modificación de un potencial motivo de isomerización, DDD, en hVHH3-H4. El eje x

muestra el volumen de elución en ml; el eje y muestra miliunidades de absorbancia (mAU). Los cromatogramas muestran los efectos sobre la pureza después de la elución con proteína A de las diversas sustituciones de aminoácido realizadas al motivo DDD.

[00155] La **Figura 5** muestra la modificación de potenciales residuos sensibles a la oxidación, M51 y M57, en VHH3. La tabla a la izquierda muestra diversas sustituciones de aminoácido realizadas a los residuos M51 o M57 y muestra que la sustitución de M51 o M57 con cualquier aminoácido evaluado no fue tolerada y produjo un rendimiento muy escaso. Los cromatogramas a la derecha muestran ejemplos de la pureza resultante de diferentes mutaciones de M51 y M57. El eje x muestra el volumen de elución en ml; el eje y muestra miliunidades de absorbancia (mAU).

[00156] La **Figura 6** proporciona un diagrama de modificaciones al dominio VHH3 de 4SD1-03_LALAPG (VHH3 se humanizó y se incorporaron sustituciones N29Q y D102E) y modificaciones al dominio VH de 4SD1-03_LALAPG (se incorporaron sustituciones N31S y D62E y la secuencia de región estructural se alteró para simular adicionalmente una secuencia codificada por línea germinal humana) realizadas para derivar hp4SD1-03.

[00157] La **Figura 7** muestra diversas sustituciones de aminoácido realizadas a la cadena pesada de 4SD1-03_LALAPG para modificar aminoácidos potencialmente susceptibles; N31 en CDR1 se modificó para Q, S o A; D62 en CDR2 se modificó para E, S o A; y D108 en CDR3 se modificó para E, S o A. Los gráficos muestran que la mutación de CDR1 N31 y CDR2 D62 tiene una actividad de señalización Wnt mayor o similar en comparación con la molécula de origen. La mutación N31S produjo un aumento de cinco veces en la potencia. No obstante, no fue posible reemplazar CDR3 D108 sin perder la potencia. Se evaluaron mutaciones adicionales pero produjeron una actividad de señalización Wnt reducida, como se muestra en el gráfico a la derecha. La combinación de N31S, D62E y D108 se evaluó mediante espectrometría de masas, y no mostró isomerización luego de condiciones de estrés acelerado.

[00158] La **Figura 8** muestra una alineación entre las secuencias de la región VH de 4SD1 y su línea germinal humana más cercana IGHV3-23*04 a. Con base en esta alineación, se construyó un mutante estructural de 4SD1-03_LALAPG que contenía cambios en las secuencias FR para estimular secuencias codificadas por línea germinal humana (como se muestra en la tabla en la parte superior derecha). hp4SD1-03 con mutación estructural conservó buena expresión y perfil de purificación como se muestra en el perfil SEC (cromatografía de exclusión por tamaño). hp4SD1-03 con mutación estructural mostró una potencia cinco veces mayor en el ensayo celular STF que la

molécula de origen 4SD1-03_LALAPG. Además, hp4SD1-03 no mostró tendencia a la isomerización cuando se analizó mediante espectrometría de masas después de estrés térmico a 42 °C durante 2 semanas a pH 5,5.

[00159] La **Figura 9** proporciona las secuencias de aminoácidos del agonista de señalización Wnt biespecífico tetravalente resultante, hp4SD1-03, que comprende las modificaciones indicadas anteriormente para las secuencias de origen 4SD1-03_LALAPG. Este constructo tiene la misma estructura general que el constructo de origen. El dominio VHH se muestra en cursiva; la secuencia ligadora es GGGGS (SEQ ID NO: 101); las CDR están subrayadas y en negrita; las mutaciones LALAPG en el dominio Fc de la cadena pesada se muestran en gris; y el dominio Fc se resalta en gris; cada uno de los dominios VL y VH anti-Fzd4 comprende tres CDR y también se resaltan (las CDR anti-Fzd4 se definen con base en la numeración Kabat).

[00160] La **Figura 10A** es un gráfico que muestra la actividad de señalización Wnt del constructo modificado, hp4SD1-03, en comparación con el constructo de origen, 4SD1-03_LALAPG, en donde ambos constructos comprenden mutante LALAPG Fc. La EC₅₀ mostrada en la tabla indica que hp4SD1-03 tiene una actividad de señalización Wnt aproximadamente diez veces mayor.

[00161] La **Figura 10B** muestra un ejemplo de resultado de evaluación de actividad de señalización Wnt/ β -catenina con base en la expresión de *Axin2* como se describe en el ejemplo 5, que compara hp4SD1-03 y 4SD1-03_LALAPG, en donde ambos comprenden el mutante LALAPG Fc con Norrin como control. Como se muestra en la tabla, hp4SD1-03 mostró una reducción de aproximadamente 11,5 veces en EC₅₀.

[00162] La **Figura 11** muestra el efecto del tratamiento con el constructo modificado, hp4SD1-03, en comparación con el constructo de origen, 4SD1-03_LALAPG en un modelo de ratón de lesión retiniana. La línea de tiempo en la parte superior detalla la inducción de daño retiniano mediante 75 % de oxígeno, y mediante inyección intravítrea de cualquier constructo, y análisis del tejido retiniano mediante tinción para áreas avasculares (AV) y de penachos. Las imágenes de preparados histológicos retinianos teñidos con isolectina B4 (IB4) a continuación muestran retina no lesionada, retina lesionada (control negativo) y retina de animales tratados con Eylea® (control positivo), el constructo modificado, hp4SD1-03, o el constructo de origen, 4SD1-03_LALAPG, con dosis como se muestra en la tabla a la derecha. Los gráficos a la derecha muestran el porcentaje de tejido avascular o área de penachos con respecto al área total que resulta de cada tratamiento, y demuestran un mejor resultado con hp4SD1-03 en comparación con 4SD1-03_LALAPG. Para cada gráfico, de izquierda a

derecha, las barras corresponden a: sin tratamiento; Eylea®, 4SD1-03_LALAPG y hp4SD1-03. * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$, *** indica $p < 0,001$, **** indica $p < 0,0001$ en la prueba ANOVA.

[00163] La **Figura 12** muestra el efecto del tratamiento con las cantidades indicadas del constructo modificado, hp4SD1-03, en un modelo de ratón con filtración vascular retiniana inducida por VEGF de lesión retiniana. Las dosis se muestran en la tabla, y los puntajes de filtración retiniana inducida por VEGF se muestran en los gráficos adjuntos. El tratamiento con 10 ug/ojo o 2 ug/ojo de hp4SD1-03 produjo una reducción de alrededor de 75 % en la filtración, y el tratamiento con 0,4 ug/ojo o 0,08 ug/ojo de hp4SD1-03 también redujo significativamente la filtración vascular. * indica $p < 0,05$ y ** indica $p < 0,01$ en la prueba ANOVA. La comparación de la filtración vascular retiniana entre el tratamiento del vehículo y hp4SD1-03 en el día 3.

[00164] La **Figura 13** proporciona imágenes de angiografía de fluoresceína de tejido retiniano de ratón tratado como se indica. Se observó eficacia en todos los animales evaluados.

[00165] La **Figura 14** muestra la actividad de diversos mutantes con sustituciones de aminoácido dentro de la secuencia hVHH3-H4 para reemplazar D en la posición 103 o DED en las posiciones 101-103. Los gráficos de la parte superior y la tabla inferior muestran la actividad de STF de los diversos mutantes en comparación con la actividad de hp4SD1-03, que contiene DED en las posiciones 101-103. Los cromatogramas muestran la pureza después de la purificación con proteína A asociada con la modificación de DED en hVHH3-H4. El eje x muestra el volumen de elución en ml; el eje y muestra miliunidades de absorbancia (mAU). Estos datos muestran que D101 y D103 de hp4SD1-03 pueden ser reemplazados sin reducir la actividad de la molécula.

[00166] Las **Figuras 15A-15C** muestran el efecto del tratamiento con altas concentraciones de hp4SD1-03 en el modelo de ratón OIR. La **Figura 15A** ilustra el diseño del estudio OIR; la **Figura 15B** muestra tinción de las áreas avasculares retinianas (AV) y de penachos neovasculares (NV). Las imágenes de preparados histológicos retinianos teñidos con isoelectina B4 (IB4) muestran sin tratamiento y con tratamiento con 40 nM, 400 nM y 4000 nM de hp4SD1-03. La **Figura 15C** proporciona gráficos cuantitativos de los resultados de las imágenes en la **Figura 15B**. * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$, **** indica $p < 0,0001$ en la prueba ANOVA.

[00167] Las **Figuras 16A-16B** muestran la expresión aumentada de genes y proteínas seleccionados luego del tratamiento con 4SD1-03_LALAPG de origen. La **Figura 16A** es la expresión de mRNA de *LEF1* y *MFSD2A*, y la **Figura 16B** es la

expresión de proteína de ZO-1 y CLDN5, dos proteínas de unión hermética.

[00168] La **Figura 16C** proporciona un ejemplo de análisis de transferencia Western que deriva del Ejemplo 7. El tratamiento de células endoteliales microvasculares retinianas humanas (HRMEC) con hp4SD1-03 aumentó la fosforilación de DVL3 (mayor relación de DVL3 fosforilada con respecto a DVL3 no fosforilada), una molécula citoplasmática clave en la señalización Wnt.

[00169] Las **Figuras 17A-17C** proporcionan ejemplos de resultados de la evaluación de cinética de unión como se describe en el Ejemplo 8. La unión monovalente de Fzd4 CRD humano a 4SD1-03_LALAPG o hp4SD1-03 se midió mediante BLI. La **Figura 17A** proporciona un ejemplo de sensograma de unión de Fzd4 CRD humano a 4SD1-03_LALAPG. Las líneas rojas representan los ajustes globales generados al ajustar los sensogramas de unión en tiempo real (líneas azules) usando un modelo de unión de Langmuir 1:1. La **Figura 17B** proporciona un ejemplo de sensograma de unión de Fzd4 CRD humano a hp4SD1-03. Las líneas rojas representan los ajustes globales generados al ajustar los sensogramas de unión en tiempo real (líneas verdes) usando un modelo de unión de Langmuir 1:1. La **Figura 17C** proporciona una tabla que muestra los valores de K_D , k_{on} y k_{dis} (también denominada k_{off}) observados en la unión de Fzd4 CRD humano a 4SD1-03_LALAPG o hp4SD1-03 en las concentraciones indicadas de Fzd4 CRD humano.

[00170] Las **Figuras 18A-18C** proporcionan ejemplos de resultados de la evaluación de cinética de unión como se describe en el Ejemplo 8. La unión de 4SD1-03_LALAPG o hp4SD1-03 a Fzd4 CRD humano se midió mediante SPR. La **Figura 18A** proporciona un ejemplo de sensograma de unión de Fzd4 CRD humano a 4SD1-03_LALAPG. La **Figura 18B** proporciona un ejemplo de sensograma de unión de Fzd4 CRD humano a hp4SD1-03. La **Figura 18C** proporciona una tabla que muestra los valores de K_D , k_a (también denominada k_{on}) y k_d (también denominada k_{off}) observados en la unión de 4SD1-03_LALAPG o hp4SD1-03 a Fzd4 CRD humano. Se indica el promedio de los valores observados en cuatro concentraciones de captura diferentes.

[00171] Las **Figuras 19A-19B** proporcionan las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y liviana de hp4SD1-03 AAQ y hp4SD1-03 AAA. Se resaltan las sustituciones de aminoácido adicionales con respecto a hp4SD1-03.

[00172] La **Figura 20** proporciona ejemplos de cromatogramas SEC obtenidos en el Ejemplo 9 después de la purificación de resina por afinidad de proteína A de hp4SD1-03, hp4SD1-03 AAQ y hp4SD1-03 AAA producida en células Expi293F™ transfectadas de manera transitoria. La fracción resaltada se analizó en gel SDS-PAGE.

[00173] La **Figura 21** proporciona ejemplos de resultados de la evaluación de temperatura de fusión como se describe en el Ejemplo 9. Los tres gráficos superiores son ejemplos de curvas de fusión para hp4SD1-03, hp4SD1-03 AAQ y hp4SD1-03 AAA, cada una analizada por duplicado. La tabla (derecha superior) proporciona los valores de Tm1 promedio para cada muestra corrida por duplicado. El gráfico inferior muestra una superposición de valores Tagg de cada muestra analizada por duplicado.

[00174] La **Figura 22** proporciona ejemplos de resultados del ensayo de señalización Wnt en el Ejemplo 9. El gráfico (izquierda) muestra ejemplos de curvas de respuesta a la dosis para hp4SD1-03, hp4SD1-03 AAQ y hp4SD1-03 AAA obtenidas usando un sistema indicador de luciferasa en células bEnd.3 que expresan de manera nativa Fzd4 y LRP5. La tabla (derecha) muestra valores de EC50 de la curva de ajuste.

[00175] La **Figura 23** proporciona ejemplos de resultados de la evaluación de unión al receptor Fc neonatal FcRn en el Ejemplo 9. Los gráficos son ejemplos de sensogramas para hp4SD1-03, hp4SD1-03-AAQ y hp4SD1-03-AAA. hp4SD1-03 muestra la unión a FcRn según se esperaba, y, en contraste, no se observó unión con los mutantes hp4SD1-03-AAQ o hp4SD1-03-AAA.

[00176] Las **Figuras 24-34** proporciona formas de realización de ejemplo y no limitativas de diversas estructuras de anticuerpos multiespecíficos que pueden comprender cualquiera de las secuencias de dominio variable de anticuerpos anti-Fzd4 y anti-LRP5/6 divulgados en la presente. En las **Figuras 24-34**, se aplica lo siguiente a menos que se indique lo contrario: **(1)** cada dominio se presenta como un rectángulo en donde el texto muestra el nombre del dominio (por ejemplo, CH3, VH1, etc.); **(2)** un conjunto de múltiples dominios conectados entre sí representa un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido de cadena pesada, un polipéptido de cadena liviana, etc.); **(3)** la dirección de los dominios dentro de un polipéptido está de acuerdo con la dirección del texto que muestra los nombres de dominio, del extremo N al extremo C; **(4)** un ligador o una bisagra pueden usarse entre los dominios según sea necesario y un enlace disulfuro puede existir entre los polipéptidos (y/o dentro de un dominio), tal vez para permitir la correcta formación de los sitios de unión al antígeno, incluso cuando las figuras no muestren explícitamente un ligador, una bisagra o un enlace disulfuro; **(5)** una línea que se extiende desde un VH2 a otro dominio significa que un ligador puede o no estar presente entre el VH2 y el otro dominio; **(6)** un dominio CH1, CH2, CH3 y/o CL mostrado en las figuras puede omitirse de ser posible y, de ser adecuado, puede reemplazarse con una bisagra o un ligador; **(7)** los dominios CH1, CH2 y CH3 pueden individualmente ser de cualquier isotipo (cadena pesada); **(8)** si más de un dominio CH1 está presente

en una estructura, las secuencias de dominio CH1 pueden o no ser idénticas entre sí o pueden o no ser del mismo isotipo, si más de un dominio CH2 está presente en una estructura, las secuencias de dominio CH2 pueden o no ser idénticas entre sí o pueden o no ser del mismo isotipo, y si más de un dominio CH3 está presente en una estructura, las secuencias de dominio CH3 pueden o no ser idénticas entre sí o pueden o no ser del mismo isotipo; **(9)** el dominio constante de la cadena liviana (CL) puede ser un dominio CL kappa o un dominio CL lambda; **(10)** si más de un dominio CL está presente en una estructura, todos los dominios CL pueden ser CL kappa o todos los dominios CL pueden ser CL lambda, o de manera alternativa un CL puede ser un CL kappa y otro CL puede ser un dominio CL lambda, y las secuencias de dominio CL pueden o no ser idénticas entre sí; **(11)** si ambos dominios CL kappa y lambda están presentes, los dominios CH1 emparejados con los dominios CL pueden, en algunos casos, ser dominios CH1 variantes, en donde uno puede ser un CH1 variante que preferentemente se une a un CL kappa y otro dominio CH1 puede ser un CH1 variante que preferentemente se une a un lambda CL (la presencia de CL kappa y lambda y CH1 que prefiere kappa y CH1 que prefiere lambda en una molécula potencialmente permite una elaboración eficaz); **(12)** en general, VH1 y VL1 (si VL1 está presente) forman una región de unión al antígeno para un primer antígeno (por ejemplo, Fzd4), y VH2 forma una región de unión al antígeno para un segundo antígeno (por ejemplo, LRP5 y/o LRP6); **(13)** en un par VH1-VL1, el VL1 puede omitirse incluso si VL1 se muestra en las figuras si el VH1 solo proporciona una especificidad suficiente al primer antígeno (es decir, nanocuerpo); y **(14)** incluso si VL2 no se muestra explícitamente en las figuras, la región de unión al antígeno que comprende VH2 puede comprender además VL2, siempre que el par VH2-VL2 mantenga la unión al segundo antígeno.

[00177] La **Figura 24** proporciona formas de realización de ejemplo y no limitativas de diversas estructuras de anticuerpos multiespecíficos con las que es posible usar cualquiera de las secuencias de dominio variable de anticuerpos anti-Fzd4 y anti-LRP5/6 divulgados en la presente. La estructura en la parte izquierda superior (recuadrada) es un ejemplo de estructura contenida por alguno de los anticuerpos biespecíficos específicos divulgados en la presente (por ejemplo, hp4SD1-03, hp4SD1-03 AAQ, hp4SD1-03 AAA). La estructura recuadrada tiene dos primeros polipéptidos (que también pueden denominarse cadenas pesadas en la presente), en donde cada uno comprende un VH1, un CH1, un CH2 y un CH3 del extremo N al extremo C; y dos segundos polipéptidos (que también pueden denominarse cadenas livianas en la presente), en donde cada uno comprende un VH2, un ligador opcional, un VL1 y un CL

del extremo N al extremo C. Cada par de VH1 y VL1 forma una región de unión al antígeno específica para un primer antígeno, y cada VH2 forma una región de unión al antígeno específica para un segundo antígeno. Aunque las bisagras o enlaces disulfuro no se muestran explícitamente en la estructura recuadrada, la estructura recuadrada puede comprender, por ejemplo, una bisagra entre CH1 y CH2 dentro de un único polipéptido y un enlace disulfuro puede estar presente entre las bisagras y entre los dominios CH1 y CL como se muestra en la estructura en la parte inferior izquierda (los enlaces disulfuro se muestran como líneas punteadas). De manera alternativa, el anticuerpo recuadrado puede comprender, por ejemplo, una bisagra entre CH1 y CH2 dentro de un único polipéptido y un enlace disulfuro puede estar presente entre las bisagras y entre CL y una bisagra como se muestra en la estructura en la parte inferior derecha (los enlaces disulfuro se muestran como líneas punteadas). Las bisagras y enlaces disulfuro, tales como los que se muestra en las estructuras en parte inferior izquierda y derecha, pueden estar presentes, incluso si no se muestran de manera explícita, en cualquier estructura mostrada en las figuras y descrita en la presente.

[00178] La **Figura 25** proporciona ejemplos de variaciones de las estructuras de anticuerpo mostradas en la **Figura 24**. En algunas variantes del anticuerpo recuadrado, un VH2 puede reubicarse en una posición diferente, por ejemplo, en el extremo N con respecto a VH1 en un primer polipéptido (derecha superior), extremo C con respecto a CL en un segundo polipéptido (izquierda inferior), o extremo C con respecto a CH3 en un primer polipéptido (derecha inferior). Las variaciones equivalentes (que reubican un VH2) ilustradas en la **Figura 25** pueden aplicarse además a cualquier estructura mostrada en las **Figuras 24-34** o variaciones de esta según corresponda, incluso si no se muestran o indican de manera explícita.

[00179] La **Figura 26** proporciona otros ejemplos de variaciones de las estructuras de anticuerpo mostradas en la **Figura 24**. En algunas variantes del anticuerpo recuadrado, puede incluir además un VH2, por ejemplo, en el extremo N con respecto a otro VH2 en un segundo polipéptido (izquierda superior), extremo N con respecto a VH1 en un primer polipéptido (derecha superior), extremo C con respecto a CL en un segundo polipéptido (izquierda inferior), o extremo C con respecto a CH3 en un primer polipéptido (derecha inferior). Las variaciones equivalentes (que agregan un VH2 a los extremos N o C de un primer y/o segundo polipéptidos) ilustradas en la **Figura 26** pueden aplicarse además a cualquier estructura mostrada en las **Figuras 24-34** o variaciones de esta según corresponda, incluso si no se muestran o indican de manera

explícita.

[00180] La **Figura 27** proporciona algunos ejemplos de variaciones de las estructuras de anticuerpo mostradas en la **Figura 25**. Específicamente, las posiciones de VH1 y VL1 se intercambian con respecto a las estructuras de anticuerpo mostradas en la **Figura 25**. Las variaciones equivalentes (que intercambian VH1 y VL1) ilustradas en la **Figura 27** pueden aplicarse además a cualquier estructura mostrada en las **Figuras 24-34** o variaciones de esta según corresponda, incluso si no se muestran de manera explícita.

[00181] La **Figura 28** proporciona algunos ejemplos de variaciones de las estructuras de anticuerpo mostradas en la **Figura 25**. Específicamente, las posiciones de CH1 y CL se intercambian con respecto a las estructuras de anticuerpo mostradas en la **Figura 25**. Las variaciones equivalentes (que intercambian CH1 y CL) ilustradas en la **Figura 28** pueden aplicarse además a cualquier estructura mostrada en las **Figuras 24-34** o variaciones de esta según corresponda, incluso si no se muestran de manera explícita.

[00182] La **Figura 29** proporciona algunos ejemplos de variaciones de las estructuras de anticuerpo mostradas en la **Figura 25**. Específicamente, los dominios CH3 están ausentes con respecto a las estructuras de anticuerpo mostradas en la **Figura 25**. Las variaciones equivalentes (que eliminan CH3) ilustradas en la **Figura 29** pueden aplicarse además a cualquier estructura mostrada en las **Figuras 24-34** o variaciones de esta según corresponda, incluso si no se muestran de manera explícita.

[00183] La **Figura 30** proporciona algunos ejemplos de variaciones de las estructuras de anticuerpo mostradas en la **Figura 25**. Específicamente, los dominios CH2 están ausentes con respecto a las estructuras de anticuerpo mostradas en la **Figura 25**. Las variaciones equivalentes (que eliminan CH2) ilustradas en la **Figura 30** pueden aplicarse además a cualquier estructura mostrada en las **Figuras 24-34** o variaciones de esta según corresponda, incluso si no se muestran de manera explícita.

[00184] La **Figura 31** proporciona algunos ejemplos de variaciones de las estructuras de anticuerpo mostradas en la **Figura 25**. Específicamente, los dominios CH2 y CH3 están ausentes con respecto a las estructuras de anticuerpo mostradas en la **Figura 25**. En algunos casos, las bisagras y enlaces disulfuro pueden estar presentes para permitir la dimerización de los dos primeros polipéptidos, como se muestra (los enlaces disulfuro se muestran como líneas punteadas). Las variaciones equivalentes (que eliminan CH2 y CH3) ilustradas en la **Figura 31** pueden aplicarse además a cualquier estructura mostrada en las **Figuras 24-34** o variaciones de esta según

corresponda, incluso si no se muestran de manera explícita.

[00185] La **Figura 32A** proporciona algunos ejemplos de variaciones de las estructuras de anticuerpo mostradas en la **Figura 25**. Específicamente, las estructuras mostradas son la mitad de las estructuras de anticuerpo mostradas en la **Figura 25**, es decir, comprenden un primer polipéptido y un segundo polipéptido, y contienen una primera región de unión al antígeno y una segunda región de unión al antígeno. Las variaciones equivalentes (media estructura o medio anticuerpo) ilustradas en la **Figura 32A** pueden aplicarse además a cualquier estructura mostrada en las **Figuras 24-34** o variaciones de esta según corresponda, incluso si no se muestran de manera explícita.

[00186] La **Figura 32B** proporciona otros ejemplos de variaciones de la mitad de las estructuras de anticuerpo mostradas en la **Figura 32A**, que no comprenden CH2 y CH3, pero comprenden CH1. Las estructuras pueden comprender una bisagra o una bisagra parcial en el extremo C con respecto a CH1 (cuatro estructuras en la parte superior), y el VH2 puede ubicarse en el extremo N con respecto a VL1 (izquierda superior), extremo N con respecto a VH1 (segundo superior desde la izquierda), extremo C con respecto a CL (segundo superior desde la derecha) o extremo C con respecto a la bisagra o bisagra parcial (derecha superior). De manera alternativa, las estructuras pueden no comprender una bisagra (cuatro estructuras en la parte inferior), y el VH2 puede ubicarse en el extremo N con respecto a VL1 (izquierda superior), extremo N con respecto a VH1 (segundo superior desde la izquierda), extremo C con respecto a CL (segundo superior desde la derecha) o extremo C con respecto a CH1 (derecha superior).

[00187] La **Figura 33** proporciona otras formas de realización de ejemplo y no limitativas de diversas estructuras de anticuerpos multiespecíficos que pueden comprender cualquiera de las secuencias de dominio variable de anticuerpos anti-Fzd4 y anti-LRP5/6 divulgados en la presente. En las estructuras mostradas en la parte superior, VH1 y VL1 forman un scFv y se fusionan adicionalmente a VH2. El scFv puede comprender un VH1, un ligador opcional, y un VL1 o VL1, un ligador opcional, y un VH1 en la dirección desde el extremo N al extremo C y un VH2 puede ubicarse en el extremo N al scFv (izquierda superior y segundo superior desde la izquierda) o extremo C con respecto al scFv (derecha superior y segundo superior desde la derecha). Tales estructuras pueden estar adicionalmente ligadas o dimerizadas. Por ejemplo, como se muestra en las estructuras en la parte inferior, la estructura recuadrada puede fusionarse a otra estructura recuadrada (izquierda inferior) o a cada una de las otras tres variantes en la parte superior (izquierda inferior, derecha inferior y segunda inferior desde la

derecha).

[00188] La **Figura 34** proporciona otros ejemplos de variaciones de la estructura recuadrada de la **Figura 24**. Específicamente, VH1 y VL1 forman un scFv y se fusionan adicionalmente a VH2. Por lo tanto, las estructuras de anticuerpo pueden comprender dos primeros polipéptidos, en donde cada uno comprende un VH2, un VL1, un ligador opcional, un VH1, CH1, CH2 y CH3 desde el extremo N a extremo C (izquierda superior, recuadrado). En otras variantes de la estructura recuadrada, los dominios CH3 pueden estar ausentes (medio a la izquierda), los dominios CH2 pueden estar ausentes (medio al centro), o los dominios CH2 y CH3 pueden estar ausentes (medio a la derecha). Las bisagras y enlaces disulfuro pueden estar presentes, por ejemplo, como se muestra en las estructuras en la parte inferior (los enlaces disulfuro se muestran como líneas punteadas).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[00189] Como se usa en la presente, que incluye las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de palabras como “un”, “una/uno” y “la/el” incluyen sus referencias plurales correspondientes a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[00190] Todas las referencias citadas en la presente se incorporan por referencia con el mismo alcance que si se indicara que cada publicación, solicitud de patente o patente individual se incorpora de manera específica e individual por referencia. Nada en la presente se debe interpretar como un reconocimiento de que la presente invención no puede anteceder dicha divulgación en virtud de una invención anterior.

I. Definiciones.

[00191] A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que les otorga habitualmente una persona del oficio de nivel medio al cual pertenece la divulgación.

[00192] Cabe destacar que la terminología que se usa en la descripción tiene como finalidad describir solamente versiones o formas de realización particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que solo será limitado por las reivindicaciones adjuntas.

[00193] Como se usa en la presente, la expresión “alrededor de”, cuando se usa en referencia a un valor numérico mencionado en particular, se refiere a que el valor puede variar del valor citado en no más de 10 %. Por ejemplo, como se usa en la presente, la expresión “alrededor de 100” incluye 90 y 110 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 91, 92, 93, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 100, 100,8, 100,9, 101,

106, 107, 108, 109, etc.).

[00194] La “actividad” de una molécula puede describir o referirse a la unión de la molécula a un ligando o a un receptor, a la actividad catalítica, a la capacidad para inducir, promover, potenciar y/o soportar la multimerización (por ejemplo, dimerización, trimerización, tetramerización, etc.) de una o más moléculas diana (por ejemplo, antígeno), a la capacidad para inducir, promover, potenciar y/o soportar la transducción de señal en una célula que expresa una o más moléculas diana (por ejemplo, antígeno), a la capacidad para alterar (por ejemplo, estimular o suprimir) la expresión génica, a la actividad antigénica, a la modulación de actividades de otras moléculas, tal como actividades de un ligando específico para la una o más moléculas diana (por ejemplo, antígeno)), y similares. La “actividad” de una molécula también puede referirse a la actividad para modular o mantener las interacciones entre células, por ejemplo, adhesión, o la actividad para mantener una estructura de una célula, por ejemplo, membranas celulares o citoesqueleto, o efectos terapéuticos. La “actividad” puede también significar actividad específica, por ejemplo, [actividad catalítica]/[mg de proteína], o [actividad inmunológica]/[mg de proteína], o similares.

[00195] Los términos “administrar” o “introducir”, como se usa en la presente, se refieren a la administración de un compuesto o una composición de acuerdo con la presente invención a una célula, células, tejidos y/u órganos de un sujeto, o a un sujeto. Dicha administración o introducción puede llevarse a cabo *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*.

[00196] Como se usa en la presente, el término “anticuerpo” se refiere a un agente de unión aislado o recombinante que comprende las secuencias de región variable necesarias para unirse específicamente a un epítipo antigénico. Por lo tanto, un anticuerpo es cualquier forma de anticuerpo o fragmento de este que presenta la actividad biológica deseada, por ejemplo, que se une al antígeno diana específico. Por lo tanto, se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (lo que incluye anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, nanocuerpos, diacuerpos, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo que incluyen, entre otros, scFv, Fab y F(ab')₂, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

[00197] La expresión “fragmentos de anticuerpo” comprende una porción de un anticuerpo intacto, por ejemplo, la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (por ejemplo, Zapata *et al.*,

Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)); moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv); medio anticuerpo; nanocuerpo o VH solo, o VL solo; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo. La expresión “media molécula” o “medio anticuerpo”, cuando se refiere a IgG, IgE o IgD, que también pueden denominarse “media IgG”, “media IgE” o “media IgD”, respectivamente, se refiere a un conjunto de una cadena pesada y una cadena liviana de anticuerpo mencionado. La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento de pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno e incluso es capaz de generar reticulación con el antígeno.

[00198] Las expresiones “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo completo” o similares se usan en la presente de manera indistinta y hacen referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a un anticuerpo nativo. En algunos casos, un anticuerpo comprende cadenas pesadas (H) y livianas (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Por ejemplo, un anticuerpo IgG (o IgD o IgE) intacto comprende dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas livianas de inmunoglobulina. Por lo tanto, en algunos casos, un anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede comprender dos pares de cadenas pesada y liviana interconectadas mediante enlaces disulfuro, o fragmentos de unión al antígeno de estas. Algunos anticuerpos intactos comprenden múltiples unidades, en donde cada una comprende dos pares de cadenas pesada y liviana interconectadas mediante enlaces disulfuro. Por ejemplo, una IgA intacta comprende dos unidades y una IgM intacta comprende cinco unidades. Por lo tanto, en otros casos, un anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede en su lugar comprender múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, etc.) unidades, en donde cada una comprende dos pares de cadenas pesada y liviana interconectadas mediante enlaces disulfuro, o fragmentos de unión al antígeno de estas.

[00199] En un anticuerpo intacto, cada cadena pesada comprende: un dominio variable de la cadena pesada (VH); y una región constante de la cadena pesada (CH), que en general comprende dominios CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana comprende:

un dominio variable de la cadena liviana (VL); y un dominio constante de la cadena liviana (CL). Por lo general (con algunas excepciones, tales como nanocuerpos, anticuerpos de cadena pesada de camélido, IgNAR, y similares), un VH y un VL pueden formar una región de unión al antígeno. El VH y VL también se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada polipéptido de VH y VL está compuesto por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las CDR en una cadena pesada se denominan “CDRH1”, “CDRH2” y “CDRH3”, respectivamente, y las CDR en una cadena liviana se denominan “CDRL1”, “CDRL2” y “CDRL3”. Las FR en una cadena pesada se denominan “FRH1”, “FRH2”, “FR3” y “FRH4”, respectivamente, y las FR en una cadena liviana se denominan “FRL1”, “FRL2”, “FRL3” y “FRL4”. En algunas formas de realización de la divulgación, las FR del anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno de este) pueden ser idénticas a las secuencias codificadas por línea germinal humana (por ejemplo, secuencias de FR de cadena pesada codificadas por la línea germinal VH1-03; y/o secuencias de FR de cadena liviana codificadas por la línea germinal VK4-01) o pueden modificarse de manera natural o artificial. Una secuencia de consenso de aminoácidos puede definirse con base en un análisis paralelo de dos o más CDR.

[00200] La frase “cadena pesada” o “HC” se usa en su sentido más amplio y abarca un polipéptido que comprende al menos un dominio de cadena pesada de inmunoglobulina o una parte (es decir, al menos uno de VH, CH1, bisagra, CH2 y CH3). De manera similar, la frase “cadena liviana” o “LC” se usa en su sentido más amplio y abarca un polipéptido que comprende al menos un dominio de cadena liviana de inmunoglobulina (es decir, al menos uno de VL y CL).

[00201] La numeración de los residuos de aminoácidos en dominios variables y/o constantes de anticuerpo puede realizarse mediante cualquier esquema, método y definición de numeración adecuados. Por ejemplo, las secuencias de CDR pueden determinarse con base en numeración Kabat o numeración IMGT, o, de manera alternativa, numeración Chothia, numeración Martin (también denominada numeración AbM), numeración Gelfand, numeración de Honneger (también denominada numeración de AHo), o numeración del Chemical Computing Group (CCG) para regiones variables o se pueden determinar de manera estructural (ver, por ejemplo, IgBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>); Dondelinger *et al.*, *Front Immunol.* 16 de octubre de 2018;9:2278; <http://www.bioinf.org.uk/abs/info.html#cdrid>;

<http://opig.stats.ox.ac.uk/webapps/newsabdab/sabpred/anarci/>). Para dominios constantes es posible usar, por ejemplo, numeración EU, numeración IMGT o numeración Kabat. A menos que se indique lo contrario, se usa numeración EU para las regiones y dominios constantes.

[00202] De acuerdo con IMGT (el sistema internacional ImMunoGeneTics information system para inmunoglobulinas o anticuerpos, receptores de linfocitos T, MH, superfamilia de inmunoglobulinas IgSF y MhSF), el dominio CH1, la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3 corresponden a las posiciones de aminoácido 118-215, 216-230, 231-340 y 341-446, respectivamente (numeración EU). Las expresiones “dominio CH1”, “bisagra”, “dominio CH2” y “CH3” se usan en un sentido amplio en la presente para abarcar cualquier dominio constante de la cadena pesada natural correspondiente y/o alotipos de región y variantes de estos, que puede comprender más o menos aminoácidos (por ejemplo, un dominio CH1 puede comprender una porción de una región bisagra) y/o modificaciones de aminoácido.

[00203] Un ejemplo de dominio CH1 de una IgG1 humana puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 o 22; un ejemplo de bisagra de un IgG1 humana puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31; y un dominio CH2 de una IgG1 humana puede comprender las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 41. Un ejemplo de dominio CH3 de una IgG1 humana puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, 52, 53 o 54, y K de extremo C puede eliminarse en tales secuencias CH3. Cualquier variante de dichas secuencias de ejemplo puede usarse junto con las CDR y/o secuencias de dominio variable descritas en la presente.

[00204] Una “región Fc” es una región del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante, que incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Una región Fc de la cadena pesada de IgG humana puede extenderse desde Asp221 al extremo carboxilo de la cadena pesada. No obstante, la lisina del extremo C (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique lo contrario en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o la región constante es de acuerdo al sistema de numeración EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat *et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991.

[00205] La frase “función efectora” de un anticuerpo se refiere a las actividades biológicas que se atribuyen a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del

anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras incluyen: unión al complemento (por ejemplo, C1q) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión a receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación descendente de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

[00206] Existen dos isotipos principales de cadena liviana, kappa (κ) y lambda (λ), y los correspondientes dominios constantes de la cadena liviana se denominan dominio CL kappa (CL κ) y dominio CL lambda (CL λ), respectivamente.

[00207] De acuerdo con IMGT, el dominio CL κ es las posiciones de aminoácido 108-214 (numeración EU). Un ejemplo de dominio CL κ de una IgG humana puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. De acuerdo con IMGT, el dominio CL λ es las posiciones de aminoácido 107-215 (numeración EU). Un ejemplo de dominio CL λ de una IgG humana puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

[00208] Las expresiones "CL κ " y "CL λ " se usan en un sentido amplio en la presente para abarcar cualquier dominio constante de la cadena liviana natural correspondiente y/o alotipos de región y variantes de estos, que puede comprender más o menos aminoácidos y/o modificaciones de aminoácido.

[00209] Diversas secuencias estándar (correspondientes a diferentes alotipos) de los dominios constantes de IgG1 humana, IgG2, IgG3 e IgG4 se conocen en el campo y pueden hallarse, por ejemplo, en Vidarsson *et al.*, *Front Immunol.* 20 de octubre de 2014;5:520 y patente estadounidense N.º 9150663, cuyas divulgaciones se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. Nuevamente, estas secuencias se referencia son a modo de ejemplo, dado que el Solicitante indica que las secuencias de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humana incluyen cualquier alotipo de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humana natural.

[00210] Una "región de unión al antígeno" se refiere a una porción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno con especificidad para un antígeno. En algunos casos, una región de unión al antígeno puede comprender un VH y un VL. En algunos casos, una región de unión al antígeno puede comprender un VH y ningún VL, por ejemplo, en el caso de un nanocuerpo.

[00211] El término "antígeno" se refiere a una molécula o una porción de una molécula capaz de unirse por medio de un agente de unión, tal como un anticuerpo, y adicionalmente capaz de usarse en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de dicho antígeno. En algunas formas de realización, se indica que

un agente de unión (por ejemplo, una molécula sustituta Wnt o región de unión de esta, o un antagonista Wnt) se une específicamente a un antígeno cuando este reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

[00212] La frase “diferentes antígenos” puede referirse a proteínas, polipéptidos o moléculas diferentes y/o distintas; así como a epítopos diferentes y/o distintos, en donde los epítopos pueden estar contenidos dentro de una proteína, un polipéptido o una molécula. Un “fragmento de unión al antígeno” o “fragmento de anticuerpo de unión al antígeno” se refiere a una porción de un anticuerpo intacto o a una combinación de porciones derivadas de uno o más anticuerpos intactos que se unen al antígeno al que el anticuerpo intacto se une. La expresión “fragmento de unión al antígeno” como se usa en la presente puede referirse a un fragmento de polipéptido que contiene al menos una CDR de una cadena pesada y/o liviana de inmunoglobulina, o de un VHH/sdAb (anticuerpo de dominio único) o Nanobody® (Nab), que se une al antígeno de interés, en particular a uno o más receptores Fzd, o a LRP5 y/o LRP6. En este sentido, un fragmento de unión al antígeno de los anticuerpos descritos en la presente puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o las 6 CDR de un VH y VL de anticuerpos que se unen a uno o más receptores Fzd, o LRP5 y/o LRP6. Un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo incluye cualquier polipéptido o glicoproteína natural, que se puede obtener enzimáticamente, a partir de síntesis o modificada por ingeniería genética que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo.

[00213] Como se usa en la presente, las expresiones “actividad biológica” y “biológicamente activo” se refieren a la actividad que se atribuye a un elemento biológico en particular en una célula. Por ejemplo, la “actividad biológica” de un agonista Wnt, o fragmento o variante de este, se refiere a la capacidad para imitar o potenciar las señales Wnt. Como otro ejemplo, la actividad biológica de un polipéptido o fragmento funcional o variante de este se refiere a la capacidad del polipéptido o fragmento funcional o variante de este para llevar a cabo sus funciones nativas de, por ejemplo, unión, actividad enzimática, etc. Como un tercer ejemplo, la actividad biológica de un elemento regulador génico, por ejemplo, un promotor, potenciador, secuencia Kozak y similares, se refiere a la capacidad del elemento regulador o fragmento funcional o variante de este para regular, es decir, promover, potenciar o activar la traducción de, respectivamente, la expresión del gen al que se une operativamente.

[00214] La expresión “anticuerpo bifuncional”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que comprende un primer brazo que tiene una especificidad para

un sitio antigénico y un segundo brazo que tiene una especificidad para un sitio antigénico diferente, es decir, los anticuerpos bifuncionales tienen una especificidad dual.

[00215] Con respecto a los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos, triespecíficos, tetraespecíficos, etc.), dichos anticuerpos comprenden al menos dos regiones de unión al antígeno diferentes que reconocen y se unen específicamente a al menos dos antígenos o epítomos diferentes. Los diferentes epítomos pueden o no estar dentro del mismo antígeno. Un “anticuerpo biespecífico” es un tipo de anticuerpo multiespecífico y comprende dos regiones de unión al antígeno diferentes que reconocen y se unen específicamente a dos antígenos o dos epítomos diferentes. Un anticuerpo biespecífico puede actuar sobre, por ejemplo, dos receptores de superficie diferentes en la misma célula o diferentes. “Anticuerpo biespecífico” se usa en la presente para abarcar un anticuerpo de longitud completa que se genera mediante tecnología de cuadroma (ver Milstein *et al.*, *Nature*, 305(5934): 537-540 (1983)), mediante conjugación química de dos anticuerpos monoclonales diferentes (ver, Staerz *et al.*, *Nature*, 314(6012): 628-631 (1985)), o mediante enfoques de botón en ojal o similares, que introducen mutaciones en la región Fc (ver Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(14): 6444-6448 (1993)), lo que produce múltiples especies de inmunoglobulina diferentes de las que solo una es el anticuerpo biespecífico funcional. Un anticuerpo biespecífico se une a un antígeno (o epítomo) en uno de sus dos brazos de unión (un par de HC/LC), y se une a un antígeno (o epítomo) diferente en su segundo brazo (un par diferente de HC/LC). A partir de esta definición, un anticuerpo biespecífico tiene dos brazos de unión al antígeno distintos (en ambas especificidades y secuencias de CDR).

[00216] La expresión “que comprende” se refiere a que los elementos mencionados son necesarios en, por ejemplo, la composición, método, kit, etc., pero otros elementos pueden incluirse para formar, por ejemplo, la composición, método, kit, etc. dentro del alcance de la reivindicación. Por ejemplo, un casete de expresión “que comprende” un gen que codifica un polipéptido terapéutico ligado operativamente a un promotor es un casete de expresión que puede incluir otros elementos además del gen y el promotor, por ejemplo, una secuencia de poliadenilación, elementos potenciadores, otros genes, dominios ligadores, etc.

[00217] Una “sustitución conservadora de aminoácidos” es una en donde un residuo de aminoácidos se sustituye por otro residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o

hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservadora no modificará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en donde dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservadoras, el porcentaje o grado de similitud puede ajustarse en forma ascendente para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para realizar esta adaptación son conocidos por las personas del oficio de nivel medio. (Ver, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331). Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales hidroxilo alifáticas: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina, y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. En algunas formas de realización, los grupos de sustitución conservadora de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. De manera alternativa, en algunas formas de realización, un reemplazo conservador comprende cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad de log PAM250 divulgada en Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-45. En algunas formas de realización, un reemplazo “moderadamente conservador” comprende cualquier cambio que tenga un valor no negativo en una matriz de posibilidad de log PAM250.

[00218] La expresión “que consiste esencialmente en” se refiere a una limitación del alcance de, por ejemplo, la composición, método, kit, etc., descrita para los materiales o etapas especificados que no afecta materialmente las características básicas y novedosas de, por ejemplo, la composición, método, kit, etc. Por ejemplo, un casete de expresión “que consiste esencialmente en” un gen que codifica un polipéptido terapéutico ligado operativamente a un promotor y una secuencia de poliadenilación puede incluir secuencias adicionales, por ejemplo, secuencias ligadoras, siempre que no afecten materialmente la transcripción o traducción del gen. Como otro ejemplo, un fragmento de polipéptido variante o mutante “que consiste esencialmente en” una secuencia mencionada tiene la secuencia de aminoácidos de la secuencia mencionada más o menos alrededor de 10 residuos de aminoácidos en los límites de la secuencia con base en el polipéptido indiferenciado de longitud completa del que se derivó, por ejemplo, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 residuos menos que el residuo de aminoácidos limitante mencionado, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos más que el residuo de

aminoácidos limitante mencionado.

[00219] La expresión “que consiste en” se refiere a la exclusión de la composición, método o kit de cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificados en la reivindicación. Por ejemplo, un polipéptido o dominio de polipéptido “que consiste en” una secuencia mencionada contiene solamente la secuencia mencionada.

[00220] Un "elemento de control" o "secuencia de control" es una secuencia de nucleótidos que participa en una interacción de moléculas que contribuye a la regulación funcional de un polinucleótido, que incluye la replicación, duplicación, transcripción, empalme, traducción o degradación del polinucleótido. La regulación puede afectar la frecuencia, velocidad o especificidad del proceso, y puede ser de naturaleza potenciadora o inhibidora. Los elementos de control conocidos en el estado de la técnica incluyen, por ejemplo, secuencias reguladoras transcripcionales, tales como promotores y potenciadores. Un promotor es una región de ADN capaz, en determinadas condiciones, de unir ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una región codificante usualmente ubicada corriente abajo (en dirección 3') del promotor.

[00221] Un “cantidad eficaz” de un anticuerpo divulgado en la presente o una composición (por ejemplo, composición farmacéutica), es al menos la cantidad mínima necesaria para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado, por ejemplo, una mejora medible o prevención de un trastorno en particular, por ejemplo, retinopatía, preferentemente con efectos perjudiciales mínimos o no tóxicos. Una cantidad eficaz puede variar de acuerdo con, entre otros, estado de enfermedad, edad, sexo y peso del paciente, y la capacidad del anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno de este) para provocar una respuesta deseada en el individuo y, en algunos casos, al coadministrar uno o más agentes terapéuticos adicionales.

[00222] Un "vector de expresión" es un vector, por ejemplo, plásmido, minicírculo, vector viral, liposoma y similares como se analiza en la presente o como se conoce en el estado de la técnica, que comprende una región que codifica un producto génico de interés, y se usa para efectuar la expresión del producto génico en una célula diana deseada. Un vector de expresión también comprende elementos de control, por ejemplo, promotores, potenciadores, UTR, secuencias que actúan sobre miARN, etc., ligados operativamente a la región codificante para facilitar la expresión del producto génico en la diana. La combinación de elementos de control y un gen o genes a los que se ligan operativamente para su expresión en ocasiones se denomina "casete de expresión", de los cuales una gran cantidad son conocidos y se encuentran disponibles en el estado de la técnica o se pueden construir con facilidad a partir de componentes disponibles en

el estado de la técnica.

[00223] Como se usa en la presente, la expresión "conjunto de FR" se refiere a las cuatro secuencias de aminoácidos flanqueantes que enmarcan las CDR de un conjunto de CDR de una región V de la cadena pesada o liviana. Algunos residuos FR pueden contactar al antígeno unido; no obstante, las FR son principalmente responsables del plegamiento de la región V en el sitio de unión al antígeno, en particular, los residuos FR directamente adyacentes a las CDR. Dentro de las FR, algunos residuos amino y algunas características estructuras tienen conservación muy alta. En este sentido, todas las secuencias de región V contienen un bucle disulfuro interno de alrededor de 90 residuos de aminoácidos. Cuando las regiones V se pliegan en un sitio de unión, las CDR se muestran como motivos de bucle en proyección que forman una superficie de unión al antígeno. Por lo general se reconoce que existen regiones estructurales conservadas de las FR que afectan la forma plegada de los bucles CDR en determinadas estructuras "canónicas", independientemente de la secuencia de aminoácidos CDR exacta. Además, se conoce que algunos residuos FR participan en contactos interdominio no covalentes que estabilizan la interacción de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo.

[00224] La familia frizzled es una familia de receptores de clase frizzled, que son receptores acoplados a proteína G que sirven como receptores en las vías de señalización Wingless/Integrated (Wnt) y otras, por lo general como un correceptor, tal como LRP5, LRP6 o ROR1/2. Los miembros de la familia frizzled incluyen los receptores de clase frizzled 1-10 (Fzd1, Fzd2, Fzd3, Fzd4, Fzd5, Fzd6, Fzd7, Fzd8, Fzd9 y Fzd10).

[00225] El receptor de clase Frizzled 4 (Fzd4) es un miembro de la familia frizzled, una familia de Fzd4 puede también denominarse CD344, EVR1, FEVR, frizzled 4, receptor de familia frizzled 4, homólogo frizzled 4, Fz4, Fz-4, Fzd4S, FzE4, MGC34390 o receptor Wnt frizzled-4. En los seres humanos, Fzd4 se codifica mediante el gen *Fzd4* en el cromosoma 11, con la ubicación génica 11q14.2 (NCBI, gen ID: 8322). En algunas formas de realización, Fzd4 humano puede tener la secuencia de aminoácidos proporcionada como GenBank: AAR23924.1 o SEQ ID NO: 4, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares.

[00226] Una o más alteraciones en el gen *Fzd4* o una expresión alterada del gen *Fzd4* causa diversas enfermedades y/o fenotipos. De acuerdo con la base de datos OMIM® (<https://www.omim.org/>), las enfermedades genéticas del gen *Fzd4* incluyen: vitreorretinopatía exudativa 1 (número MIM de fenotipo 133780, autosómica dominante);

y retinopatía de prematuridad (número MIM de fenotipo 133780, autosómica dominante)). De acuerdo con MedlinePlus (NIH, <https://medlineplus.gov/genetics/gene/>), enfermedades que implican cambios genéticos en el gen *Fzd4* incluyen: vitreorretinopatía exudativa familiar.

[00227] La expresión “célula huésped” se refiere a células en donde se introdujo una secuencia de ácidos nucleicos exógena, que incluye la progenie de dichas células. Las células huésped incluyen “transformantes” y “células transformadas”, que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de esta, independientemente de la cantidad de pases.

[00228] Los términos "individuo", "huésped", "sujeto" y "paciente" se usan de manera indistinta en la presente, y se refieren a un mamífero, que incluye, entre otros, primates humanos y no humanos, que incluyen simios y seres humanos; animales mamíferos de deporte (por ejemplo, caballos); animales mamíferos de granja (por ejemplo, ovejas, cabras, etc.); mascotas mamíferas (perros, gatos, etc.); y roedores (por ejemplo, ratones, ratas, etc.).

[00229] Los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) participan en una variedad de funciones celulares que incluyen endocitosis de lipoproteínas de baja densidad (LDL), portadores primarios de colesterol en la sangre. Los miembros de la familia LDLR incluyen receptor LDL, proteínas relacionadas con receptores de lipoproteínas de baja densidad 1, 1b, 2, 3, 4, 5, 6 y 8 (LRP1, LRP1b, LRP2, LRP3, LRP4, LRP5, LRP6 y LRP8), LR11, y receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Ren *et al.*, *Front Cell Dev Biol.* 6 de mayo de 2021;9:670960).

[00230] Entre las LDLR, LRP5 y LRP6 son únicas en su estructura y función. Por ejemplo, LRP5 y LRP6 pueden también funcionar individualmente como un correceptor de Wnt y otros ligandos al formar un complejo de receptores con otro receptor, tal como otro receptor Wnt (por ejemplo, un receptor *Fzd*), y mediar la señalización.

[00231] LRP5 también puede denominarse BMND1, EVR1, EVR4, HBM, LR3, proteína relacionada con receptores de lipoproteínas de baja densidad 7 (LRP7), OPPG, OPS, OPTA1 o VBCH2. En los seres humanos, LRP5 se codifica mediante el gen *LRP5* en el cromosoma 11, con la ubicación génica 11q13.2 (NCBI, gen ID: 4041). En algunas formas de realización, LRP5 humano puede tener la secuencia de aminoácidos proporcionada como secuencia de referencia NCBI: NP_002326.2 o SEQ ID NO: 5, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares.

[00232] Una o más alteraciones en el gen *LRP5* o una expresión alterada de esta

causa, media y/o exacerba diversas enfermedades y/o fenotipos. Se demostró que una mutación de pérdida de función en *LRP5* causaba osteoporosis con pseudoglioma (OPPG), un síndrome inusual asociado con osteoporosis prematura y generalizada que produce fracturas óseas; la vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR) también se asocia con mutaciones en *LRP5*; *LRP5* regulado de manera ascendente se asocia con enfermedad de la válvula aórtica calcificada (por ejemplo, la expresión de proteínas de matriz ósea en la válvula aórtica y vasculatura en presencia de hipercolesterolemia depende de *LRP5*, y mayores niveles de tinción histológica de *LRP5* y proteína en tejido completo se observaron en muestras de válvula mitral humana degenerativa y válvula aórtica calcificada); se halló expresión génica *LRP5* regulada de manera ascendente en tejido de las caderas y rodillas de pacientes humanos con osteoartritis (OA); y el *LRP5* truncado generado por empalme alternativo de asocia con tumores de las paratiroides y cáncer de mama (Joiner *et al.*, *Trends Endocrinol Metab.* enero de 2013;24(1):31-9). En cáncer colorrectal (CRC), la expresión de *LRP5* en tejido está regulada de manera ascendente y se asocia con estadios clínicos de CRC, y se demostró que *LRP5* promueve rasgos de tipo de células madre cancerosas (Nie *et al.*, *J Cell Mol Med.* febrero de 2022;26(4):1095-1112). Aunque la expresión de *LRP5* en células de osteosarcoma también se asocia con progresión de enfermedad (Hoang *et al.*, *Int J Cancer.* marzo de 2004;109(1):106-11), se demostró que la sobreexpresión de *LRP5* en osteocitos potenciaba los efectos contra el cáncer de mama de los osteocitos en los huesos (Liu *et al.*, *Bone Res.* 6 de julio de 2021;9(1):32).

[00233] De acuerdo con la base de datos OMIM® (<https://www.omim.org/>), las enfermedades genéticas del gen *LRP5* incluyen: vitreorretinopatía exudativa 4 (número MIM de fenotipo 601813, autosómica dominante y autosómica recesiva); hiperostosis, endostosis (número MIM de fenotipo 144750, autosómica dominante); osteopetrosis, autosómica dominante 1 (número MIM de fenotipo 607634, autosómica dominante); síndrome de osteoporosis con pseudoglioma (número MIM de fenotipo 259770, autosómico recesivo); osteosclerosis (número MIM de fenotipo 144750, autosómica dominante); enfermedad hepática poliquística 4 con o sin quistes renales (número MIM de fenotipo 617875, autosómica dominante); enfermedad de van Buchem, tipo 2 (número MIM de fenotipo 607636); variabilidad de densidad mineral ósea 1 (número MIM de fenotipo 601884, autosómica dominante); y osteoporosis (número MIM de fenotipo 166710, autosómica dominante)). De acuerdo con MedlinePlus (NIH, <https://medlineplus.gov/genetics/gene/>), las enfermedades que implican cambios genéticos en el gen *LRP5* incluyen: vitreorretinopatía exudativa familiar; osteoporosis

primaria juvenil; y síndrome de osteoporosis con pseudoglioma.

[00234] LRP6 también puede denominarse ADCAD2 o STHAG7. En los seres humanos, LRP6 se codifica mediante el gen *LRP6* en el cromosoma 12, con la ubicación génica 12p13.2 (NCBI, gen ID: 4040). En algunas formas de realización, LRP6 humano puede tener la secuencia de aminoácidos proporcionada como secuencia de referencia NCBI: NP_002327.2 o SEQ ID NO: 6, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares.

[00235] Una o más alteraciones en el gen *LRP6* o una expresión alterada de esta causa, media y/o exacerba diversas enfermedades y/o fenotipos. Por ejemplo, un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el exón 18 de *LRP6* se asoció con enfermedad de Alzheimer; se observó un enlace causal entre una mutación en *LRP6* (R611C) y coronariopatía temprana; y se descubrió que la expresión génica de LRP6 estaba regulada de manera ascendente en el tejido de las caderas y rodillas en pacientes humanos con osteoartritis (OA) (Joiner *et al.*, *Trends Endocrinol Metab.* enero de 2013;24(1):31-9). Además, LRP6 se encuentra regulado de manera ascendente en y según se informa promueve el crecimiento de diversos tipos de cáncer, que incluyen cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo (TNBC)), leucemia linfocítica crónica primaria (CLL), cáncer de pulmón no microcítico (NSCL), carcinoma de pulmón de células escamosas (LSCC) y carcinoma hepatocelular (HCC) (Li *et al.*, *Oncogene*. 2 de diciembre de 2004;23(56):9129-35; Roslan *et al.*, *J Oncol.* 26 de marzo de 2019;2019:4536302). Se informó que múltiples anticuerpos anti-LRP6 antagonista relacionados inhibían los tumores impulsados por Wnt *in vivo* (Joiner *et al.*, *Trends Endocrinol Metab.* enero de 2013;24(1):31-9).

[00236] De acuerdo con la base de datos OMIM® (<https://www.omim.org/>), las enfermedades genéticas del gen *LRP6* incluyen: agenesia dental, selectiva, 7 (número MIM de fenotipo 616724, autosómica dominante); y coronariopatía, autosómica dominante, 2 (número MIM de fenotipo 610947, autosómica dominante).

[00237] La expresión "nativa" o "tipo silvestre" como se usa en la presente se refiere a una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, gen, o producto génico, por ejemplo, ARN o proteína, que está presente en una célula, tejido, órgano u organismo de tipo silvestre. El término "variante" como se usa en la presente se refiere a un mutante de una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos de referencia, por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos nativa, es decir, que tiene menos de 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos de referencia. En otras palabras, una variante comprende al menos una diferencia de

aminoácido (por ejemplo, sustitución de aminoácido, inserción de aminoácido, eliminación de aminoácido) con respecto a una secuencia de polinucleótidos de referencia, por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos nativa. Por ejemplo, una variante puede ser un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de 50 % o más, 60 % o más o 70 % o más con una secuencia de polinucleótidos nativa de longitud completa, por ejemplo, una identidad de 75 % o 80 % o más, tal como 85 %, 90 % o 95 % o más, por ejemplo, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de polinucleótidos nativa de longitud completa. Como otro ejemplo, una variante puede ser un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de 70 % o más con una secuencia de polipéptidos nativa de longitud completa, por ejemplo, una identidad de 75 % o 80 % o más, tal como 85 %, 90 % o 95 % o más, por ejemplo, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de polipéptidos nativa de longitud completa. Las variantes también pueden incluir fragmentos de variante de una secuencia de referencia, por ejemplo, nativa que comparte una identidad de secuencia de 70 % o más con un fragmento de la secuencia de referencia, por ejemplo, nativa, por ejemplo, una identidad de 75 % o 80 % o más, tal como 85 %, 90 % o 95 % o más, por ejemplo, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia nativa.

[00238] “Norrin” es una proteína secretada con un motivo de nudo de cistina que activa la vía de señalización Wnt/ β -catenina. En los seres humanos, Norrin se codifica mediante el gen *NDP* en el cromosoma X, con la ubicación génica Xp11.3 (NCBI, gen ID: 4693). Norrin también puede denominarse proteína de enfermedad de Norrie, NDP, ND, proteína 2 de vitreorretinopatía exudativa ligada a X, o EVR2. En algunas formas de realización, LRP5 humano puede tener la secuencia de aminoácidos proporcionada como secuencia de referencia NCBI: NP_000257.1 o SEQ ID NO: 3, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares.

[00239] Una o más alteraciones en el gen *NDP* o una expresión alterada de esta causa, media y/o exacerba diversas enfermedades y/o fenotipos. De acuerdo con la base de datos OMIM® (<https://www.omim.org/>), las enfermedades genéticas del gen *NDP* incluyen: vitreorretinopatía exudativa 2, ligada a X (número MIM de fenotipo 305390, ligada a X dominante o ligada a X recesiva); y enfermedad de Norrie (número MIM de fenotipo 310600, ligada a X recesiva). De acuerdo con MedlinePlus (NIH, <https://medlineplus.gov/genetics/gene/>), las enfermedades que implican cambios genéticos en el gen *NDP* incluyen: vitreorretinopatía exudativa familiar; enfermedad de Norrie; y distrofias retinianas.

[00240] Norrin se une a uno o más receptores Wnt, por ejemplo, Fzd4, LRP5 o LRP6 (en general denominados LRP5/6) y TSPAN12, e induce la vía de señalización Wnt canónica, y los efectos corriente abajo de esto incluyen la angiogénesis, por ejemplo, mediante la activación del factor de transcripción Sox17 (Junge *et al.*, *Cell*. 16 de octubre de 2009;139(2):299-311.; y Ye *et al.*, *Cell*. 16 de octubre de 2009;139(2):285-98). Las mutaciones en Fz4, Lrp5, Norrin o TSPAN12 se conocen además por causar hipovascularización retiniana. Además, se informó que el bloqueo de la señalización Wnt mediada por Fzd4 inducida por Norrin produce defectos en la angiogénesis del sistema nervioso central (SNC) y la sangre (Zhang *et al.*, *Nat Commun*. 4 de julio de 2017;8:16050).

[00241] Las expresión "ligado operativamente" se refiere a una yuxtaposición de elementos genéticos, en donde los elementos se encuentran en una relación que les permite funcionar de la manera deseada. Por ejemplo, un promotor está ligado operativamente a una región codificante si el promotor ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia codificante. Pueden existir residuos intervinientes entre el promotor y la región de codificación siempre que se mantenga esta relación funcional.

[00242] Un "portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico" se refiere a un ingrediente en una formulación o composición farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico incluye, entre otros, un amortiguador, excipiente, estabilizante o conservante. En algunas formas de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente y al menos un agente terapéutico adicional.

[00243] Como se usa en la presente, los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se refieren a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se modificó, por ejemplo, para incluir formación de puentes de disulfuro, glicosilación, lipidación, fosforilación o conjugación con un componente de etiquetado.

[00244] La expresión "polinucleótido" o "ácido nucleico" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que incluyen desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de estos. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, y puede estar interrumpido por componentes que no son nucleótidos. De estar presentes, las modificaciones a la estructura del nucleótido puede impartirse antes o después del ensamblaje del polímero. El término polinucleótido, como se usa en la presente, se

refiere de manera indistinta a molécula monocatenarias y bicatenarias. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier forma de realización de la invención descrita en la presente que sea un polinucleótido abarca la forma bicatenaria y cada una de las dos formas monocatenarias complementarias conocidas o previstas para generar la forma bicatenaria.

[00245] Un polinucleótido o polipéptido tiene un determinado porcentaje de "identidad de secuencia" con respecto a otro polinucleótido o polipéptido, lo que significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases o aminoácidos es igual al comparar las dos secuencias. Los términos "idéntico" o "identidad" cuando se usa en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refieren a la cantidad o porcentaje de residuos que son iguales en una secuencia de interés y una secuencia de referencia. El porcentaje se puede calcular al alinear de manera óptima la secuencia de interés con la secuencia de referencia; comparar las dos secuencias con la longitud total de la secuencia de referencia; determinar la cantidad de posiciones en las que aparecen el residuo de aminoácidos o base de ácido nucleico idénticos en ambas secuencias para obtener la cantidad de posiciones coincidentes; dividir la cantidad de posiciones coincidentes por la cantidad total de posiciones en la secuencia de referencia ajustada al agregar la cantidad de posiciones con espacio introducidas en la secuencia de referencia al generar la alineación; y multiplicar el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Al comparar ADN y ARN, timina (T) y uracilo (U) pueden considerarse equivalentes. La identidad de secuencia se puede determinar usando el programa de motor BLAST ejecutable independiente para someter a análisis BLAST dos secuencias (bl2seq), que pueden recuperarse del sitio ftp National Center for Biotechnology Information (NCBI) a través de la web en ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, usando los parámetros predeterminados (Tatusova y Madden, *FEMS Microbiol Lett.*, 1999, 174, 247-250; que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad).

[00246] Un "promotor" como se usa en la presente abarca una secuencia de ADN que dirige la unión de ARN polimerasa y de este modo promueve la síntesis de ARN, es decir, una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción. Los promotores y la correspondiente expresión de proteína o polipéptido pueden ser ubicuos, lo que significa que son altamente activos en una amplia variedad de células, tejidos y especies o específicos de tipo de célula, específicos del tejido o específicos de la especie. Los promotores pueden ser "constitutivos", lo que significa que son continuamente activos, o "inducibles", lo que significa que el promotor puede activarse o desactivarse por la presencia o ausencia de factores bióticos o abióticos. En los constructos o vectores de

ácido nucleico de la invención también se incluyen secuencias potenciadoras que pueden o no ser contiguas a la secuencia promotora. Las secuencias potenciadoras afectan la expresión génica dependiente del y pueden ubicarse en las regiones 5' o 3' del gen nativo.

[00247] El término "recombinante" aplicado a un polinucleótido se refiere a que el polinucleótido es el producto de diversas combinaciones de etapas de clonación, restricción o ligadura y otros procedimientos que producen un constructo que es distinto de un polinucleótido hallado en la naturaleza.

[00248] Las expresiones "tratamiento", "tratar" o similares se usan en la presente para referirse generalmente a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de inhibir o prevenir de manera completa o parcial una enfermedad o síntoma de esta, por ejemplo, reducir la probabilidad de que la enfermedad o síntoma de esta se produzca en el sujeto, y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. El término "tratamiento" como se usa en la presente abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, e incluye: (a) inhibir la enfermedad, es decir, impedir su desarrollo; o (b) aliviar la enfermedad, es decir, generar regresión de la enfermedad. El agente terapéutico puede administrarse antes, durante o después del inicio de la enfermedad o lesión. El tratamiento de enfermedad en curso, en donde el tratamiento estabiliza o reduce los síntomas clínicos no deseados del paciente, es de particular interés. Dicho tratamiento se realiza convenientemente antes de la pérdida completa de función en los tejidos afectados, por ejemplo, los ojos. El tratamiento objeto de la presente se administrará convenientemente durante la etapa sintomática de la enfermedad, y en algunos casos después de la etapa sintomática de la enfermedad.

[00249] Como se usa en la presente, la frase "enfermedad vascular retiniana" es una enfermedad del ojo, en particular, la retina, causada por una formación de vasculatura anómala. En algunos aspectos, la vasculatura anómala se genera por una inhibición del desarrollo de la vasculatura, y en otros aspectos la vasculatura anómala se genera por angiogénesis excesiva.

[00250] Un "vector" es un compuesto o una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede usarse para administrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. En el estado de la técnica se conocen numerosos vectores que incluyen, entre otros, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfifílicos, plásmidos, virus y partículas de tipo

virus (VLP). Por lo tanto, el término "vector" incluye un plásmido de replicación autónoma, un ARN de replicación autónoma o partículas virales. Por lo tanto, el término "vector" abarca vectores de expresión. El término también incluye compuestos no virales y que no son plásmidos que facilitan la transferencia de ácido nucleico en células, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares. Los ejemplos de vectores virales incluyen, entre otros, vectores adenovirales, virus vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales y similares.

[00251] Las "vías de señalización Wnt" comprenden un grupo de vías de transducción de señal que pueden inducirse mediante la unión de un ligando Wnt (también denominado Wnt) u otro ligando a uno o más receptores Wnt. Los ligandos Wnt son una diversa familia de glicoproteínas secretadas, altamente hidrófobas y ricas en cisteína que tienen en general 350–400 aminoácidos de longitud. En los seres humanos, los ligandos Wnt incluyen WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11 y WNT16. Los receptores Wnt son receptores que pueden unirse mediante un ligando Wnt e incluyen receptores de clase frizzled y correceptores, tales como LRP5, LRP6, relacionados con tirosina quinasa (Ryk), y receptor huérfano de tipo receptor tirosina quinasa (ROR).

[00252] Las vías de señalización Wnt regulan procesos celulares normales complejos, tales como diferenciación celular, desarrollo, homeostasis tisular y cicatrización. Cuando la señalización Wnt se regula de manera anómala, se puede asociar con trastornos del desarrollo, oncogénesis y otras enfermedades. Las vías de señalización Wnt primarias incluyen: la vía de señalización Wnt canónica (también denominada la vía de señalización Wnt/ β -catenina); la vía Wnt/polaridad celular planar (PCP); y la vía Wnt/ Ca^{2+} (Sharma y Pruitt. *Int J Mol Sci.* 28 de octubre de 2020;21(21):8018). Estas vías se describen a continuación.

[00253] "Vía de señalización Wnt canónica": En ausencia de un ligando Wnt, la β -catenina citoplasmática generalmente forma un complejo (en general denominado "complejo de destrucción") con Axin y poliposis adenomatosa coli (APC) y se fosforila mediante caseína quinasa 1 (CK1) y glicogen sintasa quinasa 3 (GSK3). La β -catenina fosforilada se reconoce por medio de la E3 ubiquitina ligasa β -Trcp, que actúa sobre β -catenina para la degradación proteosómica, y por lo tanto no ingresa al núcleo. En presencia de un ligando Wnt, un Fzd y un LRP (por ejemplo, LRP5 o LRP6), una vez unidos por medio de un ligando Wnt, forman un complejo de receptores, que se fosforila mediante CK1 y GSK3. Esto genera la unión de Axin a la cola citoplasmática de LRP y

la unión de Dishevelled (DVL) a la cola citoplasmática de Fzd, lo que altera el complejo de destrucción, y permite que la β -catenina citoplasmática ingrese al núcleo. En el núcleo, la β -catenina genera activación transcripcional directa e indirecta, por ejemplo, mediante la unión como coactivador a factores de transcripción de la familia TCF/LEF (Wiese *et al.*, *Development*. 26 de junio de 2018;145(12):dev165902.; Sharma y Pruitt. *Int J Mol Sci*. 28 de octubre de 2020;21(21):8018; Ren *et al.*, *Front Cell Dev Biol*. 6 de mayo de 2021;9:670960). La vía de señalización Wnt canónica también puede iniciar por medio de la unión de un ligando no Wnt a uno o más receptores Wnt, por ejemplo, mediante la unión de Norrin (NDP) a Fzd4, LRP5 o LRP6 (en general denominados LRP5/6) y TSPAN12 (Junge *et al.*, *Cell*. 16 de octubre de 2009;139(2):299-311.; y Ye *et al.*, *Cell*. 16 de octubre de 2009;139(2):285-98).

[00254] “Vía Wnt/polaridad celular planar (PCP)”: Un Fzd y un correceptor (por ejemplo, ROR1 o ROR2), una vez unidos por medio de un ligando Wnt, forman un complejo de receptores y reclutan DVL a la membrana plasmática. DVL interactúa con GTPasas pequeñas, tales como RHO y RAC, para desencadenar adicionalmente la activación de ROCK y/o JNK. Esto produce la activación de redistribuciones del citoesqueleto mediante respuestas transcripcionales que activan factores de transcripción, tales como JUN y ATF2 (Sharma y Pruitt. *Int J Mol Sci*. 28 de octubre de 2020;21(21):8018).

[00255] “Vía Wnt/Ca²⁺”: Un Fzd y un correceptor (por ejemplo, ROR1 o ROR2), una vez unidos por medio de un ligando Wnt, forman un complejo de receptores y activan fosfolipasa C (PLC), lo que produce afluencia de Ca²⁺ intracelular. Esto activa adicionalmente CDC42 y desencadena movimiento celular dependiente de Ca²⁺ y polaridad mediante diversos factores transcripcionales, tal como NFAT (Sharma y Pruitt. *Int J Mol Sci*. 28 de octubre de 2020;21(21):8018).

[00256] En la práctica de la presente invención se usarán, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, técnicas de biología molecular, microbiología, bioquímica e inmunología, que se encuentran dentro del alcance de las personas del oficio de nivel medio. Dichas técnicas se explican en su totalidad en la literatura, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2.^a edición (Sambrook *et al.*, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology" (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987); "PCR: The Polymerase Chain

Reaction", (Mullis *et al.*, eds., 1994); y "Current Protocols in Immunology" (J. E. Coligan *et al.*, eds., 1991), que se incorporan expresamente en la presente por referencia.

[00257] Diversos aspectos de la invención se describen a continuación en referencia a las aplicaciones de ejemplo por fines ilustrativos. Cabe destacar que numerosos detalles, relaciones y métodos específicos se exponen para proporcionar una comprensión completa de la invención. No obstante, una persona del oficio de nivel medio reconocerá con facilidad que la invención puede ponerse en práctica sin uno o más de los detalles específicos o con otros métodos. La presente invención no se limita al orden ilustrado de actos o eventos, dado que algunos actos pueden producirse en diferente orden y/o de manera concurrente con otros actos o eventos. Además, no todos los actos o eventos ilustrados son necesarios para implementar una metodología de acuerdo con la presente invención.

[00258] Las expresiones "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con" o variantes de estas se usan en la descripción detallada y/o las reivindicaciones, tales expresiones son inclusivas de manera similar a la expresión "que comprende".

[00259] Todas las publicaciones mencionadas en la presente se incorporan en la presente por referencia para divulgar y describir los métodos y/o materiales en conexión con los que se citan las publicaciones. Cabe destacar que la presente divulgación supera cualquier divulgación de una publicación incorporada hasta que exista una contradicción.

[00260] Además, cabe destacar que la redacción de las reivindicaciones puede excluir cualquier elemento opcional. Como tal, este enunciado sirve como antecedente base para el uso de terminología exclusiva de este tipo, como "solamente", "solo" y similares, en conexión con la mención de los elementos reivindicados, o el uso de una limitación "negativa".

[00261] A menos que se indique lo contrario, todos los términos usados en la presente tienen el mismo significado que entiende una persona del oficio de nivel medio, y en la práctica de la presente invención se usarán técnicas convencionales de microbiología y tecnología de ADN recombinante que se encuentran dentro del conocimiento de la persona del oficio de nivel medio.

II. General.

[00262] La presente divulgación proporciona moduladores de señal Wnt y métodos de uso de estos para tratar enfermedades, trastornos y afecciones, por ejemplo, que implican señalización Wnt anómala, tales como, entre otros, diversos trastornos oculares, que incluyen métodos para modular señales Wnt para tratar

retinopatía, que incluye, entre otros, FEVR y otros trastornos genéticos, DR y AMD. En formas de realización particulares, la presente invención proporciona agonistas de Wnt/b-catenina para inhibir la neovascularización anómala en la progresión de retinopatía.

[00263] Los ligandos Wnt (“sitio de integración relacionado con Wingless” o “Wingless y Int-1” o “Wingless-Int”) y sus señales tienen funciones clave en el control del desarrollo, homeostasis y regeneración de muchos órganos y tejidos esenciales, que incluyen hueso, hígado, piel, estómago, intestino, riñón, sistema nervioso central, glándula mamaria, papila gustativa, ovario, cóclea, pulmón y muchos otros tejidos (reseñados, por ejemplo, en Clevers, Loh y Nusse, *Science* 2014; 346:1248012). La modulación de las vías de señalización Wnt tiene un potencial para el tratamiento de enfermedades degenerativas y lesiones tisulares.

[00264] Uno de los desafíos para la modulación de la señalización Wnt como un tratamiento es la existencia de múltiples ligandos Wnt y receptores Wnt, Frizzled 1-10 (Fzd1-10), en donde muchos tejidos expresan múltiples Fzd superpuestos. Las señales Wnt canónicas también implican proteína 5 relacionada con receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (LRP5) o proteína 6 relacionada con receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (LRP6) como correceptores, que se encuentran ampliamente expresados en diversos tejidos, además de Fzd.

[00265] Las R-espondinas 1-4 son una familia de ligandos que amplifican las señales Wnt. Cada una de las R-espondinas funciona a través de un complejo de receptores que contiene dedos de zinc y Ring 3 (ZNRF3) o proteína de dedo Ring 43 (RNF43) en un extremo y una proteína G que contiene repetición rica en leucina acoplada al receptor 4-6 (LGR4-6) en el otro (reseñado, por ejemplo, en Knight y Hankenson 2014, *Matrix Biology*; 37: 157-161). Las R-espondinas pueden también funcionar a través de mecanismos de acción adicionales. ZNRF3 y RNF43 son dos ligasas E3 unidas a membrana que actúan específicamente sobre receptores Wnt (Fzd1-10 y LRP5 o LRP6) para la degradación. La unión de una R-espondina a ZNRF3/RNF43 y LGR4-6 genera la depuración o secuestro del complejo ternario, lo que elimina las ligasas E3 de los receptores Wnt y estabiliza los receptores Wnt, lo que produce señales Wnt potenciadas. Cada R-espondina contiene dos dominios de furina (1 y 2), en donde el dominio de furina 1 se une a ZNRF3/RNF43, y el dominio de furina 2 se une a LGR4-6. Los fragmentos de R-espondinas que contienen dominios de furina 1 y 2 son suficientes para amplificar la señalización Wnt. Aunque los efectos de la R-espondina dependen de las señales Wnt, dado que LGR4-6 y ZNRF3/RNF43 se

encuentran ampliamente expresados en diversos tejidos, los efectos de las R-espondinas no son específicos del tejido.

[00266] En algunas formas de realización, el agonista Wnt/b-catenina (o agonista de señalización Wnt) comprende un anticuerpo, fragmento de anticuerpo y/o dominio de anticuerpo que se une a uno o más Fzd y un dominio de anticuerpo que se une a LRP5 y/o Lrp6. En algunas formas de realización, el dominio de anticuerpo preferentemente se une a Fzd4 en comparación con otros Fzd. En algunas formas de realización, un dominio de unión a Fzd preferentemente se une a uno o más Fzd, en donde este se une a los Fzd con una K_D al menos 10 veces menor que la K_D con la que se une a otros Fzd. En algunas formas de realización, un dominio de unión a Fzd preferentemente se une a uno o más Fzd, en donde este se une a los Fzd con una K_D al menos 100 veces menor que la K_D con la que se une a otros Fzd. En algunas formas de realización, un dominio de unión a Fzd preferentemente se une a uno o más Fzd, en donde este se une a los Fzd con una K_D al menos 1000 veces menor que la K_D con la que se une a otros Fzd. En algunas formas de realización, los dominios de anticuerpo comprenden las correspondientes CDR presentes en el agonista de señalización Wnt divulgado en la presente, por ejemplo, hp4SD1-03, o comprende un fragmento o variante de hp4SD1-03, por ejemplo, una región variable de la cadena pesada o variable de la cadena liviana. Los ejemplos no limitativos de secuencias pueden hallarse en el **APÉNDICE, Tablas A-J**.

[00267] En algunas formas de realización, el agonista Wnt/b-catenina comprende una estructura de tipo anticuerpo IgG que comprende dos cadenas livianas de anticuerpo y dos cadenas pesadas de anticuerpo, y que comprende además dos dominios VHH fusionadas a cualquier cadena del anticuerpo (*ver*, por ejemplo, **Figuras 24-25**). En formas de realización particulares, un dominio VHH se fusiona con el extremo N de cada cadena liviana de anticuerpo (*ver*, por ejemplo, **Figura 24**). En formas de realización particulares, las cadenas pesada y liviana del anticuerpo se unen a uno o más Fzd, o preferentemente se unen a Fzd4, y los dominios VHH se unen a LRP5 y/o LRP6. En algunas formas de realización, el dominio VHH preferentemente se une a LRP5 en comparación con LRP6. En algunas formas de realización, un dominio de unión a LRP5/6 preferentemente se une a LRP5 o LRP6, en donde este se une a esa LRP con una K_D al menos 100 veces menor que la K_D con la que se une a otra LRP. En algunas formas de realización, un dominio de unión a LRP5/6 preferentemente se une a LRP5 o LRP6, en donde este se une a esa LRP con una K_D al menos 1000 veces menor que la K_D con la que se une a la otra LRP.

[00268] En formas de realización relacionadas, el agonista Wnt/b-catenina puede adoptar una estructura de unión biespecífica diferente, que incluye, entre otras, cualquiera divulgada en la presente (que incluye, entre otras, las estructuras ilustradas en las **Figuras 24-34**). Como se conoce en el estado de la técnica, un anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un dominio de unión al epítipo, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente, el término abarca no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de estos que contienen dominios de unión al epítipo (por ejemplo, dAb, Fab, Fab', (F(ab')₂, Fv, monocatenarios (scFv), VHH o anticuerpos de dominio único (sdAb), DVD-Ig, variantes sintéticas de estos, variantes naturales, proteínas de fusión que comprenden y dominio de unión al epítipo, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de unión al antígeno o fragmento (sitio de reconocimiento de epítipo) de la especificidad requerida. Los "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos mediante fusión génica (WO94/13804; P. Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448, 1993), también son una forma particular de anticuerpo contemplada en la presente. Los minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 también se incluyen en la presente (S. Hu *et al.*, *Cancer Res.*, 56, 3055-3061, 1996). Ver, por ejemplo, Ward, E. S. *et al.*, *Nature* 341, 544-546 (1989); Bird *et al.*, *Science*, 242, 423-426, 1988; Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5879-5883, 1988); PCT/US92/09965; WO94/13804; P. Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448, 1993; Y. Reiter *et al.*, *Nature Biotech*, 14, 1239-1245, 1996; S. Hu *et al.*, *Cancer Res.*, 56, 3055-3061, 1996.

[00269] La enzima proteolítica papaína preferentemente escinde moléculas de IgG para proporcionar varios fragmentos, en donde dos (los fragmentos F(ab)) comprenden un heterodímero covalente que incluye un sitio de unión al antígeno intacto. La enzima pepsina es capaz de escindir moléculas de IgG para proporcionar varios fragmentos, que incluyen el fragmento F(ab')₂ que comprende ambos sitios de unión al antígeno. Un fragmento Fv para su uso de acuerdo con algunas formas de realización de la presente divulgación puede producirse mediante escisión proteolítica preferencial de una IgM, y en pocas ocasiones una molécula de inmunoglobulina IgG o IgA. No obstante, en general los fragmentos Fv se derivan usando técnicas recombinantes conocidas en el estado de la técnica. El fragmento Fv incluye un heterodímero no

covalente VH:VL que incluye un sitio de unión al antígeno que retiene gran parte de la capacidad de reconocimiento de antígeno y unión de la molécula de anticuerpo nativa. Inbar *et al.* (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2659-2662; Hochman *et al.* (1976) *Biochem* 15:2706-2710; y Ehrlich *et al.* (1980) *Biochem* 19:4091-4096.

[00270] En algunas formas de realización, se incluyen anticuerpos Fv monocatenarios o scFv. Por ejemplo, los cuerpos Kappa (Ill *et al.*, *Prot. Eng.* 10: 949-57 (1997)); minicuerpos (Martin *et al.*, *EMBO J* 13: 5305-9 (1994)); diacuerpos (Holliger *et al.*, *PNAS* 90: 6444-8 (1993)); o janusinas (Traunecker *et al.*, *EMBO J* 10: 3655-59 (1991) y Traunecker *et al.*, *Int. J. Cancer Suppl.* 7: 51-52 (1992)) pueden prepararse usando técnicas de biología molecular estándar de acuerdo con las enseñanzas de la presente solicitud con respecto a la selección de anticuerpos que tienen la especificidad deseada. En otras formas de realización, se pueden elaborar anticuerpos biespecíficos o quiméricos que abarcan los ligandos de la presente divulgación. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender CDR y regiones estructurales de diferentes anticuerpos, aunque es posible generar anticuerpos biespecíficos que se unan específicamente a uno o más receptores Fzd a través de un dominio de unión y una segunda molécula a través de un segundo dominio de unión. Estos anticuerpos pueden producirse a través de técnicas de biología molecular recombinantes o pueden conjugarse físicamente entre sí. Un polipéptido Fv monocatenario (scFv) es un heterodímero VH:VL ligado de manera covalente que se expresa desde una fusión génica que incluye genes que codifican VH y VL por medio de un ligador que codifica péptidos. Los ejemplos de ligadores que pueden usarse para conectar VH y VL en scFv puede comprender un ligador flexible. En algunas formas de realización, el ligador puede comprender uno o más aminoácidos, opcionalmente entre 1-50 aminoácidos, tales como uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve o veinte aminoácidos. En algunas formas de realización, el ligador puede consistir en aminoácidos pequeños que consisten en G, S y/o A. En algunas formas de realización, el ligador puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, G, GG, GGG, GS, SG, GGS, GSG, SGG, GSS, SGS y SSG. En algunas formas de realización, el ligador puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en múltiples repeticiones (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco repeticiones) de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO:

103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, G, GG, GGG, GS, SG, GGS, GSG, SGG, GSS, SGS y SSG. En algunas formas de realización, el ligador puede comprender tres o cuatro repeticiones de SEQ ID NO: 101, que opcionalmente pueden denominarse ligador (G4S)₃ y ligador (G4S)₄, respectivamente. Huston *et al.* (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85(16):5879-5883. Se describieron numerosos métodos para distinguir las estructuras químicas para convertir las cadenas de polipéptidos livianas y pesadas naturalmente agregadas, aunque químicamente separadas, de una región V de anticuerpo en una molécula scFv que se plegarán en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión al antígeno. Ver, por ejemplo, patente estadounidense N.º 5.091.513 y 5.132.405, de Huston *et al.*; y patente estadounidense N.º 4.946.778, de Ladner *et al.*

[00271] En algunas formas de realización, un anticuerpo descrito en la presente se encuentra en forma de un diacuerpo. Los diacuerpos son multímeros de polipéptidos, en donde cada polipéptido comprende un primer dominio que comprende una región de unión de una cadena liviana de inmunoglobulina y un segundo dominio que comprende una región de unión de una cadena pesada de inmunoglobulina, en donde los dos dominios se encuentran unidos (por ejemplo, por medio de un péptido ligador) pero no son capaces de asociarse entre sí para formar un sitio de unión al antígeno: los sitios de unión al antígeno se forman por medio de la asociación del primer dominio de un polipéptido dentro del multímero con el segundo dominio de otro polipéptido dentro del multímero (WO94/13804).

[00272] Un fragmento dAb de un anticuerpo consiste en un dominio VH (Ward, E. S. *et al.*, *Nature* 341, 544-546 (1989)).

[00273] Cuando se usan anticuerpos biespecíficos, estos pueden comprender anticuerpos biespecíficos convencionales, que se pueden elaborar mediante diversos métodos conocidos, por ejemplo, como se describe en (Holliger, P. y Winter G., *Current Opinion Biotechnol.* 4, 446-449 (1993)), o se pueden preparar químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o estos pueden comprender cualquiera de los fragmentos de anticuerpo biespecífico mencionados anteriormente. Los diacuerpos y scFv pueden construirse sin una región Fc, usando solo dominios variables, para potencialmente reducir los efectos de reacción antiidiotípica.

[00274] Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos completos biespecíficos, pueden ser particularmente útiles en parte debido a que pueden construirse con facilidad y expresarse en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos, tales como fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión

adecuadas pueden seleccionarse con facilidad usando expresión en fago (ver, por ejemplo, WO94/13804) de colecciones. Si un brazo del diacuerpo se mantendrá constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra antígeno X, entonces es posible elaborar una colección en donde el otro brazo varía y se selecciona un anticuerpo de especificidad adecuada. Los anticuerpos completos biespecíficos pueden elaborarse mediante ingeniería genética de botones en ojales (J. B. B. Ridgeway *et al.*, *proteína Eng.*, 9, 616-621 (1996)).

[00275] En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente pueden proporcionarse en forma de un UniBody®. Un UniBody® es un anticuerpo IgG4 con la región bisagra eliminada (ver GenMab Utrecht, Países Bajos; ver también, por ejemplo, US20090226421). Esta tecnología de anticuerpos registrada crea un formato de anticuerpo más pequeño y estable con un mayor intervalo terapéutico previsto que los formatos de anticuerpo pequeños actuales. Los anticuerpos IgG4 se consideran inertes y, por lo tanto, no interactúan con el sistema inmunitario. Los anticuerpos IgG4 totalmente humanos pueden modificarse al eliminar la región bisagra del anticuerpo para obtener fragmentos de media molécula que tienen propiedades de estabilidad distintas con respecto a la IgG4 intacta correspondiente (GenMab, Utrecht). La división por la mitad de la molécula de IgG4 deja que solo un área en el UniBody® pueda unirse a los antígenos cognados (por ejemplo, dianas de enfermedad) y, por lo tanto, el UniBody® se une de manera univalente a solo un sitio en las células diana.

[00276] En algunas formas de realización, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos como se describe en la presente incluyen un conjunto de CDR de cadena pesada y de cadena liviana, respectivamente interpuestos entre un conjunto de región estructural (FR) de cadena pesada y de cadena liviana que proporciona soporte para las CDR y define la relación espacial de las CDR entre sí. Como se usa en la presente, la expresión "conjunto de CDR" se refiere a las tres regiones hipervariables de una región V de la cadena pesada o liviana. A partir del extremo N de una cadena pesada o liviana, estas regiones se denominan "CDR1", "CDR2" y "CDR3", respectivamente. Por lo tanto, un sitio de unión al antígeno incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada región V de las cadenas pesada y liviana. Un polipéptido que comprende una única CDR, (por ejemplo, CDR1, CDR2 o CDR3) se denomina en la presente "unidad de reconocimiento molecular". El análisis cristalográfico de numerosos complejos de antígeno-anticuerpo demostró que los residuos de aminoácidos de CDR forman un contacto extenso con el antígeno unido, en donde el contacto con el antígeno más extenso es con la CDR de cadena pesada. Por

lo tanto, las unidades de reconocimiento molecular son principalmente responsables de la especificidad de un sitio de unión al antígeno.

[00277] Como se usa en la presente, la expresión "conjunto de FR" se refiere a las cuatro secuencias de aminoácidos flanqueantes que enmarcan las CDR de un conjunto de CDR de una región V de la cadena pesada o liviana. Algunos residuos FR pueden contactar al antígeno unido; no obstante, las FR son principalmente responsables del plegamiento de la región V en el sitio de unión al antígeno, en particular, los residuos FR directamente adyacentes a las CDR. Dentro de las FR, algunos residuos de aminoácidos y algunas características estructuras tienen conservación muy alta. En este sentido, todas las secuencias de región V contienen un bucle disulfuro interno de alrededor de 90 residuos de aminoácidos. Cuando las regiones V se pliegan en un sitio de unión, las CDR se muestran como motivos de bucle en proyección que forman una superficie de unión al antígeno. Por lo general se reconoce que existen regiones estructurales conservadas de las FR que afectan la forma plegada de los bucles CDR en determinadas estructuras "canónicas", independientemente de la secuencia de aminoácidos CDR exacta. Además, se conoce que algunos residuos FR participan en contactos interdominio no covalentes que estabilizan la interacción de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo.

[00278] Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogéneos (en donde los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y se unen al mismo epítipo, excepto por potenciales anticuerpos variantes (por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpo monoclonal), en donde tales variantes generalmente están presentes en cantidades menores), en donde el anticuerpo monoclonal comprende aminoácidos (naturales y no naturales) que participan en la unión selectiva de un epítipo. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un solo epítipo. La expresión "anticuerpo monoclonal" abarca no solo anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de estos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), monocatenarios (scFv), Nanobodies®, variantes de estos, proteínas de fusión que comprenden un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal, anticuerpos humanizados monoclonales, anticuerpos quiméricos monoclonales, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un fragmento de unión al antígeno (sitio de reconocimiento de epítipo) de la especificidad requerida y la capacidad para unirse a un epítipo, que incluye moléculas sustitutas Wnt divulgadas en

la presente. No está limitada con respecto a la fuente del anticuerpo o la manera en que este se elabora (por ejemplo, mediante hibridoma, selección de fago, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.). La expresión incluye inmunoglobulinas completas así como los fragmentos, etc., descritos a continuación en la definición de "anticuerpo".

[00279] En algunas formas de realización, los anticuerpos de la presente divulgación pueden tomar la forma de un Nanobody®. La tecnología de Nanobody® se desarrolló originalmente luego del descubrimiento y la identificación de que *Camelidae* (por ejemplo, camellos y llamas) posee anticuerpos totalmente funcionales que consisten solo en cadenas pesadas y, por lo tanto, carecen de cadenas livianas. Estos anticuerpos de cadena pesada solamente contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (CH2, CH3). Los dominios variables únicos clonados y aislados tienen una capacidad de unión al antígeno completa y son muy estables. Estos dominios variables únicos, con sus propiedades estructurales y funcionales únicas, forman la base de los "Nanobodies®". Los Nanobodies® están codificados por genes únicos y se producen eficazmente en casi todos los huéspedes procariotas y eucariotas, por ejemplo, *E. coli* (ver, por ejemplo, patente estadounidense N.º 6.765.087), moho (por ejemplo *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levaduras (por ejemplo *Saccharomyces*, *Kluyvermyces*, *Hansenula* o *Pichia* (ver, por ejemplo, patente estadounidense N.º 6.838.254). El proceso de producción es ajustable a escala y se produjeron cantidades de múltiples kilogramos de Nanobodies®. Los Nanobodies® pueden formularse como una solución lista para usar que tiene una vida útil extensa. El método Nanoclone® (ver, por ejemplo, WO 06/079372) es un método registrado para generar Nanobodies® contra una diana deseada, con base en selección automática de alto rendimiento de linfocitos B. Los Nanobodies® son fragmentos de unión al antígeno de dominio único de anticuerpos de cadena pesada solamente específicos para camélidos. Nanobodies®, también denominados anticuerpos VHH, en general tienen un tamaño pequeño de alrededor de 15 kDa.

[00280] Otro fragmento de anticuerpo contemplado es una inmunoglobulina de dominio variable dual (DVD-Ig) que es una proteína modificada por ingeniería genética que combina la función y especificidad de dos anticuerpos monoclonales en una entidad molecular. Una DVD-Ig se diseña como una molécula de tipo IgG, excepto por que cada cadena liviana y cadena pesada contiene dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico, en lugar de un dominio variable en IgG. La orientación de fusión de los dos dominios variables y la elección de la secuencia ligadora resultan cruciales para

la actividad funcional y la expresión eficaz de la molécula. Una DVD-Ig puede producirse mediante sistemas de expresión de mamífero convencionales como especies únicas para la elaboración y purificación. Una DVD-Ig tiene la especificidad de los anticuerpos de origen, es estable *in vivo* y presenta propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de tipo IgG. Las DVD-Ig y los métodos para elaborarlas se describen en Wu, C., *et al.*, *Nature Biotechnology*, 25:1290-1297 (2007)). La estructura de DVD-Ig puede aplicarse a casos en donde al menos una de las regiones de unión al antígeno comprende un dominio VHH (por ejemplo, ver **Figura 26** (por ejemplo, derecha superior)).

[00281] En algunas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos divulgados en la presente son humanizados. Esto se refiere a una molécula quimérica, generalmente preparada usando técnicas recombinantes, que tienen un sitio de unión al antígeno (es decir, el conjunto completo de CDR) que deriva de una inmunoglobulina de una especie no humana y la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula con base en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. En algunos casos, por ejemplo, cuando las secuencias de FR derivadas de una especie no humana coinciden o coinciden mayormente con secuencias de FR humanas correspondientes, un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo de unión al antígeno puede comprender dominios variables completos derivados de una especie no humana fusionada en dominios constantes. En algunos casos, por ejemplo, cuando las secuencias de FR derivadas de una especie no humana difieren o difieren significativamente de secuencias de FR humanas correspondientes, un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo de unión al antígeno puede comprender CDR derivadas de una especie no humana injertadas en regiones estructurales adecuadas en los dominios variables fusionados en dominios constantes. En algunos casos, los residuos adecuados en las FR se sustituyen con el residuo humano correspondiente o un residuo similar a este (por ejemplo, un aminoácido conservador). En algunos casos, algunos residuos en CDR también pueden sustituirse con el residuo humano correspondiente o un residuo similar a este (por ejemplo, un aminoácido conservador). Los sitios de unión al epítipo pueden ser de tipo silvestre o estar modificados por una o más sustituciones de aminoácido. Esto elimina la región constante como un inmunógeno en individuos humanos, pero la posibilidad de una respuesta inmunitaria a la región variable externa se mantiene (LoBuglio, A. F. *et al.*, (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4220-4224; Queen *et al.*, *PNAS* (1988) 86:10029-10033; Riechmann *et al.*, *Nature* (1988) 332:323-327). Los métodos ilustrativos para la humanización de los anticuerpos anti-Fzd o LRP divulgados en la presente incluyen los métodos descritos en la patente

estadounidense N.º 7.462.697 y otros métodos de humanización conocidos.

[00282] Dichas modificaciones adicionales a las CDR pueden ser para remodelarlas hasta una forma lo más humana posible. Se conoce que las regiones variables de ambas cadenas pesada y liviana contienen tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que pueden variar en la respuesta a los epítomos en cuestión y determinan la capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones estructurales (FR) que se encuentran relativamente conservadas en determinadas especies y que presuntamente proporciona una estructura para las CDR. Cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un epítomo en particular, las regiones variables pueden "remodelarse" o "humanizarse" al injertar CDR derivadas de anticuerpo no humano en las FR presentes en el anticuerpo humano que se desea modificar. La aplicación de este enfoque a diversos anticuerpos fue informada por Sato, K., *et al.*, (1993) *Cancer Res* 53:851-856; Riechmann, L., *et al.*, (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M., *et al.*, (1988) *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C. A., *et al.*, (1991) *Protein Engineering* 4:773-3783; Maeda, H., *et al.*, (1991) *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D., *et al.*, (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4181-4185; Tempest, P. R., *et al.*, (1991) *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M. S., *et al.*, (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2869-2873; Carter, P., *et al.*, (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4285-4289; y Co, M. S. *et al.*, (1992) *J Immunol* 148:1149-1154. En algunas formas de realización, los anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR de los anticuerpos de ratón). En otras formas de realización, los anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que se encuentran alteradas con respecto al original, también denominadas una o más CDR "derivadas de" una o más CDR del anticuerpo original.

[00283] En algunas formas de realización, los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser anticuerpos quiméricos. En este sentido, un anticuerpo quimérico comprende un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo ligado operativamente o de otro modo fusionado a una constante heteróloga o porción Fc de un anticuerpo diferente. En algunas formas de realización, el dominio heterólogo Fc es de origen humano. En otras formas de realización, el dominio Fc heterólogo puede ser de una clase de Ig diferente a la del anticuerpo de origen, que incluye IgA (que incluye las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (que incluye las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e IgM. En otras formas de realización, el dominio Fc heterólogo puede comprender dominios CH2 y CH3 de una o más de las diferentes clases de Ig. Como se indicó

anteriormente con respecto a anticuerpos humanizados, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo quimérico puede comprender solo una o más de las CDR de los anticuerpos descritos en la presente (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR de los anticuerpos descritos en la presente), o puede comprender un dominio variable completo (VL, VH o ambos).

[00284] En algunas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación comprenden una región Fc.

[00285] Se conoce que algunas modificaciones de aminoácido en la región Fc modulan las funciones efectoras de Ab y las propiedades, tales como, entre otras, citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y semivida (Wang X. *et al.*, *Protein Cell.* enero de 2018; 9(1): 63–73; Dall'Acqua W. F. *et al.*, *J Biol Chem.* 18 de agosto de 2006;281(33):23514–24. Epub, 21 de junio de 2006; Monnet C. *et al.*, *Front Immunol.* 4 de febrero de 2015;6:39. doi: 10.3389/fimmu.2015.00039. eCollection 2015). La mutación puede ser simétrica o asimétrica. En algunos casos, los anticuerpos con regiones Fc que tienen mutaciones asimétricas (es decir, dos regiones Fc no son idénticas) pueden proporcionar mejores funciones, tales como ADCC (Liu Z. *et al.* *J Biol Chem.* 7 de febrero de 2014; 289(6): 3571–3590).

[00286] En algunas formas de realización, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tal como un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación, puede comprender una región Fc que comprende una o más sustituciones de aminoácido que reducen o mitigan una función efectora en comparación con la correspondiente región Fc de tipo silvestre (también denominadas “mutaciones de silenciamiento de Fc o sustituciones). En algunas formas de realización, una región Fc puede comprender una o más sustituciones de aminoácido en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 234, 235, 236, 237, 265, 297 y 329, de acuerdo con la numeración EU. En algunas formas de realización, una región Fc puede comprender L234A, L235A y P329G, de acuerdo con la numeración EU (también denominada “LALAPG” en la presente). En algunas formas de realización, una región Fc puede comprender L234A y L235A, de acuerdo con la numeración EU (también denominada “LALA” en la presente). En algunas formas de realización, una región Fc puede comprender D265A y P329A, de acuerdo con la numeración EU (también denominada “DAPA” en la presente). En algunas formas de realización, una región Fc puede comprender N297A, de acuerdo con la numeración EU.

[00287] En algunas formas de realización, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tal como un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación, puede comprender una región Fc que comprende una o más sustituciones de aminoácido que reducen la semivida del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en comparación con la correspondiente región Fc de tipo silvestre. En algunas formas de realización, una región Fc puede comprender I253A, H310A y H435Q, de acuerdo con la numeración EU (también denominada “IAHAHQ” o “AAQ” en la presente). En algunas formas de realización, una región Fc puede comprender I253A, H310A y H435A, de acuerdo con la numeración EU (también denominada “IAHAHA” o “AAA” en la presente).

[00288] En algunas formas de realización, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tal como un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación, puede comprender una región Fc que comprende una o más sustituciones de aminoácido que aumentan la unión a FcRn y/o aumentan la semivida del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en comparación con la correspondiente región Fc de tipo silvestre. En algunas formas de realización, una región Fc puede comprender M252Y, S254T y T256E, de acuerdo con la numeración EU (también denominada “YTE” en la presente). En algunas formas de realización, una región Fc puede comprender M428L y N434S, de acuerdo con la numeración EU (también denominada “LS” en la presente).

[00289] En algunas formas de realización, si un anticuerpo comprende una región Fc de o derivada de IgG1, la región Fc puede comprender una o más sustituciones de aminoácido. La sustitución puede ser, por ejemplo, N297A, N297Q, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, G236-deleted, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, P331S, F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L, S239D, I332E, S298A, E333A, K334A, L234Y, L235Q, G236W, S239M, H268D, D270E, K326D, A330M, K334E, G236A, K326W, S239D, E333S, S267E, H268F, S324T, E345R, E430G, S440Y, M428L, N434S, L328F, M252Y, S254T, T256E, y/o cualquier combinación de estos (la numeración de residuos está de acuerdo con la numeración EU) (Dall'Acqua W. F. *et al.*, *J Biol Chem.* 18 de agosto de 2006;281(33):23514-24. Epub, 21 de junio de 2006; Wang X. *et al.*, *Protein Cell.* enero de 2018; 9(1): 63–73). La región Fc puede comprender además una o más sustituciones de aminoácido adicionales. La sustitución puede ser, por ejemplo, A330L, L234F, L235E, P331S, y/o cualquier combinación de estos (la numeración de residuos está de acuerdo con la numeración EU).

[00290] En algunas formas de realización, si un anticuerpo comprende una región Fc de o derivada de IgG2, la región Fc puede comprender una o más sustituciones de aminoácido. La sustitución puede ser, por ejemplo, P238S, V234A, G237A, H268A, H268Q, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E, y/o cualquier combinación de estos (la numeración de residuos está de acuerdo con la numeración EU). La región Fc puede comprender además una o más sustituciones de aminoácido adicionales. La sustitución puede ser, por ejemplo, M252Y, S254T, T256E, y/o cualquier combinación de estos (la numeración de residuos está de acuerdo con la numeración EU).

[00291] En algunas formas de realización, si un anticuerpo comprende una región Fc de o derivada de IgG3, la región Fc puede comprender una o más sustituciones de aminoácido. La sustitución puede ser, por ejemplo, E235Y (la numeración de residuos está de acuerdo con la numeración EU).

[00292] En algunas formas de realización, si un anticuerpo comprende una región Fc de o derivada de IgG4, la región Fc puede comprender una o más sustituciones de aminoácido. La sustitución puede ser, por ejemplo, E233P, F234V, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q, y/o cualquier combinación de estos (la numeración de residuos está de acuerdo con la numeración EU). La sustitución puede ser, por ejemplo, S228P (la numeración de residuos está de acuerdo con la numeración EU).

[00293] En algunas formas de realización, el glicano de la región Fc humana puede modificarse por ingeniería genética para modificar la función efectora (por ejemplo, ver Li T. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 28 de marzo de 2017;114(13):3485-3490. doi: 10.1073/pnas.1702173114. Epub, 13 de marzo de 2017).

[00294] En algunas formas de realización, las estructuras y ubicaciones de las CDR de inmunoglobulina y dominios variables pueden determinarse en referencia a Kabat, E. A. *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4.^a edición. US Department of Health and Human Services. 1987, y sus actualizaciones, disponibles en la actualidad en internet (immuno.bme.nwu.edu).

[00295] En algunas formas de realización, el agente de unión a antagonista o agonista se une a uno o más Fzd y/o LRP5/6 con una constante de disociación (K_D) de alrededor de 1 μ M o menos, alrededor de 100 nM o menos, alrededor de 40 nM o menos, alrededor de 20 nM o menos, o alrededor de 10 nM o menos. Por ejemplo, en algunas formas de realización, un dominio de unión a Fzd o anticuerpo descrito en la presente que se une a uno o más Fzd, se une a aquellos Fzd con una K_D de alrededor de 100 nM

o menos, alrededor de 20 nM o menos, o alrededor de 10 nM o menos. En algunas formas de realización, el dominio de unión se une a uno o más su antígeno diana con una EC₅₀ de alrededor de 1 μ M o menos, alrededor de 100 nM o menos, alrededor de 40 nM o menos, alrededor de 20 nM o menos, alrededor de 10 nM o menos, o alrededor de 1 nM o menos.

[00296] Los anticuerpos u otros agentes de la presente invención se pueden someter a ensayo para determinar la unión específica mediante cualquier método conocido en el estado de la técnica. Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen, entre otros, sistemas de ensayo competitivos o no competitivos usando técnicas tales como análisis de interferometría de biocapa (BLI), resonancia de plasmones superficiales (SPR), análisis FACS, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos tipo “sándwich”, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitación, reacciones de precipitación por difusión con gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación al complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Estos ensayos son de rutina y son conocidos en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, Ausubel *et al*, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, que se incorpora específicamente por referencia en su totalidad).

[00297] Por ejemplo, la unión específica de un anticuerpo a un antígeno diana se puede determinar usando ELISA. Un ensayo ELISA comprende preparar antígeno, recubrir cavidades de una placa de microtitulación de 96 cavidades con antígeno, agregar el anticuerpo u otro agente de unión conjugado con un compuesto detectable, tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina), a la cavidad, incubar durante un período y detectar la presencia del antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o agente no se conjuga con un compuesto detectable, sino en cambio un segundo anticuerpo conjugado que reconoce el primer anticuerpo o agente se agrega a la cavidad. En algunas formas de realización, en lugar de recubrir la cavidad con el antígeno, el anticuerpo o agente se pueden recubrir en la cavidad y un segundo anticuerpo conjugado con un compuesto detectable se puede agregar después de la adición del antígeno a la cavidad recubierta. Una persona del oficio de nivel medio conocerá los parámetros que se pueden modificar para aumentar la señal detectada, así como otras variaciones de ELISA conocidas en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, Ausubel *et al*, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 11.2.1).

[00298] La afinidad de unión de un anticuerpo u otro agente a un antígeno diana y la velocidad de disociación de la interacción anticuerpo-antígeno se pueden determinar mediante ensayos de unión competitivos. Un ejemplo de un ensayo de unión competitivo es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígeno etiquetado (por ejemplo, Fzd, LRP), o fragmento o variante de este, con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades en aumento de antígeno no etiquetado y luego la detección del anticuerpo unido al antígeno etiquetado. La afinidad del anticuerpo y las velocidades de disociación de unión se pueden determinar a partir de los datos mediante análisis de diagrama de Scatchard. En algunas formas de realización, se usa análisis de BLI para determinar las velocidades de asociación y disociación de unión de anticuerpos o agentes. El análisis cinético de BLI comprende analizar la unión y disociación de anticuerpos de sensores con antígenos inmovilizados en su superficie.

[00299] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona agonistas de señalización Wnt, que incluye, entre otros, hp4SD1-03, hp4SD1-03 AAQ, hp4SD1-03 AAA, y también fragmentos y variantes de estos. En formas de realización particulares, un agonista de señalización Wnt tiene una estructura diagramada en la **Figura 1** o la estructura recuadrada en la **Figura 24** y/o comprende una o ambas de las secuencias divulgadas en la **Figura 9** o la **Figura 19A o 19B**, o cualquier fragmento funcional o variante de este, por ejemplo, un fragmento de unión al antígeno de este, tal como un dominio VHH, dominio VL o dominio VH, o un dominio Fc, o una variante de cualquiera de estos dominios funcionales, por ejemplo, una variante que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con cualquier fragmento funcional de la secuencia de anticuerpos divulgada en la presente. En algunas formas de realización, un agonista de señalización Wnt comprende una secuencia variante que tiene al menos 90 % de identidad (por ejemplo, 95 %, 98 % o 100 % de identidad) con respecto a una secuencia divulgada en la **Figura 9** o la **Figura 19A o 19B**, o como se indica en SEQ ID NO: 1 y/o 2; SEQ ID NO: 1 y/o 7; SEQ ID NO: 1 y/o 450; SEQ ID NO: 1 y/o 451; SEQ ID NO: 1 y/o 452; SEQ ID NO: 1 y/o 453, o cualquier fragmento funcional de estas, por ejemplo, un fragmento de unión al antígeno de estas. En algunas formas de realización, un agonista de señalización Wnt comprende una secuencia de tipo silvestre o variante que tiene al menos 90 % de identidad (por ejemplo, 95 %, 98 % o 100 % de identidad) con respecto a una secuencia de cadena liviana divulgada en la **Figura 9** o la **Figura 19A o 19B**, o como se indica en SEQ ID NO: 1, y una secuencia de tipo silvestre o variante que tiene al menos 90 % de identidad (por ejemplo, 95 %, 98 % o 100 % de identidad) con respecto a una secuencia de

cadena pesada divulgada en la **Figura 9** o la **Figura 19A o 19B**, o como se indica en SEQ ID NO: 2, 7, 450, 451, 452 o 453. En algunas formas de realización, un agonista de señalización Wnt comprende dos secuencias de tipo silvestre o variante, en donde cada una tiene al menos 90 % de identidad (por ejemplo, 95 %, 98 % o 100 % de identidad) con respecto a una secuencia de cadena liviana divulgada en la **Figura 9** o la **Figura 19A o 19B**, o como se indica en SEQ ID NO: 1, y dos secuencias de tipo silvestre o variante, en donde cada una tiene al menos 90 % de identidad (por ejemplo, 95 %, 98 % o 100 % de identidad) con respecto a una secuencia de cadena pesada divulgada en la **Figura 9** o la **Figura 19A o 19B**, o como se indica en SEQ ID NO: 2, 7, 450, 451, 452 o 453, en donde las dos cadenas pesadas se unen entre sí y cada cadena liviana se une a una cadena pesada diferente, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. En formas de realización particulares, uno o más de los residuos de aminoácidos se introducen en la molécula de origen, 4SD1-03_LALAPG, para generar hp4SD1-03, que incluye, por ejemplo, aquellos en hVHH3-H4 (**Figura 2**), hVHH3-H4 N29Q (**Figura 3**), hVHH3-H4 DDD sustituida con DED (**Figura 4**), 4SD1 HC CDR1 N31S y CDR2 D62E (**Figura 7**), y/o aquellas en la estructura 4SD1 humanizada, como se muestra en la **Figura 8**. En algunas formas de realización, VHH3 CDR3 D108 se mantiene. En algunas formas de realización, VHH3 M51 se mantiene. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona una variante de hp4SD1-03 (o una variante de un fragmento o fragmento o cadena de esta) que comprende una o más sustituciones de aminoácido, que puede opcionalmente comprender una sustitución de aminoácido dentro de DDDY (SEQ ID NO: 418) motivo de hVHH3-H4 en las posiciones 101-104, que corresponde a DEDY (SEQ ID NO: 410) motivo del dominio VHH de hp4SD1-03 en las posiciones 101-104, opcionalmente, en donde D en la posición 102 se sustituye con otro aminoácido, por ejemplo, E, S, A o T, u opcionalmente en donde DEDY (SEQ ID NO: 410) se modifica a DEEY (SEQ ID NO: 411), DESY (SEQ ID NO: 412), DEAY (SEQ ID NO: 413), DETY (SEQ ID NO: 414), ESEY (SEQ ID NO: 415), ESTY (SEQ ID NO: 416) o ESSY (SEQ ID NO: 417) (**Figura 14**). Las secuencias de hp4SD1-03 se muestran a continuación.

Cadena liviana:

*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASS**ANIQSIET**LGWYRQAPGKQRELIAN**NMRGGGY**
MKYADSLKGRFTMSTDNSKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYC**YVKLRDEDYVYR**GQGT
 QVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT**CRASQSISSYLN**WYQQKPGKAPKL
 LIY**AASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC**QQSYSTPLT**FGGGTKV
 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID*

NO:1)

Cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT**SYAMS**WVRQAPGKGLEWVS**AISGSG**
GSTYYAESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**ATGFGTVVFDY**WG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
 HTCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO:2).

[00300] El dominio VHH de hp4SD1-03 tiene la secuencia:
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASS**ANIQSIET**LGWYRQAPGKQRELI**NMRGGGY**
MKYADSLKGRFTMSTDNSKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYC**YVKLRDEDYVY**RGQGT
 QVTVSS (SEQ ID NO: 381), en donde las CDR se muestran subrayadas y en negrita.

[00301] GGGGS (SEQ ID NO: 101) es la secuencia ligadora entre el dominio VHH y dominio VL.

[00302] El dominio VL de hp4SD1-03 tiene la secuencia:
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISSYLN**WYQQKPGKAPKLLIY**AASSLQSGV**
 PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC**QQSYSTPLT**FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:
 281), en donde las CDR se muestran subrayadas y en negrita.

[00303] El dominio VH de hp4SD1-03 tiene la secuencia:
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT**SYAMS**WVRQAPGKGLEWVS**AISGSG**
GSTYYAESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**ATGFGTVVFDY**WG
 QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 181), en donde las CDR se muestran subrayadas y en
 negrita.

[00304] El dominio Fc de hp4SD1-03 tiene la secuencia:
 DKHTCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 81).

[00305] Se incluyen además particularmente algunas variantes Fc de hp4SD1-03, que comprenden la misma cadena liviana que hp4SD1-03 (es decir, SEQ ID NO: 1) y una cadena pesada que difiere en la secuencia de región Fc de la cadena pesada de

hp4SD1-03 (hp4SD1 HC contiene una región Fc que comprende las sustituciones LALAPG, SEQ ID NO: 81).

[00306] Por ejemplo, la sustitución LALAPG se puede introducir a otra secuencia de referencia de región Fc para producir SEQ ID NO: 82-84.

[00307] En otro ejemplo, "hp4SD1-03 AAQ" comprende la cadena liviana de SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que es similar a la cadena pesada de hp4SD1-03, pero comprende una región Fc que comprende las sustituciones IAHAHQ (también denominadas sustituciones AAQ en la presente), además de las sustituciones LALAPG (región Fc de por ejemplo, SEQ ID NO: 471-474). Tal cadena pesada puede, por ejemplo, comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 450.

[00308] En otro ejemplo, "hp4SD1-03 AAA" comprende la cadena liviana de SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que es similar a la cadena pesada de hp4SD1-03, pero comprende una región Fc que comprende las sustituciones IAHAHA (también denominadas sustituciones AAA en la presente), además de las sustituciones LALAPG (región Fc de por ejemplo, SEQ ID NO: 476-479). Tal cadena pesada puede, por ejemplo, comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 451.

[00309] Otros ejemplos no limitativos de variantes Fc de hp4SD1-03 incluyen: (I) un anticuerpo biespecífico que comprende la cadena liviana de SEQ ID NO: 1 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 7, que comprende una región Fc que comprende las sustituciones LALA (tal secuencia de región Fc puede ser, por ejemplo, SEQ ID NO: 86-89); (II) un anticuerpo biespecífico que comprende la cadena liviana de SEQ ID NO: 1 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 8, que comprende una región Fc que comprende las sustituciones IAHAHQ, pero no sustituciones LALAPG (tal secuencia de región Fc puede ser, por ejemplo, SEQ ID NO: 91-94); (III) un anticuerpo biespecífico que comprende la cadena liviana de SEQ ID NO: 1 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 9, que comprende una región Fc que comprende las sustituciones IAHAHA, pero no sustituciones LALAPG (tal secuencia de región Fc puede ser, por ejemplo, SEQ ID NO: 96-99); (IV) un anticuerpo biespecífico que comprende la cadena liviana de SEQ ID NO: 1 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 452, que comprende una región Fc que comprende las sustituciones IAHAHQ además de las sustituciones LALA (tal secuencia de región Fc puede ser, por ejemplo, SEQ ID NO: 481-484); y (V) un anticuerpo biespecífico que comprende la cadena liviana de SEQ ID NO: 1 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 453, que comprende una región Fc que comprende las sustituciones IAHAHA además de las sustituciones LALA (tal secuencia de región Fc puede ser, por ejemplo, SEQ ID NO: 486-489).

[00310] Las variantes Fc no limitativas adicionales de hp4SD1-03 pueden incluir: (I) una variante hp4SD1-03, en donde la región Fc se reemplaza con una región Fc que comprende una o más sustituciones de aminoácido en las posiciones seleccionadas de las posiciones 234, 235, 236, 237, 265, 297 y 329, de acuerdo con la numeración EU; (II) una variante hp4SD1-03, en donde la región Fc se reemplaza con una región Fc que comprende sustituciones D265A y P329A, de acuerdo con la numeración EU (también denominada “DAPA” en la presente); (III) una variante hp4SD1-03, en donde la región Fc se reemplaza con una región Fc que comprende sustitución N297A, de acuerdo con la numeración EU; (IV) una variante hp4SD1-03, en donde la región Fc se reemplaza con una región Fc que comprende M252Y, S254T y T256E, de acuerdo con la numeración EU (también denominada “YTE” en la presente); y (V) una variante hp4SD1-03, en donde la región Fc se reemplaza con una región Fc que comprende M428L y N434S, de acuerdo con la numeración EU (también denominada “LS” en la presente). Tales sustituciones se pueden realizar en cualquier secuencia de región Fc que incluye, entre otras, secuencia de referencia de región Fc de SEQ ID NO: 71-74.

[00311] También se incluyen particularmente variantes de hp4SD1-03, en donde: uno o más VH y/o VL anti-Fzd4 y/o secuencias VH anti-LRP5/6 se reemplazan con cualquiera de las variantes correspondientes contenidas en el **APÉNDICE, Tablas B, C y E**; uno o más CDR VH y/o CDR VL anti-Fzd4 y/o secuencias de CDR VH anti-LRP5/6 se reemplazan con cualquiera de las variantes correspondientes contenidas en el **APÉNDICE, Tablas A, C y D**, o cualquiera de las variantes correspondientes contenidas en VH y/o VL anti-Fzd4 y/o secuencias VH anti-LRP5/6 contenidas en el **APÉNDICE, Tablas B, C y E**; uno o más FR VH y/o FR VL anti-Fzd4 y/o secuencias de FR VH anti-LRP5/6 se reemplazan con cualquiera de las variantes correspondientes contenidas en el **APÉNDICE, Tablas A, C y D** o cualquiera de las variantes correspondientes contenidas en VH y/o VL anti-Fzd4 y/o secuencias VH anti-LRP5/6 contenidas en el **APÉNDICE, Tablas B, C y E**; la secuencia ligadora (ligador entre VH anti-LRP5/6 y VL anti-Fzd4) se reemplaza con cualquiera de las variantes correspondientes contenidas en **APÉNDICE, Tabla F**; una o más de secuencias CH1, bisagra, CH2, CH3 y/o CL se reemplazan con cualquiera de las variantes correspondientes contenidas en el **APÉNDICE, Tabla G**; una o más de las secuencias de región Fc se reemplazan con cualquiera de las variantes correspondientes contenidas en el **APÉNDICE, Tabla H**; y/o uno o más de las secuencias de la cadena pesada (HC) y/o la cadena liviana (LC) se reemplazan con cualquiera de las variantes correspondientes contenidas en el **APÉNDICE, Tablas I-J**. En otras formas de realización, la divulgación proporciona una

secuencia de ácidos nucleicos que codifica una molécula agonista Wnt descrita en la presente, o un componente de polipéptido de esta, por ejemplo, que codifica un polipéptido de SEQ ID NO:1 y/o un polipéptido de SEQ ID NO: 2, 7, 8, 9, 450, 451, 452 o 453, o una variante o fragmento de cualquiera polipéptido. En algunas formas de realización, los polinucleótidos son ADN o mRNA, por ejemplo, un mRNA modificado. En formas de realización particulares, los polinucleótidos son mRNA modificados que comprenden además una secuencia de capuchón 5' y/o secuencia de extremo 3', por ejemplo, una cola poliA.

[00312] En otras formas de realización, los polinucleótidos son casetes de expresión que comprenden un promotor ligado operativamente a las secuencias codificantes. En otras formas de realización, los polinucleótidos están presentes en un vector de expresión, por ejemplo, un vector viral, que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptidos agonista Wnt descrita en la presente, o una variante o fragmento de esta.

[00313] La presente divulgación contempla además una célula que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende un promotor ligado operativamente a un ácido nucleico que codifica una secuencia de polipéptidos agonista Wnt, o variante o fragmento de esta. En formas de realización particulares, la célula comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende un promotor ligado operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido agonista Wnt. En algunas formas de realización, la célula huésped es una célula de mamífero, una célula insertada o una célula de levadura. Diversas células conocidas en el estado de la técnica se pueden usar para expresar y producir polipéptidos de mamífero. En formas de realización particulares, la célula es una célula heteróloga, una célula alogénica o una célula autóloga obtenida de un sujeto que se trata. En formas de realización particulares, la célula es una célula madre, por ejemplo, una célula madre derivada de tejidos adiposos o una célula madre hematopoyética.

[00314] Esta divulgación también proporciona métodos para producir un agonista Wnt o secuencia de polipéptidos de este divulgada en la presente, en donde el método comprende cultivar una célula (por ejemplo, una célula huésped) que comprende uno o más vectores de expresión que codifican los polipéptidos de agonista Wnt en condiciones adecuadas para la expresión de los polipéptidos de agonista Wnt. En algunas formas de realización, un polinucleótido que codifica el polipéptido de cadena pesada está presente en un primer vector de expresión, y un polinucleótido que codifica

el polipéptido de cadena liviana está presente en un segundo vector de expresión. En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica el polipéptido de cadena pesada y el polinucleótido que codifica el polipéptido de cadena liviana están presentes en el mismo vector de expresión. En algunas formas de realización, el agonista Wnt o secuencia de polipéptidos de este se secreta y/o purifica a partir de las células huésped después de la expresión.

III. Composiciones farmacéuticas

[00315] También se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula agonista Wnt descrita en la presente y uno o más diluyentes, portadores o excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

[00316] En otras formas de realización, también se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una molécula agonista Wnt descrita en la presente y uno o más diluyentes, portadores o excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico. En algunas formas de realización, los polinucleótidos son ADN o mRNA, por ejemplo, un mRNA modificado. En formas de realización particulares, los polinucleótidos son mRNA modificados que comprenden además una secuencia de capuchón 5' y/o secuencia de extremo 3', por ejemplo, una cola poliA. En otras formas de realización, los polinucleótidos son casetes de expresión que comprenden un promotor ligado operativamente a las secuencias codificantes.

[00317] En otras formas de realización, también se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden un vector de expresión, por ejemplo, un vector viral, que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una molécula agonista Wnt descrita en la presente y uno o más diluyentes, portadores o excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico. En algunas formas de realización, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la molécula antagonista Wnt y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el agonista Wnt están en el mismo polinucleótido, por ejemplo, casete de expresión.

[00318] La presente divulgación contempla además una composición farmacéutica que comprende una célula que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende un promotor ligado operativamente a un ácido nucleico que codifica una molécula antagonista/agonista Wnt y uno o más diluyentes, portadores o excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico. En formas de realización particulares, la composición farmacéutica comprende además una célula que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que

comprende un promotor ligado operativamente una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un agonista Wnt. En formas de realización particulares, la célula es una célula heteróloga o una célula autóloga obtenida de un sujeto que se trata. En formas de realización particulares, la célula es una célula madre, por ejemplo, una célula madre derivada de tejidos adiposos o una célula madre hematopoyética.

[00319] Las moléculas objeto de la presente, solas o en combinación, se pueden combinar con portadores, diluyentes, excipientes y reactivos aceptables desde el punto de vista farmacéutico útiles para preparar una formulación que es, generalmente, segura, no tóxica y conveniente, e incluye excipientes que son aceptables para su uso en un mamífero, por ejemplo, humano o primate. Tales excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición de aerosol, gaseosos. Los ejemplos de tales portadores, diluyentes y excipientes incluyen, entre otros, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y 5 % de albúmina de suero humano. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las formulaciones. Las soluciones o suspensiones usadas para las formulaciones pueden incluir un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerol, propilenglicol u otros solventes sintéticos; compuestos antibacterianos, tales como bencilalcohol o metil parabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiamintetracético (EDTA); amortiguadores, tales como acetatos, citratos o fosfatos, tensioactivos, tales como Tween 20® para evitar la agregación y/o absorción de materiales; y compuestos para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. En formas de realización particulares, las composiciones farmacéuticas son estériles.

[00320] Las composiciones farmacéuticas pueden incluir además soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática o solución salina amortiguada con fosfato (PBS). En algunos casos, la composición es estéril y debería ser fluida de manera que se pueda extraer en una jeringa o se pueda administrar a un sujeto de una jeringa. En algunas formas de realización, es estable en las condiciones de elaboración y almacenamiento, y se preserva de la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser, por ejemplo, un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua,

etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de estos. La correcta fluidez se puede mantener, por ejemplo, usando un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y usando tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones internas se puede obtener incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[00321] Las soluciones estériles se pueden preparar al incorporar el anticuerpo antagonista/agonista de Wnt o fragmento de unión al antígeno de este (o polinucleótido que codifica o célula que lo comprenda) en la cantidad necesaria en un solvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Por lo general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los que se enumeraron anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones estériles inyectables, los métodos de preparación incluyen secado al vacío y secado por congelación, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución estéril previamente filtrada de estos.

[00322] En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas se preparan con portadores que protegerán el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este contra la eliminación rápida del cuerpo, tales como una formulación de liberación controlada, que incluyen implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables biocompatibles, tales como etilen vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para las personas del oficio de nivel medio. Los materiales se pueden obtener en el comercio. Las suspensiones liposómicas también se pueden usar como portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico. Estas se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por las personas del oficio de nivel medio.

[00323] Puede ser conveniente formular las composiciones farmacéuticas en

forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosis unitaria, como se usa en la presente, se refiere a unidades físicamente diferenciadas útiles como dosis unitarias para el sujeto que se trata; en donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de anticuerpo activo o fragmento de unión al antígeno de este, calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosis unitaria se pueden determinar a partir de y directamente según las características únicas del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este y el efecto terapéutico particular que se desea lograr, y las limitaciones inherentes en el estado de la técnica al preparar tal anticuerpo activo o fragmento de unión al antígeno de este para el tratamiento de individuos.

[00324] Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un recipiente, envase o dispensador, por ejemplo, una jeringa, por ejemplo, una jeringa precargada, junto con instrucciones para la administración.

[00325] Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen cualquiera de las sales, ésteres o sales de tales ésteres aceptables desde el punto de vista farmacéutico o cualquier otro compuesto que, ante la administración a un mamífero, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el anticuerpo biológicamente activa o fragmento de unión al antígeno de este.

[00326] La presente divulgación incluye sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de una molécula agonista Wnt descrita en la presente. La expresión “sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico” se refiere a sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico y fisiológico de los compuestos de la presente divulgación: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto de origen y no les confieren efectos toxicológicos no deseados. Una variedad de sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico son conocidas en el estado de la técnica y descritas, por ejemplo, en “Remington’s Pharmaceutical Sciences”, 17.^a edición, Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, EE.UU., 1985 (y ediciones más recientes de este), en “Encyclopedia of Pharmaceutical Technology”, 3.^a edición, James Swarbrick (Ed.), Informa Healthcare USA (Inc.), NY, EE.UU., 2007, y en *J. Pharm. Sci.* 66:2 (1977). También, para obtener una reseña de sales adecuadas, ver “Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use” de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, 2002). Las sales de adición básica aceptables desde el punto de vista farmacéutico se forman con metales o aminas, tales como metales alcalinos y alcalinotérreos o aminas orgánicas.

[00327] Los metales usados como cationes comprenden sodio, potasio, magnesio, calcio y similares. Las aminos comprenden N-N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, dicitclohexilamina, etilendiamina, N-metilglucamina y procaína (ver, por ejemplo, Berge *et al.*, "Pharmaceutical Salts", *J. Pharma Sci.*, 1977, 66, 119). Las sales de adición básica de dichos compuestos ácidos se preparan al poner en contacto la forma de ácido libre con una cantidad suficiente de la base deseada para producir la sal de la manera convencional. La forma de ácido libre se puede regenerar al poner en contacto la forma de sal con un ácido y aislar el ácido libre de la manera convencional. Las formas de ácido libre difieren de sus respectivas formas de sal de alguna forma en determinadas propiedades físicas, tales como solubilidad en solventes polares, pero de otra manera las sales son equivalentes a su respectivo ácido libre para los propósitos de la presente divulgación.

[00328] En algunas formas de realización, la composición farmacéutica proporcionada en la presente comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula agonista Wnt o sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de esta mezclada con un portador, diluyente y/o excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico, por ejemplo, solución salina, solución salina amortiguada con fosfato, fosfato y aminoácidos, polímeros, polioles, azúcar, amortiguadores, conservantes y otras proteínas. Los aminoácidos, polímeros y azúcares y similares de ejemplo son compuestos de octilfenoxi polietoxi etanol, compuestos de monoestearato de polietilenglicol, ésteres de ácido graso de sorbitán de polioxietileno, sacarosa, fructosa, dextrosa, maltosa, glucosa, manitol, dextrano, sorbitol, inositol, galactitol, xilitol, lactosa, trehalosa, albúmina de suero bovino o humano, citrato, acetato, soluciones de Ringer y Hank, cisteína, arginina, carnitina, alanina, glicina, lisina, valina, leucina, polivinilpirrolidona y polietilenglicol. Preferentemente, esta formulación es estable durante al menos seis meses a 4 °C.

[00329] En algunas formas de realización, la composición farmacéutica proporcionada en la presente comprende un amortiguador, tal como solución salina amortiguada con fosfato (PBS) o fosfato de sodio/sulfato de sodio, amortiguador Tris, amortiguador de glicina, agua estéril y otros amortiguadores conocidos para la persona del oficio de nivel medio, tales como los descritos en Good *et al.* (1966) *Biochemistry* 5:467. El pH del amortiguador puede estar en el rango de 6,5 a 7,75, preferentemente 7 a 7,5, y con mayor preferencia 7,2 a 7,4.

IV. Métodos de uso

[00330] La presente divulgación también proporciona métodos para usar las

moléculas agonistas Wnt, por ejemplo, para modular una vía de señalización Wnt, por ejemplo, para aumentar la señalización Wnt, y la administración de una molécula agonista Wnt en una variedad de entornos terapéuticos. En la presente se proporcionan métodos de tratamiento que usan una molécula agonista Wnt. En una forma de realización, una molécula agonista Wnt se proporciona a un sujeto que tiene una enfermedad que implica señalización Wnt inadecuada o desregulada.

[00331] En algunas formas de realización, una molécula agonista Wnt se puede usar para potenciar una vía de señalización Wnt en un tejido o una célula. La agonización de la vía de señalización Wnt puede incluir, por ejemplo, aumentar la señalización Wnt o potenciar la señalización Wnt en un tejido o célula. Por ende, en algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un método para agonizar una vía de señalización Wnt en una célula, que comprende poner en contacto el tejido o célula con una cantidad eficaz de una molécula agonista Wnt o sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de esta divulgada en la presente, en donde la molécula agonista Wnt es un agonista de vía de señalización Wnt. En algunas formas de realización, el contacto se produce *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En formas de realización particulares, la célula es una célula cultivada, y el contacto se produce *in vitro*. En algunas formas de realización, tal método puede ser útil para inducir la diferenciación celular y/o tisular de interés. Por lo tanto, tal método puede ser para preparar una célula y/o tejido para el implante o trasplante (por ejemplo, células o tejidos neurales, que pueden, por ejemplo, ser útiles para tratar una enfermedad neural o neurodegenerativa), diferenciar células madre (por ejemplo, diferenciar células madre en progenitores neurales o neuronas), y/o preparar un organoide (por ejemplo, organoide neural).

[00332] La molécula agonista Wnt se puede usar para el tratamiento de diversas enfermedades, trastornos y afecciones, tales como retinopatía. En particular, la activación de la señalización Wnt es necesaria para la vascularización retiniana durante el desarrollo de vasos en el ojo. La eliminación genética de *norrin*, *Fzd4*, *Lrp5* o *Tspan12* genera retroceso significativamente no solo en el desarrollo vascular en la superficie de la retina superficial, sino también en la penetración vascular en las capas más profundas de la retina. Adicionalmente, el área avascular generada debido a vascularización inmadura causa neovascularización asociada con isquemia. Por lo tanto, las administraciones controladas por tiempo de agonista Wnt y/o antagonista no solo generarán retroceso en la progresión de la enfermedad de retinopatía, sino también produciría una mejora de la enfermedad. En formas de realización particulares, el agonista Wnt se administrará en una fase temprana o tardía de la progresión de la

enfermedad de retinopatía en los sujetos.

[00333] Las enfermedades vasculares retinianas que se pueden tratar pueden incluir, entre otras: vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR), vitreorretinopatía exudativa, enfermedad de Norrie, retinopatía diabética (DR), edema macular diabético, isquemia macular diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD) (que incluye AMD húmeda y AMD seca), retinopatía de premadurez (ROP), síndrome de osteoporosis con pseudoglioma (OPPG), oclusión de la vena retiniana y enfermedad de Coats.

[00334] En formas de realización particulares, una enfermedad retiniana o retinopatía se trata con un agonista de señalización Wnt, que incluye, entre otros, hp4SD1-03, hp4SD1-03 AAQ o hp4SD1-03 AAA, o un agonista de señalización Wnt que comprende un fragmento o variante de hp4SD1-03 o un componente de polipéptido de este. En formas de realización particulares, los fragmentos o variantes son fragmentos funcionales o variantes que conservan la actividad de unión a Fzd y/o LRP5/6 y la capacidad para inducir vías de señalización Wnt en el contexto del agonista de señalización Wnt, por ejemplo, en algunas formas de realización, al menos 100 %, al menos 90 %, al menos 80 %, al menos 70 % o al menos 60 % de la actividad de unión a Fzd y/o LRP5/6, y/o al menos 100 %, al menos 90 %, al menos 80 %, al menos 70 % o al menos 60 % de la capacidad para inducir vías de señalización Wnt, en comparación con la molécula de origen, que puede ser, por ejemplo, hp4SD1-03, hp4SD1-03 AAQ o hp4SD1-03 AAA.

[00335] En formas de realización particulares, el agonista de señalización Wnt tiene un formato estructural como se diagrama en la **Figura 1** y/o comprende una o ambas de las secuencias divulgadas en la **Figura 9** o la **Figura 19A** o **19B**, o cualquier fragmento funcional o variante de este, por ejemplo, un fragmento de unión al antígeno de este, tal como un dominio VHH, dominio VL o dominio VH, o un dominio Fc, o una variante de cualquiera de estos dominios funcionales, por ejemplo, una variante que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con cualquier fragmento funcional de la secuencia de anticuerpos divulgada en la presente. En algunas formas de realización, el agonista de señalización Wnt comprende una secuencia variante que tiene al menos 90 % de identidad (por ejemplo, 95 %, 98 % o 100 % de identidad) con respecto a una secuencia divulgada en la **Figura 9** o la **Figura 19A** o **19B** o como se indica en SEQ ID NO: 1 y/o 2; SEQ ID NO: 1 y/o 7; SEQ ID NO: 1 y/o 8; SEQ ID NO: 1 y/o 9; SEQ ID NO: 1 y/o 450; SEQ ID NO: 1 y/o 451; SEQ ID NO: 1 y/o 452; y/o SEQ ID NO: 1 y/o 453 o cualquier fragmento funcional de

estas, por ejemplo, un fragmento de unión al antígeno de estas. En algunas formas de realización, el agonista de señalización Wnt comprende una secuencia de tipo silvestre o variante que tiene al menos 90 % de identidad (por ejemplo, 95 %, 98 % o 100 % de identidad) con respecto a una secuencia de cadena liviana divulgada en la **Figura 9** o indicada en SEQ ID NO: 1, y una secuencia de tipo silvestre o variante que tiene al menos 90 % de identidad (por ejemplo, 95 %, 98 % o 100 % de identidad) con respecto a una secuencia de cadena pesada divulgada en la **Figura 9** o la **Figura 19A** o **19B** o como se indica en cualquiera de SEQ ID NO: 2, 7-9 y 450-453. En algunas formas de realización, el agonista de señalización Wnt comprende dos secuencias de tipo silvestre o variante, en donde cada una tiene al menos 90 % de identidad (por ejemplo, 95 %, 98 % o 100 % de identidad) con respecto a una secuencia de cadena liviana divulgada en la **Figura 9** o la **Figura 19A** o **19B**, o como se indica en SEQ ID NO: 1, y dos secuencias de tipo silvestre o variante, en donde cada una tiene al menos 90 % de identidad (por ejemplo, 95 %, 98 % o 100 % de identidad) con respecto a una secuencia de cadena pesada divulgada en la **Figura 9** o la **Figura 19A** o **19B** o como se indica en cualquiera de SEQ ID NO: 2, 7-9 y 450-453, en donde las dos cadenas pesadas se unen entre sí y cada cadena liviana se une a una cadena pesada diferente, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. En formas de realización particulares, es posible introducir modificaciones de aminoácido en la molécula de origen, 4SD1-03_LALPG, para generar hp4SD1-03 o sus variantes, que incluyen, por ejemplo, aquellas en hVHH3-H4 (**Figura 2**), hVHH3-H4 N29Q, hVHH3-H4 DDD sustituida con DED (**Figura 4**), hVHH3-H4 DDDY (SEQ ID NO: 418) (aminoácidos 101-104) sustituida con DEEY (SEQ ID NO: 411), DESY (SEQ ID NO: 412), DEAY (SEQ ID NO: 413), DETY (SEQ ID NO: 414), ESEY (SEQ ID NO: 415), ESTY (SEQ ID NO: 416) o ESSY (SEQ ID NO: 417) (**Figura 14**), 4SD1 HC CDR1 N31S y 4SD1 HC CDR2 D62E (**Figura 7**), y/o aquellas en la estructura 4DS1 humanizada, como se muestra en la **Figura 8**. En algunas formas de realización, CDR3 D108 se mantiene. En algunas formas de realización, VHH3 M51 se mantiene.

[00336] En formas de realización particulares, los métodos de tratamiento divulgados en la presente producen uno o más de: menor filtración vascular retiniana, menor isquemia retiniana o menor tamaño de la lesión neovascular retiniana. En formas de realización particulares, los métodos de tratamiento divulgados en la presente producen una mejora en uno o más síntomas o patologías de cualquiera de las enfermedades o trastornos divulgados en la presente.

[00337] La presente invención también proporciona un tratamiento conjunto con tratamientos conocidos para FEVR y/o DR. Por ejemplo, el agonista Wnt se puede

administrar en combinación con otro tratamiento para una retinopatía, que incluye, entre otros, agente anti-VEGF o inhibidores de VEGF o antagonistas de VEGF, tales como un anticuerpo anti-VEGF. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Ang2 también se administrará a los sujetos en combinación con el agonista Wnt. El VEGF inducido por hipoxia y la expresión de Ang2 son indicios importantes para neovascularización patológica, y de hecho un anticuerpo contra Ang2 antagonista se consideró para el tratamiento de pacientes con retinopatía (Gadkar *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* agosto de 2015;56(9):5390-400). El anticuerpo anti-VEGF o anticuerpo anti-Ang2 se pueden administrar de manera secuencial o concurrente con las moléculas de la presente invención. Los antagonistas de VEGF pueden incluir, entre otros: bevacizumab, ranibizumab, aflibercept, ramucirumab y tanibirumab; y los antagonistas de Ang2 pueden incluir, entre otros: nesvacumab, AMG780 y MEDI3617.

[00338] En otra forma de realización, la molécula agonista también puede incorporar una porción que actúa sobre un tejido, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de este que reconoce un receptor específico para tejido retiniano o molécula de superficie celular.

[00339] El agente terapéutico (por ejemplo, un agonista Wnt) puede administrarse antes, durante o después del inicio de la enfermedad o lesión. El tratamiento de enfermedad en curso, en donde el tratamiento estabiliza o reduce los síntomas clínicos no deseados del paciente, es de particular interés. Tal tratamiento se lleva a cabo convenientemente antes de la pérdida completa de la función en los tejidos afectados. El tratamiento objeto de la presente se administrará convenientemente durante la etapa sintomática de la enfermedad, y en algunos casos después de la etapa sintomática de la enfermedad. En algunas formas de realización, el método objeto de la presente da como resultado un beneficio terapéutico, por ejemplo, prevenir el desarrollo de un trastorno, detener la progresión de un trastorno, revertir la progresión de un trastorno, etc. En algunas formas de realización, el método objeto de la presente comprende la etapa de detectar que un beneficio terapéutico se ha logrado. La persona del oficio de nivel medio entenderá que tales medidas de eficacia terapéutica serán aplicables a la enfermedad particular que se modifica y reconocerá los métodos de detección adecuados usados para medir la eficacia terapéutica.

[00340] Todas las patentes estadounidenses, publicaciones de solicitud de patente estadounidense, solicitudes de patente estadounidense, patentes extranjeras, solicitudes de patente extranjeras y publicaciones no patentes anteriores a las que se hace referencia en la presente memoria descriptiva y/o que se enumeran en la Hoja de

datos de solicitud se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

[00341] Puede apreciarse, de lo expuesto anteriormente, que si bien las formas de realización específicas de la invención se describieron en la presente a modo ilustrativo, se pueden realizar diversas modificaciones sin desviarse del espíritu ni del alcance de la presente divulgación. En consecuencia, la presente divulgación no está limitada, excepto por las reivindicaciones adjuntas.

[00342] El amplio alcance de la presente invención se entiende mejor en referencia al siguiente ejemplo, que no pretende limitar las invenciones a las formas de realización específicas.

EJEMPLOS

[00343] Se describen métodos estándar en biología molecular. Maniatis *et al.* (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Wu (1993) *Recombinant DNA*, vol. 217, Academic Press, San Diego, Calif. Los métodos estándar también aparecen en Ausbel *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. Nueva York, N.Y., que describe la clonación en células bacterianas y mutagénesis del ADN (vol. 1), la clonación en células de mamíferos y levadura (vol. 2), los glicoconjugados y la expresión de proteínas (vol. 3) y la bioinformática (vol. 4).

[00344] Se describen métodos para la purificación de proteínas, que incluyen inmunoprecipitación, cromatografía, electroforesis, centrifugación y cristalización. Coligan *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York. Se describen los análisis químicos, la modificación química, la modificación después de la traducción, la producción de proteínas de fusión, la glicosilación de proteínas. Ver, por ejemplo, Coligan *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Ausubel *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, N.Y., pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, Mo.; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391. Se describe la producción, purificación y fragmentación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Coligan *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Harlow y Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Harlow y Lane, más arriba. Las técnicas estándar para caracterizar las interacciones ligando/receptor se encuentran disponibles. Ver, por ejemplo, Coligan *et al.*

(2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., Nueva York.

[00345] Los métodos para citometría de flujo, que incluyen clasificación celular activada por fluorescencia (FACS®), se encuentran disponibles. Ver, por ejemplo, Owens *et al.* (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, N.J.; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2^a ed.; Wiley-Liss, Hoboken, N.J.; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, N.J. Los reactivos fluorescentes adecuados para modificar ácidos nucleicos, que incluyen cebadores de ácido nucleico y sondas, polipéptidos, y anticuerpos, para su uso, por ejemplo, como reactivos de diagnóstico, están disponibles. Molecular Probes (2003) *Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.; Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*, St. Louis, Mo.

[00346] Los métodos estándar de histología del sistema inmunitario se describen. Ver, por ejemplo, Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, Nueva York, N.Y.; Hiatt, *et al.* (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, Pa.; Louis, *et al.* (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, Nueva York, N.Y.

[00347] Los paquetes de *software* y bases de datos para determinar, por ejemplo, fragmentos antigénicos, secuencias líder, plegamiento de proteínas, dominios funcionales y sitios de glicosilación, están disponibles. Ver, por ejemplo, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, Md.); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, Calif.); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nev.); Menne *et al.* (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne *et al.* (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742; Wren *et al.* (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690.

Ejemplo 1

Producción y caracterización de agonista de señalización Wnt novedoso

[00348] Un agonista de señalización Wnt humanizado y optimizado que exhibe una actividad potenciada se desarrolló y caracterizó como se describe.

Producción de proteínas

[00349] Todas las proteínas recombinantes se produjeron en células Expi293F™ (Thermo Fisher Scientific) mediante transfección temporal. Las proteínas se purificaron primero usando una columna MabSelect SuRe (usualmente denominada Proteína A), luego se pulieron con Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando amortiguador 1xHBS (20 mM de

HEPES pH 7,4, 150 mM de NaCl) o HiLoad 16/600 Superdex 200 usando amortiguador 2XHBS. Después de esto, las proteínas se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y se calculó que tenían > 90 % de pureza.

Ensayo SuperTop Flash (STF) (ensayo de señalización Wnt)

[00350] La actividad de señalización Wnt se midió usando células bEND3 que contenían un gen de luciferasa controlado por un promotor sensible a Wnt (ensayo indicador Super Top Flash, STF) como se informó previamente (Chen *et al.*, *STAR Protoc.* 3 de junio de 2020;1(1):100043). En síntesis, las células se sembraron a una densidad de 10.000 por cavidad en placas de 96 cavidades 24 horas antes del tratamiento en presencia de 3 μ M IWP2 para inhibir la producción de ligandos Wnt endógenos. Las concentraciones variadas de las proteínas recombinantes luego se agregaron a las células durante la noche. Luego, las células se lisaron con reactivo de lisis para cultivo celular de luciferasa (Promega) y la actividad de luciferasa se midió con sistema de ensayo de luciferasa (Promega) usando los procedimientos sugeridos por el vendedor.

Ejemplo 2

Estudio en ratón de retinopatía inducida por oxígeno (OIR)

[00351] El modelo de ratón de retinopatía inducida por oxígeno (OIR) se llevó a cabo de manera similar a como se describió previamente (Smith *et al.*, Oxygen-induced retinopathy in the mouse, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, enero de 1994, vol. 35, 101-111) con algunos cambios experimentales. En síntesis, los cachorros recién nacidos en el día 7 posterior al nacimiento (P7) se expusieron a un ambiente hiperóxico con 75 % de nivel de oxígeno inspirado durante 5 días. Como resultado, los cachorros desarrollaron retina avascular (AV) a partir de obliteración de vasos de capilares recientemente formados en la retina central de P7 a P12. Después de que los cachorros se trasladaran a aire ambiente a P12, la retina central avascular se volvió hipóxica y se formaron penachos neovasculares (NV) intravítreos en las uniones de la retina vascular y avascular de P12 a P17. Para el tratamiento, los cachorros P12 recibieron una inyección intravítrea de uno de los siguientes artículos de prueba: Eylea® (aflibercept, un receptor señuelo de VEGF) a 60 μ g/ojo, 4SD1-03_LALAPG a 68 ng/ojo, hp4SD1-03 a 13,6 ng/ojo o control de vehículo. Para evaluar la eficacia de los artículos de prueba para reducir las áreas AV y NV, se tiñeron con isolectina B4 retinas enteras de cachorros en P17 y se tomaron imágenes. Las áreas AV, NV y retiniana total se clasificaron manualmente y se presentaron como porcentaje del área AV o área NV con respecto al área retiniana total. Para evaluar la relación dosis-eficacia, un segundo estudio de OIR

se llevó a cabo como se describió anteriormente (**Figura 15A-15C**) con dosis de 13,6 ng, 136 ng, 1360 ng por ojo de hp4SD1-03 o control de vehículo inyectado. Para evaluar la eficacia de los artículos de prueba para reducir las áreas AV y NV, se tiñeron con isolectina B4 retinas enteras de cachorros en P17 y se tomaron imágenes. Las áreas AV, NV y retiniana total se clasificaron manualmente y se presentaron como un porcentaje del área AV o NV con respecto al área retiniana total. La significancia estadística entre cada grupo de tratamiento y el grupo de control de vehículo se determinó usando una prueba de ANOVA de una sola vía seguido de prueba de comparación múltiple de Tukey. hp4SD1-03 de 40 nM a 4000 nM fue eficaz para reducir los penachos NV y área AV en modelo de OIR.

[00352] Todas las dosis evaluadas de hp4SD1-03 mostraron reducciones significativas de las áreas NV patológica y AV retiniana a un mayor grado que el grupo tratado con el vehículo (**Figura 15B y 15C**). Estos resultados sugieren que hp4SD1-03, no solo potencialmente inhibe la formación de penachos NV patológicos en afecciones isquémicas retinianas, sino también potencialmente fomenta la regeneración de vasos adecuada para volver a perfundir la retina dañada.

Ejemplo 3

Estudio en conejo con filtración vascular retiniana inducida por VEGF

[00353] El modelo de conejo de filtración vascular retiniana inducida por VEGF se llevó a cabo de manera similar a lo descrito previamente (Arana, L.A., *et al.* Fluorescein angiography, optical coherence tomography, and histopathologic findings in a VEGF animal model of retinal angiogenesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **250**, 1421–1428 (2012)) con algunos cambios experimentales. En el día 0, los artículos de prueba se administraron por vía intravítrea en los ojos de los conejos, y luego 1,0 µg de VEGF165 humano recombinante (R&D Systems) para determinar la filtración retiniana. Se realizó angiografía de fluoresceína (FA) en ambos ojos en el día0_preVEGF, día3 y día5. La fotografía retiniana de fase temprana se llevó a cabo 1-2 min después de la inyección de fluoresceína de sodio por vía intravenosa (12 mg kg⁻¹). Se tomaron imágenes de los animales usando el sistema de generación de imágenes RetCam3 (Natus). Los artículos de prueba y las imágenes recolectadas se evaluaron (enmascararon) y clasificaron para determinar la filtración retiniana de la siguiente manera: puntaje de filtración retiniana 0: los vasos sanguíneos mayores aparecen muy rectos con una tortuosidad limitada de los vasos más pequeños; 1: los vasos sanguíneos mayores presentan mayor tortuosidad y/o dilatación de los vasos; 2: la filtración está presente entre los vasos mayores, no se observa filtración entre los vasos menores; 3:

la filtración está presente entre los vasos mayores y menores; y 4: la filtración está presente entre los vasos mayores y menores, y los vasos menores no son visibles.

Ejemplo 4

Humanización de VHH3

[00354] A fin de humanizar la secuencia de anticuerpo camélido (VHH3), se analizó la base de datos de secuencias de la cadena pesada (HC) de IgG de línea germinal humana. Se descubrió que 3-66*01 era la coincidencia más cercana. Se generaron y purificaron cuatro mutantes diferentes (H1-H4). “hVHH3-H4” que mostró el mayor rendimiento de producción se eligió como VHH3 humanizada (**Figura 3**).

Ejemplo 5

Pulimento de VHH3

[00355] Para reducir el riesgo de potenciales tendencias a desamidación, isomerización y oxidación en las regiones CDR de VHH3, se generaron mutantes de VHH3 y se evaluaron como se indica a continuación (**Figuras 3- 5**).

Mutación N29Q en CDR1 (Figura 3)

[00356] Tres mutantes N29 diferentes (N29Q, N29A, N29S) de hVHH3-H4 se generaron y purificaron. Por ejemplo, N29Q VHH3 mostró un buen rendimiento para expresión de pureza alta. La asparagina en CDR1 se reemplazó con glutamina para mitigar la potencial tendencia a desamidación.

Mutación D102E en CDR3 (Figura 4)

[00357] Cinco mutantes diferentes (DED, SDE, EDE, ESD, SSD) en hVHH3-H4 CDR3 se generaron y purificaron para reducir el riesgo de la isomerización del motivo “DD” en VHH3. Todos los mutantes mostraron buena respuesta STF y expresión. Se seleccionó el mutante DED que puede tener un cambio de estructura mínimo. El ácido aspártico en CDR3 se reemplazó con ácido glutámico para mitigar la potencial tendencia a isomerización.

Mutación D103 en CDR3 (Figura 14)

[00358] En hp4SD1-03, varias sustituciones de aminoácido se realizaron dentro de los aminoácidos 101-104 de CDR3 del dominio VHH, que incluyen las siguientes: DEEY (SEQ ID NO: 411), DESY (SEQ ID NO: 412), DEAY (SEQ ID NO: 413), DETY (SEQ ID NO: 414), ESEY (SEQ ID NO: 415), ESTY (SEQ ID NO: 416) y ESSY (SEQ ID NO: 417). Estos mutantes mostraron buena expresión y estabilidad. La magnitud de la respuesta STF (Emax) aumentó con todos los mutantes evaluados. En algunos mutantes, el valor EC50 se redujo (por ejemplo, ESSY (SEQ ID NO: 417)).

Sin cambios de M51 y M57 en VHH3 CDR2 (Figura 5)

[00359] Tres mutantes diferentes en cada residuo de metionina en VHH3 CDR2 (M51K, M51L, M51I, M57K, M57L, M57I) se generaron como VHH y se purificaron para reducir el riesgo de potencial tendencia a oxidación. Todos los mutantes mostraron una gran disminución de expresión y se decidió mantener ambos residuos de metionina. La oxidación se evaluó mediante análisis de espectrometría de masas, que indicó que no había oxidación (no se muestran datos).

Pulimiento de 4SD1 IgG LALAPG

[00360] Para reducir el riesgo de potenciales tendencias a desamidación, isomerización y oxidación en dominios variables de 4SD1, se generaron mutantes de HC y se evaluaron como se indica a continuación. No hubo aminoácido para potenciales tendencias en las regiones CDR de la cadena liviana.

Mutación N31S en 4SD1 HC CDR1 (Figura 7)

[00361] Se generaron y purificaron anticuerpos biespecíficos que comprendían 4SD1 LC y uno de tres mutantes N31 diferentes (N31Q, N31A, N31S) de 4SD1 HC. Ningún mutante mostró disminución de la actividad en el ensayo de STF, en comparación con la forma de origen. Los mutantes N31S y N31A incluso mostraron mejora en la potencia en el ensayo STF, y N31S se eligió para la molécula pulida.

Mutación D62E en 4SD1 HC CDR2 (Figura 7)

[00362] Se generaron y purificaron anticuerpos biespecíficos que comprendían 4SD1 LC y uno de tres mutantes D62 diferentes (D62E, D62A, D62S) de 4SD1 HC. Todos los mutantes mostraron actividad de STF comparable o mejorada (por ejemplo, mayor magnitud de respuesta) con respecto a su forma de origen. D62E se eligió para una molécula pulida debido a la similitud del aminoácido entre D y E.

Sin cambios de D108 en 4SD1 HC CDR3 (Figura 7)

[00363] Se generaron y purificaron anticuerpos biespecíficos que comprendían 4SD1 LC y uno de diez mutantes D108 diferentes (D108E, D108A, D108S, D108R, D108T, D108L, D108H, D108Y, D108Q, D108K) de 4SD1 HC. Todos los mutantes mostraron pérdida de potencia significativa en la actividad de STF, en comparación con su forma de origen. Se decidió que D108 se debería mantener sin cambios, y la tendencia a isomerización se evaluó mediante análisis de espectrometría de masas.

Humanización de estructura de 4SD1 (Figura 8)

[00364] La secuencia de anticuerpo 4SD1 se obtuvo a partir de una colección de anticuerpos humanos sintética que contenía algunas mutaciones con errores de apareamiento con secuencias de línea germinal humana. Las mutaciones en la estructura se corrigieron según la secuencia de línea germinal de IgG humana como se

indica en la **Figura 8**. hp4SD1-03, que incorpora las modificaciones de secuencias anteriores como se muestra en la **Figura 9**, mostró actividad de STF mejorada, es decir, menor EC50 y mayor Emax, con respecto al origen, 4SD1-03_LALAPG.

Ejemplo 6

Actividad biológica de hp4SD1-03

Actividad de señalización Wnt

[00365] La 4SD1-03_LALAPG final y pulida humanizada, hp4SD1-03 (**Figura 9**), mostró un aumento de potencia de aproximadamente 10 veces (como se evaluó según la reducción en EC50) en comparación con su forma de origen 4SD1-03_LALAPG en el ensayo de STF como se llevó a cabo en el Ejemplo 1 (una comparación de la respuesta a la dosis en paralelo de ejemplo se muestra en la **Figura 10A**). Más específicamente, el promedio de $EC_{50} \pm SEM$ para hp4SD1-03 de siete experimentos independientes fue $0,055 \pm 0,014$ nM, y el promedio de $EC_{50} \pm SEM$ para 4SD1-03_LALAPG de diez experimentos independientes fue $0,477 \pm 0,069$ nM.

[00366] De manera similar, cuando otro ensayo para la medición de la señalización Wnt/ β -catenina similar al ensayo de STF, pero usando células bEND3 que no contenían un gen indicador exógeno controlado por un promotor sensible a Wnt (es decir, usando entornos menos artificiales), se llevó a cabo (detalles del método descritos a continuación), una reducción en EC50 mediante 11,5 pliegues sin perder la magnitud de respuesta (Emax) se observó con hp4SD1-03 en relación con 4SD1-03_LALAPG (**Figura 10B**).

[00367] Materiales y métodos

[00368] La actividad de señalización Wnt/ β -catenina se midió en células endoteliales microvasculares de cerebro de ratón (células bEnd.3) al cuantificar la cantidad de expresión génica de Axin2, un gen inducido por la señalización Wnt activa y que actúa en un bucle de retroalimentación negativa (Yan, *PNAS*, 98(26):14973-14978, (2001); Lustig, *Mol. Cell. Biol.* 22(4): 1184-1193 (2002); Jho, *Mol. Cell. Biol.* 22(4): 1172-1183 (2002)).

[00369] Se sembraron células a una densidad de 500.000 células por cavidad en placas de 6 cavidades, y 24 horas antes del tratamiento se sometieron a privación en DMEM con 0,5 % de BSA. Luego, la proteína 4SD1-03_LALAPG o hp4SD1-03 se agregó a las células durante 24 horas. Se llevó a cabo privación para eliminar efectos de señalización no específica de FCS. Se usó norrin humana recombinante (R&D Systems, Lote NSO0717041, 3014-NR-025) como un comparador de respuesta. Las células se lisaron y se extrajo ARN con 350 μ l de amortiguador RLT siguiendo

exactamente el protocolo del fabricante (Kit Qiagen RNeasy 96, número de catálogo 74181, lote 172036621). cADN se sintetizó, y Axin 2 cADN se amplificó de acuerdo con los procedimientos del fabricante (kit de transcripción inversa de cADN de alta capacidad, número de catálogo 4368813, lote 01216654; mezclas maestras de PCR universales TaqMan de Applied Biosystems, número de catálogo 4304437, lote 2208187; cebador Axin2: Mm00443610_m1Applied Biosystems).

[00370] Las curvas de respuesta a la dosis (DRC) se generaron usando GraphPad Prism 9.3.1; para normalización, la respuesta máxima de Norrin recombinante se estableció en 100 %.

Modelo de ratón de lesión retiniana

[00371] Como se muestra en la **Figura 11**, el tratamiento con el constructo modificado, hp4SD1-03, en comparación con el constructo de origen, 4SD1-03_LALAPG, en el modelo de ratón de lesión retiniana demostró un mejor resultado con hp4SD1-03 en comparación con 4SD1-03_LALAPG.

Modelo de conejo de filtración vascular retiniana

[00372] Como se muestra en la **Figura 12**, el tratamiento con el constructo modificado, hp4SD1-03, en el modelo de conejo de filtración vascular retiniana inducida por VEGF de lesión retiniana, redujo la filtración vascular. El tratamiento con 2 ug/ojo de hp4SD1-03 produjo una reducción de alrededor de 44 % en la filtración, y el tratamiento con 0,4 ug/ojo de hp4SD1-03 también redujo significativamente la filtración vascular.

Ejemplo 7

Análisis de transferencia Western - 4SD1-03 LALAPG

[00373] El análisis de transferencia Western se llevó a cabo como se informó previamente, con modificaciones menores. En síntesis, las células endoteliales microvasculares retinianas humanas (HRMEC) se trataron con 10 nM de 4SD1-03_LALAPG, 24 h antes de recolectarlas para lisis celular. Se usaron los anticuerpos primarios anti-ZO-1 (Abcam; ab216880), anti-CLDN5 (Abcam; ab131259) y anti- β actina (Sigma-Aldrich: A5441), y luego los anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) para determinar las señales quimioluminiscentes.

[00374] La acumulación de factor de unión al potenciador linfóide 1 (Lef1) y Mfsd2a se observó en los vasos de la barrera hematoencefálica (BBB) con uniones herméticas de células endoteliales (EC) especializadas, que se regulan por la señalización Wnt/ β -catenina (ver, por ejemplo, Wang Z *et al.* (2020) *Sci Adv* 2020;6:eaba7457; Wang Y *et al.* (2019) *Elife* 8; y Ben-Zvi A, *et al.* (2014) *Nature* 509:507-

511). La expresión de mRNA de *LEF1* y *MFSD2A* se reguló significativamente de manera ascendente mediante tratamiento con 4SD1-03_LALAPG en HRMEC (**Figura 16A**). Además, la expresión de proteínas de unión hermética EC, CLDN5 y ZO-1, se reguló de manera ascendente en las EC vasculares retinianas después del tratamiento con 4SD1-03_LALAPG (**Figura 16B**). Estos resultados sugieren que el anticuerpo tetravalente modificado por bioingeniería que actúa sobre Fzd4 y LRP5 se activa en EC vasculares y puede aumentar la integridad vascular a través de la regulación ascendente de proteínas de función de barrera.

Análisis de transferencia Western – hp4SD1-03

[00375] De manera similar, se confirmó que el tratamiento de HRMEC con hp4SD1-03 a 10 nM (detalles de materiales y métodos a continuación) inducía la señalización Wnt/ β -catenina como se mide mediante mayor fosforilación de la proteína 3 de polaridad del segmento Dishevelled (DVL3), que es un componente clave de la señalización Wnt y se fosforila ante la activación de la vía de señalización Wnt (Gonzalez-Sancho *et al.*, *Mol Cell Biol.* junio de 2004 Jun;24(11):4757-68). (**Figura 16C**).

[00376] Materiales y métodos

[00377] Se sembraron células HRMEC a una densidad de 500.000 células por cavidad en placas de 6 cavidades, y 24 horas antes del tratamiento se sometieron a privación en DMEM con 0,5 % de BSA. Las células se agregaron con Norrin recombinante, R2M3_control nulo, o proteína hp4SD1-03 y se incubaron durante 1 hora. Se usó norrin humana recombinante (R&D Systems, Lote NSO0717041, 3014-NR-025) como comparador de respuesta. Las células se solubilizaron con 300 μ l de amortiguador de lisis celular (Cell Signaling 9803S) con Complete (Roche 11873580001) o Pefabloc SC (Roche 505648900) durante 30 min a 4 °C, los extractos se centrifugaron durante 15 min a 14.000 g a 4 °C, y el sobrenadante se digirió con 3 μ l de ADNsa I (Qiagen 79254). Los lisados se hirvieron en amortiguador de muestra SDS separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, se transfirieron en membrana de nitrocelulosa y se sometieron a análisis de transferencia Western usando los anticuerpos indicados (NuPage 7 % de gel de acetato de Tris, Invitrogen EA03585BOX de acuerdo con el protocolo del fabricante, iBlot® NC Transfer Stacks Invitrogen IB 23001, anticuerpo anti-Dvl3 de conejo de Cell Signaling 3218, IgG anti-conejo (H+L), conjugado HRP Promega, W4011). Los niveles de proteína se cuantificaron al medir las intensidades de banda usando el *software* Fuji Lumimager LAS 300, AIDA (Analizador avanzado de imágenes de datos, versión 4.15.025). Se calcularon las relaciones de intensidad entre la banda superior (que corresponde a DVL3 fosforilado) y la banda

inferior (que corresponde a DVL3 no fosforilado).

Ejemplo 8

Cinética de unión mediante BLI

[00378] Se observó un aumento en la afinidad de unión medido mediante interferometría de biocapa (BLI) (detalles de materiales y métodos a continuación) para hp4SD1-03 con el CRD de Fzd4 humano con respecto a 4SD1-03_LALAPG (**Figuras 17A-17C**). En todas las concentraciones evaluadas, los sensogramas de CRD de Fzd4 humano con hp4SD1-03 mostraron disociaciones más lentas que con 4SD1-03_LALAPG (**Figura 17C**). Los análisis cinéticos en los dos gráficos (**Figuras 17A-17B**) también mostraron claramente que la k_{off} (k_{dis}) ralentizada impactó principalmente en el menor valor de K_D de hp4SD1-03. Sin pretender limitarse por la teoría, la k_{off} ralentizada y la menor K_D pueden explicar al menos parcialmente los valores de EC₅₀ reducidos observados en los ensayos de medición de señalización Wnt/ β -catenina y STF descritos anteriormente.

[00379] Materiales y métodos

[00380] La cinética de unión monovalente por parte de 4SD1-03_LALAPG o hp4SD1-03 al dominio rico en cisteína (CRD) de Fzd4 humano se determinó mediante BLI usando un instrumento OCTET® Red 96 (PALL ForteBio, Fremont, CA) a 30 °C, 1000 rpm con biosensores AHC (Sartorius). 4SD1-03_LALAPG o hp4SD1-03 se diluyó hasta 50 nM en amortiguador de corrida (PBS, 0,05 % de Tween-20®, 0,5 % de BSA, pH 7,2) y se capturó en el biosensor AHC, y luego se sumergió en cavidades que contenían el CRD de Fzd4 humano en diferentes concentraciones (1000, 333,3, 111,1, 37, 12,4, 4,12 y 1,37 nM) en un amortiguador de corrida o en una cavidad con solo amortiguador de corrida como canal de referencia. La disociación de la interacción se siguió con amortiguador de corrida. La K_D monovalente para cada aglutinante se calculó mediante el *software* OCTET® System, según el ajuste a un modelo de unión 1:1.

Cinética de unión mediante SPR

[00381] Se observó un aumento en la afinidad de unión medido mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) (detalles de materiales y métodos a continuación) para hp4SD1-03 con el CRD de Fzd4 humano con respecto a 4SD1-03_LALAPG (**Figuras 18A-18C**). Como se muestra en los sensogramas (**Figuras 18A-18B**) y los valores cinéticos (**Figura 18C**), hp4SD1-03 mostró disociación más lenta y mayor afinidad (valores K_D menores) que con 4SD1-03_LALAPG. Nuevamente, sin pretender limitarse por la teoría, la k_{off} ralentizada y la menor K_D pueden explicar al menos parcialmente los valores de EC₅₀ reducidos observados en los ensayos de

medición de señalización Wnt/ β -catenina y STF descritos anteriormente.

[00382] Materiales y métodos

[00383] La unión de hp4SD1-03 o 4SD1-03_LALAPG a CRD de Fzd4 humano (TPP-48723, PPB-51327) se determinó mediante SPR usando un instrumento Biacore® 8K usando HBS-EP+ (Biacore #BR-100668) como amortiguador de corrida. De acuerdo con las recomendaciones del fabricante, un chip biosensor CM5 (Biacore #BR100530) se activó con una solución 50:50 de EDC/NHS (Kit de acoplamiento de amina de Biacore #BR-100633). Proteína AG a 10 μ g/ml en 10 mM de acetato pH 4,5 se inmovilizó en la superficie, y luego se desactivó con 1 M de etanolamina HCl.

[00384] hp4SD1-03 o 4SD1-03_LALAPG se capturó en cuatro concentraciones (4, 2, 1 y 0,5 μ g/ml en HBS-EP+) durante 30 segundos a una velocidad de flujo de 10 μ l/min. Las diluciones en serie de CRD de Fzd humano se prepararon en HBS-EP+ (2,5 μ M-10,29 nM) y se inyectaron durante 90 segundos de asociación a 30 μ l/min, y luego 200 segundos de disociación. La superficie se regeneró mediante la inyección de ácido fosfórico al 0,85 % durante 30 s a una velocidad de flujo de 30 μ l/min.

[00385] La interacción del analito con la superficie del sensor (celda de flujo 1) y el blanco (HBS-T-EDTA o 0 nM de analito) se sustrajeron de los datos sin procesar. Luego, los sensogramas se ajustaron usando el modelo de unión 1:1 para proporcionar constantes cinéticas (k_a y k_d) y valores de afinidad (K_D). Los resultados de las diferentes concentraciones de captura se promediaron y las desviaciones estándar se calcularon en Excel para obtener los valores informados en la presente. Dado que la concentración más alta de analito usada fue 2,5 μ M, los valores K_D por encima de 250 nM son K_D aparentes.

Ejemplo 9

Diseño de mutantes Fc de hp4SD1-03

[00386] En un esfuerzo por generar variantes de hp4SD1-03 que pueden tener un tiempo de circulación *in vivo* más corto, la región Fc de hp4SD1-03 (que ya tenía L234A, L235A y P329G (también denominada LALAPG en la presente)) se modificó para tener además las siguientes sustituciones de aminoácido: I253A, H310A y H435Q (también denominada IAHAHQ o AAQ en la presente); o I253A, H310A y H435A (también denominada IAHAHA o AAA en la presente). La variante hp4SD1-03 que adicionalmente comprende IAHAHQ se denominó hp4SD1-03 AAQ, y la variante hp4SD1-03 que adicionalmente comprende IAHAHA se denominó hp4SD1-03 AAA. No se realizaron cambios en la cadena liviana de hp4SD1-03. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y liviana de hp4SD1-03 AAQ y hp4SD1-03 AAA se

muestran en las **Figuras 19A y 19B**, respectivamente. Sin pretender limitarse por la teoría, el tiempo de circulación *in vivo* (semivida, $T_{1/2}$) reducido puede proporcionar menor toxicidad.

Producción de hp4SD1-03 AAQ y hp4SD1-03 AAA

[00387] hp4SD1-03 AAQ y hp4SD1-03 AAA se purificaron exitosamente usando resina por afinidad de proteína A (**Figura 20**).

[00388] Materiales y métodos

[00389] Las proteínas recombinantes se produjeron en células Expi293F™ (Thermo Fisher Scientific) mediante transfección temporal. Las proteínas se capturaron mediante cromatografía por afinidad de Proteína A y se eluyeron en condiciones ácidas, luego se pulieron y se sometieron a intercambio de amortiguador mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) Superdex 200 Increase 10/300 GL (Cytiva) usando amortiguador HBS. Las proteínas purificadas se analizaron mediante electroforesis de poliacrilamida con SDS, a partir de lo cual se calculó que las proteínas tenían una pureza > 90 %. Los cromatogramas SEC se muestran en la **Figura 20**.

Estabilidad de proteína de hp4SD1-03 AAQ y hp4SD1-03 AAA

[00390] No se encontraron cambios significativos en la primera temperatura de fusión (T_{m1}) con hp4SD1-03 AAQ y hp4SD1-03 AAA en relación con hp4SD1-03 (**Figura 21**).

[00391] Materiales y métodos

[00392] Las curvas de fusión se determinaron y las temperaturas de fusión (T_{m1} y T_{m2}) se midieron usando un instrumento Uncle (UNchained Labs) que controlaba la fluorescencia intrínseca. La concentración de proteínas fue 0,5 mg/ml en HBS, pH 7,4, en donde la temperatura aumentaba de 15 °C a 95 °C, con la tasa de aumento de 0,6 °C/min. En el mismo experimento, la temperatura del inicio de la agregación (T_{agg}) se determinó mediante dispersión de luz estática del tamaño de partícula en aumento. Cada muestra se analizó por duplicado.

Actividad de STF de hp4SD1-03 AAQ y hp4SD1-03 AAA

[00393] La actividad de señalización Wnt se midió mediante el ensayo STF como se describe en el Ejemplo 1. Se muestran resultados de ejemplo en la **Figura 22**. hp4SD1-03 AAQ mostró EC50 relativamente menor, y hp4SD1-03 AAA mostró mayor magnitud en la respuesta (E_{max}), en relación con hp4SD1-03.

Unión de hp4SD1-03 AAQ y hp4SD1-03 AAA a FcRn

[00394] Ni hp4SD1-03 AAQ ni hp4SD1-03 AAA mostraron unión a FcRn (ver **Figura 23**).

[00395] Materiales y métodos

[00396] El ensayo de unión se llevó a cabo mediante BLI en el instrumento Octet® Red 96 (PALL ForteBio, Fremont, CA) a 25 °C, 1000 rpm con biosensores NTA. FcRN etiquetado con His (Acro Biosystems) se diluyó hasta 100 nM en amortiguador de corrida (PBS, 0,05 % de Tween-20®, 0,5 % de BSA, pH 7,2) y se capturó en el biosensor NTA (Sartorius), y luego se sumergió en cavidades que contenían hp4SD1-03, hp4SD1-03 AAQ y hp4SD1-03 AAA a 100 nM en el amortiguador de corrida o en una cavidad con solo amortiguador de corrida como canal de referencia. Las muestras se sometieron a ensayo en duplicados.

Ejemplo 10Farmacocinética (PK)

[00397] Se determinarán diversos parámetros farmacocinética que incluyen semivida para hp4SD1-03, hp4SD1-03 AAQ y hp4SD1-03 AAA.

[00398] hp4SD1-03, hp4SD1-03 AAQ y hp4SD1-03 AAA se producirán y purificarán adecuadamente, por ejemplo, como se describió anteriormente. Antes de la administración de la dosis, los animales modelo (por ejemplo, conejos, tales como conejos blancos de Nueva Zelanda o conejos chinchilla, monos, tales como *Macaca fascicularis*, etc.) se asignarán de manera aleatoria a diferentes grupos experimentales diseñados según las dosis deseadas (por ejemplo, 100 ng, 1 µg, 10 µg, 100 µg, 1 mg y 10 mg, etc.), vías deseadas (por ejemplo, por vía intravítrea, tópica usando gotas oculares, intravenosa, etc.), tipos de muestras para recolectar y puntos temporales de recolección de muestra. Las muestras de sangre se recolectarán para las mediciones basales.

[00399] En el día de la administración, hp4SD1-03, hp4SD1-03 AAQ y hp4SD1-03 AAA se reconstituirán hasta las concentraciones deseadas (por ejemplo, 300 nM, 3 µM, 30 µM, 300 µM, 3 mM y 30 mM, etc.) y se administrarán a los animales modelo en las dosis deseadas a través de vías deseadas.

[00400] Para los análisis posteriores a la administración intravenosa, una cantidad adecuada de sangre (por ejemplo, 0,2 ml para animales pequeños, tales como conejos, 3 ml para animales más grandes, tales como monos) se recolectará en serie, por ejemplo, a través de la arteria central de la oreja en diversos puntos temporales, por ejemplo, 5 y 30 minutos, y 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48, 72 y 96 horas después de la dosis. Para los análisis posteriores a la administración intravítrea o tópica, una cantidad adecuada de sangre también se recolectará en serie y los tejidos adecuados, tales como tejidos oculares (por ejemplo, humor vítreo, humor acuoso, humor vítreo, tejido retiniano (por

ejemplo, que incluye disco, mácula, retina periférica)) se recolectaran en diversos puntos temporales terminales preseleccionados.

[00401] Todas las muestras de sangre se recolectarán en tubos separadores de suero sin un anticoagulante, se dejarán coagular a temperatura ambiente, por ejemplo, durante al menos 20 minutos, y se centrifugarán a 2-8 °C. El suero se recolectará dentro de alrededor de 20 minutos de centrifugación y se almacenará a -60 °C a -80 °C hasta los análisis PK. Todos los tejidos recolectados se pesarán y almacenarán a -80 °C hasta los análisis.

[00402] La concentración de hp4SD1-03, hp4SD1-03 AAQ o hp4SD1-03 AAA en muestras de suero se analizará, por ejemplo, al someter las muestras de suero a ELISA. La concentración de hp4SD1-03, hp4SD1-03 AAQ o hp4SD1-03 AAA en muestras de tejido se analizará, por ejemplo, al homogeneizar las muestras de tejido y someter el homogeneizado a ELISA. Las concentraciones se representarán en función del tiempo para visualizar la farmacocinética sistémica y local. Se calcularán las semividas sistémicas y locales. Para analizar PK, se puede usar el ajuste a cualquier modelo PK adecuado (ver, por ejemplo, Gadkar *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* agosto de 2015;56(9):5390-400.; Le *et al.*, *J Pharmacol Exp Ther.* noviembre de 2015;355(2):288-96.; Li *et al.*, *Exp Eye Res.* abril de 2012;97(1):154-9.; y Park *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1 de mayo de 2016;57(6):2612-7).

[00403] Las diversas formas de realización descritas anteriormente se pueden combinar para obtener otras formas de realización. Todas las patentes estadounidenses, publicaciones de solicitud de patente estadounidense, solicitudes de patente estadounidense, patentes extranjeras, solicitudes de patente extranjeras y publicaciones no patentes a las que se hace referencia en la presente memoria descriptiva y/o que se enumeran en la Hoja de datos de solicitud se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. Se pueden modificar aspectos de las formas de realización, de ser necesario, para utilizar conceptos de las diversas patentes, solicitudes y publicaciones para obtener aun otras formas de realización. Se pueden realizar estos y otros cambios a las formas de realización en vista de la descripción antes detallada.

[00404] En general, en las siguientes reivindicaciones, las expresiones utilizadas no limitan las reivindicaciones a las formas de realización específicas divulgadas en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, sino que incluyen todas las formas de realización posibles junto con el alcance total de equivalentes que se le conceden a dichas reivindicaciones. En consecuencia, la divulgación no limita las reivindicaciones.

Formas de realización de ejemplo

[00405] En la presente, se describen a continuación algunas formas de realización de ejemplo de acuerdo con la presente divulgación.

[00406] Forma de realización P1. Un agonista de señalización WNT modificado por ingeniería genética, en donde el agonista de señalización WNT comprende: a) dos cadenas livianas, en donde cada una comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos 95 % de identidad con respecto a SEQ ID NO:1; y 2) dos cadenas pesadas, en donde cada una comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos 95 % de identidad con respecto a SEQ ID NO:2, en donde las dos cadenas pesadas se unen entre sí, y cada una de las dos cadenas livianas se une a una cadena pesada diferente del agonista de señalización WNT.

[00407] Forma de realización P2. El agonista de señalización WNT modificado por ingeniería genética de la **Forma de realización P1**, en donde cada una de las dos cadenas livianas comprende un dominio VHH que comprende uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos: N29Q y/o VHH3-H4 (o hVHH3-H4) DDD sustituidos con DED.

[00408] Forma de realización P3. El agonista de señalización WNT modificado por ingeniería genética de la **Forma de realización P1**, en donde cada una de las dos cadenas pesadas comprende uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos: una CDR1 S31, una CDR2 E62 y/o CDR3 D108.

[00409] Forma de realización P4. Un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una cadena liviana y/o una cadena pesada del agonista de señalización WNT modificado por ingeniería genética de cualquiera de las **Formas de realización P1-P3**.

[00410] Forma de realización P5. El ácido nucleico de la **Forma de realización P4**, en donde el ácido nucleico es un mARN, por ejemplo, un mARN modificado.

[00411] Forma de realización P6. Un vector que comprende el ácido nucleico de la **Forma de realización P4** o la **Forma de realización P5**.

[00412] Forma de realización P7. El vector de la **Forma de realización P6**, en donde el vector es un vector de expresión que comprende un promotor ligado operativamente al ácido nucleico de la **Forma de realización P4** o la **Forma de realización P5**.

[00413] Forma de realización P8. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la **Forma de realización P4** o la **Forma de realización P5** o el vector de la **Forma de realización P6** o la **Forma de realización P7**.

[00414] Forma de realización P9. Una composición farmacéutica que comprende un diluyente, excipiente o portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, y: a) el agonista de señalización WNT modificado por ingeniería genética de cualquiera de las **Formas de realización P1-P3**; b) el ácido nucleico de cualquiera de las **Formas de realización P4-P5**; y/o c) el vector de cualquiera de las **Formas de realización P6-P7**.

[00415] Forma de realización P10. Un método para tratar retinopatía en un sujeto, que comprende administrar al sujeto: a) el agonista de señalización WNT modificado por ingeniería genética de cualquiera de las **Formas de realización P1-P3**; b) el ácido nucleico de cualquiera de las **Formas de realización P4-P5**; c) el vector de cualquiera de las **Formas de realización P6-P7**; y/o d) la composición farmacéutica de la **Forma de realización P9**.

[00416] Forma de realización P11. El método de la **Forma de realización P10**, en donde la retinopatía es una enfermedad vascular retiniana.

[00417] Forma de realización P12. El método de la **Forma de realización P11**, en donde la enfermedad vascular retiniana es causada por la inhibición del desarrollo vascular.

[00418] Forma de realización P13. El método de la **Forma de realización P10**, en donde la retinopatía es causada por angiogénesis excesiva.

[00419] Forma de realización P14. El método de cualquiera de las **Formas de realización P10-P13**, en donde la enfermedad vascular retiniana se selecciona del grupo que consiste en: vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR), vitreorretinopatía exudativa, enfermedad de Norrie, retinopatía diabética (DR), edema macular diabético, isquemia macular diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD) (que incluye AMD húmeda y AMD seca), retinopatía de premadurez (ROP), síndrome de osteoporosis con pseudoglioma (OPPG), oclusión de la vena retiniana y enfermedad de Coats.

[00420] Forma de realización P15. El método de cualquiera de las **Formas de realización P10-P14**, en donde el agonista de señalización WNT modificado por ingeniería genética se administra a uno o más de los ojos del sujeto.

[00421] Forma de realización P16. El método de la **Forma de realización P15**, en donde el agonista de señalización WNT modificado por ingeniería genética se administra por vía intravítrea.

[00422] Forma de realización A1. Un anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo, que comprende: (A) un VH que comprende: (i) una CDRH1 que comprende

una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (i-1) la secuencia de aminoácidos de CDRH1 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 181-188, opcionalmente de acuerdo con Kabat; (i-2) la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 121-124; y/o (i-3) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente S, A, Q o N; (ii) una CDRH2 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (ii-1) la secuencia de aminoácidos de CDRH2 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 181-188, opcionalmente de acuerdo con Kabat; (ii-2) la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 141-144; y/o (ii-3) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente E, A, S o D; y (iii) una CDRH3 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (iii-1) la secuencia de aminoácidos de CDRH3 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 181-188, opcionalmente de acuerdo con Kabat; (iii-2) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 161; y/o (iii-3) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 160, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente D o cualquier aminoácido que no sea S, E, A, R, T, L, H, Y, Q o K; y

(B) un VL que comprende: (i) una CDRL1 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (i-1) la secuencia de aminoácidos de CDRL1 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (i-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 221; (ii) una CDRL2 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (ii-1) la secuencia de aminoácidos de CDRL2 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (ii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 241; y (iii) una CDRL3 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (iii-1) la secuencia de aminoácidos de CDRL3 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (iii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 261.

[00423] Forma de realización A2. El anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo de la **Forma de realización A1**, en donde:

(A) el VH comprende: (i) una FRH1 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (i-1) la secuencia de aminoácidos de FRH1 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 181-188, opcionalmente de acuerdo con Kabat; (i-2) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111 o 112; y/o (i-3) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente Q o K; (ii) FRH2 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o

consiste en: (ii-1) la secuencia de aminoácidos de FRH2 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 181-188, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (ii-2) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 o 131; (iii) una FRH3 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (iii-1) la secuencia de aminoácidos de FRH3 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 181-188, opcionalmente de acuerdo con Kabat; (iii-2) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151 o 152; y/o (iii-3) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 150, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente N o D; X_2 es cualquier aminoácido, opcionalmente R o K; y X_3 es cualquier aminoácido, opcionalmente E o T; y/o (iv) FRH4 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (iv-1) la secuencia de aminoácidos de FRH4 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 181-188, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (iv-2) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 170 o 171; y/o

(B) el VL comprende: (i) una FRL1 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (i-1) la secuencia de aminoácidos de FRL1 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (i-2) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 221; (ii) una FRL2 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (ii-1) la secuencia de aminoácidos de FRL2 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (ii-2) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 231; (iii) una FRL3 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (iii-1) la secuencia de aminoácidos de FRL3 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (iii-2) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 251; (iv) una FRL3 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (iv-1) la secuencia de aminoácidos de FRL3 contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (iv-2) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 271.

[00424] Forma de realización A3. El anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo de la **Forma de realización A1** o **A2**, en donde:

(A) en el VH:

(I) (I-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 181, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 121, 141 y 161; y (I-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181;

(II) (II-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 182, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 122, 142 y 162; y (II-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 182;

(III) (III-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 183, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 124, 142 y 162; y (III-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 183;

(IV) (IV-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 184, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 121, 142 y 162; y (IV-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 184;

(V) (V-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de

aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 185, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 123, 142 y 162; y (V-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 185;

(VI) (VI-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 186, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 122, 144 y 162; y (VI-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 186;

(VII) (VII-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 187, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 122, 141 y 162; y (VII-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 187;

(VIII) (VIII-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 188, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 122, 143 y 162; y (VIII-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 188; y/o

(B) en el VL: (1) la CDRL1, la CDRL2 y la CDRL3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRL1, la secuencia de aminoácidos de CDRL2 y la secuencia de aminoácidos de CDRL3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 221, 241 y 261; y (2) opcionalmente el VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281.

[00425] Forma de realización A4. El anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización A1-A3**, en donde: (A) el VH comprende secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 181-188; y/o (B) el VL comprende secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281.

[00426] Forma de realización A5. El anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización A1-A4**, en donde: (A) el VH comprende secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181; y (B) el VL comprende secuencias de aminoácidos que comprenden o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281.

[00427] Forma de realización A6. El anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización A1-A5**, que es, comprende o está incluido en:

(i) una IgG, opcionalmente IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, una IgA, una IgE, una IgD o una IgM que comprende dicho VH y dicho VL;

(ii) un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo (que opcionalmente comprende una estructura como se representa en cualquiera de las **Figuras 24-35**, además opcionalmente, la **Figura 24**) que comprende una primera región de unión al antígeno que comprende dicho VH y dicho VL y una segunda región de unión al antígeno específica para un segundo antígeno, opcionalmente en donde el segundo antígeno es

LRP5 y/o LRP6; y/o

(iii) un fragmento de unión al antígeno (Fab), un fragmento Fab', un F(ab')₂, un Fab monocatenario (scFab), un fragmento variable (Fv), un Fv monocatenario (scFv), un diacuerpo o un triacuerpo que comprende dicho VH y dicho VL.

[00428] Forma de realización A7. El anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización A1-A6**, que comprende uno o más de los siguientes:

(a) un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina 1 (CH1) o una variante de este, opcionalmente en donde el CH1 o una variante de este: (a-1) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano; y/o (a-2) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 o 22 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idéntica a esta;

(b) una bisagra de inmunoglobulina o una variante de esta, opcionalmente en donde la bisagra o una variante de esta: (b-1) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano; y/o (b-2) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idéntica a esta;

(c) un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina 2 (CH2) o una variante de este, opcionalmente en donde el CH2 o una variante de este: (c-1) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano; y/o (c-2) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 41-46 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idéntica a esta;

(d) un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina 3 (CH3) o una variante de este, opcionalmente en donde el CH3 o una variante de este: (d-1) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano; y/o (d-2) comprende una

secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 51-54, 61-64 y 66-69 (opcionalmente no incluyen K de extremo C) o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idéntica a esta; y/o

(e) un dominio constante de la cadena liviana de inmunoglobulina (CL) o una variante de este, opcionalmente en donde el CL o una variante de este: (e-1) es de un dominio constante de la cadena liviana kappa (CL κ), opcionalmente CL κ humano y que comprende opcionalmente una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a esta; o (e-2) es de un dominio constante de la cadena liviana lambda (CL λ), opcionalmente CL λ humano y que comprende opcionalmente una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a esta, opcionalmente en donde el anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo comprende las secuencias CH2 y CH3 de SEQ ID NO: 42 y 51, respectivamente, SEQ ID NO: 43 y 51, respectivamente, SEQ ID NO: 45 y 61, respectivamente, SEQ ID NO: 45 y 66, respectivamente, SEQ ID NO: 46 y 61, respectivamente o SEQ ID NO: 46 y 66, respectivamente.

[00429] Forma de realización A8. El anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización A1-A7**, que comprende una región de fragmento cristizable (Fc), opcionalmente en donde la región Fc:

(I) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano, o una variante de esta;

(II) es de: (i) una IgG1 o una variante de esta, que comprende opcionalmente una o más de las siguientes sustituciones de aminoácido: N297A, N297Q, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, G236-eliminada, P238A, A327Q, A327G, P329A, P329G, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, P331S, F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L, S239D, I332E, S298A, E333A, K334A, L234Y, L235Q, G236W, S239M, H268D, D270E, K326D, A330M, K334E, G236A, K326W, S239D,

E333S, S267E, H268F, S324T, E345R, E430G, S440Y M428L, N434S, H310A, L328F, M252Y, I253A, S254T, T256E, H435Q, H435A y/o cualquier combinación de estas, de acuerdo con la numeración de EU; (ii) una IgG2 o una variante de esta, que comprende opcionalmente una o más de las siguientes sustituciones de aminoácido: P238S, V234A, G237A, H268A, H268Q, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E y/o cualquier combinación de estas, de acuerdo con la numeración de EU; (iii) una IgG3 o una variante de esta, que comprende opcionalmente la sustitución de aminoácido E235Y, de acuerdo con la numeración de EU; o (iv) una IgG4 o una variante de esta, que comprende opcionalmente una o más de las siguientes sustituciones de aminoácido: E233P, F234V, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q y/o cualquier combinación de estas, de acuerdo con la numeración de EU:

(III) comprende una o más sustituciones de aminoácido que reducen una función efectora de Fc, opcionalmente en donde la una o más sustituciones de aminoácido están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 234, 235, 236, 237, 265, 297 y 329, de acuerdo con la numeración de EU;

(IV) comprende al menos las siguientes sustituciones de aminoácido de acuerdo con la numeración de EU: (ii-1) L234A, L235A y P329G; (ii-2) L234A y L235A; (ii-3) I253A, H310A y H435Q; (ii-4) I253A, H310A y H435A; (ii-5) D265A y P329A; (ii-6) M252Y, S254T y T256E; y/o (ii-7) M428L y N434S, opcionalmente con respecto a una región Fc de IgG1 humana y/o con cualquiera de SEQ ID NO: 71-74 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C); y/o

(V) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 71-74, 81-84, 86-89, 91-94, 96-99, 471-474, 476-479, 481-484 y 486-489 (opcionalmente no incluyen K de extremo C) o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o es 100 % idéntica a esta.

[00430] Forma de realización A9. Un ácido nucleico o una combinación de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización A1-A8**, opcionalmente en donde los ácidos nucleicos son ADN, cADN, ARN, mARN, mARN modificado o un híbrido de ADN/ARN.

[00431] Forma de realización A10. El ácido nucleico o una combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización A9**, que comprende: (a) un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende dicho VH; y (b) un segundo

ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que comprende dicho VL.

[00432] Forma de realización A11. Un vector o una combinación de vectores que comprende el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización A9 o A10**, opcionalmente en donde: (i) los vectores comprenden uno o más promotores ligados operativamente a los ácidos nucleicos; (ii) los vectores son un vector de expresión; y/o (iii) los vectores comprenden un plásmido, un vector viral (opcionalmente viral adenoasociado, adenoviral, lentiviral o retroviral), un vector a base de lípido, un vector de ARN de autorreplicación, una partícula tipo virus, un vector a base de polímero y/o una nanopartícula, opcionalmente una nanopartícula a base de lípidos.

[00433] Forma de realización A12. El vector o una combinación de vectores de la **Forma de realización A11**, que codifica el anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización A1-A8** y comprende: (a) un primer vector que comprende un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende dicho VH; y (b) un segundo vector que comprende un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que comprende dicho VL.

[00434] Forma de realización A13. Una célula huésped, que comprende: (A) el anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización A1-A8**; (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización A9 o A10**; y/o (C) el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización A11 o A12**, opcionalmente en donde la célula huésped es: (i) de mamífero, opcionalmente de ser humano, primate no humano, mono, conejo, roedor, hámster, rata o ratón; o (ii) no mamífero, opcionalmente de planta, bacteriana, fúngica, de levadura, protozoos o insectos, y opcionalmente en donde la célula huésped es: (i) una célula de riñón embrionario humano (HEK), opcionalmente una célula HEK293, o una variante de esta, además opcionalmente una célula Expi293F™; (ii) una célula CHO (ovario de hámster chino); (iii) una célula inmunitaria o (iv) un hibridoma.

[00435] Forma de realización A14. Una población de células, que comprende dos o más células huésped de la **Forma de realización A13**.

[00436] Forma de realización A15. Una composición farmacéutica, que comprende: (I) (A) el anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización A1-A8**; (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización A9 o A10**; (C) el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización A11 o A12**; y/o (D) la célula huésped de la **Forma de realización A13** o la población de células de la **Forma de realización A14**; y (II) un

portador y/o excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[00437] Forma de realización A16. Un método para tratar un sujeto que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de: (A) el anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización A1-A8**; (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización A9 o A10**; (C) el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización A11 o A12**; y/o (D) la célula huésped de la **Forma de realización A13** o la población de células de la **Forma de realización A14**; y/o (E) la composición farmacéutica de la **Forma de realización A15**, opcionalmente en donde: (a) el sujeto es (i) un mamífero, opcionalmente un ser humano, un primate no humano, un mono, un caballo, una vaca, oveja, una cabra, un cerdo, un perro, un gato, un conejo, un roedor, un hámster, una rata o un ratón; o (ii) un vertebrado no mamífero, opcionalmente un ave, pez, un anfibio o un reptil; (b) el sujeto comprende o presenta riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o una afección; y/o (c) el método comprende además administrar al sujeto un agente adicional, opcionalmente un adyuvante o un agente terapéutico.

[00438] Forma de realización A17. Un método para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o una afección en un sujeto que necesita dicho tratamiento, en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de: (A) el anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización A1-A8**; (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización A9 o A10**; (C) el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización A11 o A12**; y/o (D) la célula huésped de la **Forma de realización A13** o la población de células de la **Forma de realización A14**; y/o (E) la composición farmacéutica de la **Forma de realización A15**, opcionalmente en donde: (a) el sujeto es (i) un mamífero, opcionalmente un ser humano, un primate no humano, un mono, un caballo, una vaca, oveja, una cabra, un cerdo, un perro, un gato, un conejo, un roedor, un hámster, una rata o un ratón; o (ii) un vertebrado no mamífero, opcionalmente un ave, pez, un anfibio o un reptil; y/o (b) el método comprende además administrar al sujeto un agente adicional, opcionalmente un adyuvante o un agente terapéutico.

[00439] Forma de realización A18. Un método para elaborar el anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización A1-A8**, que comprende: (a) cultivar células que comprenden el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización A9 o A10** en una afección que permite la expresión de dicho anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo y (b) recolectar y

purificar el anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo del cultivo celular de (a).

[00440] Forma de realización A19. Un método para elaborar la célula huésped de la **Forma de realización A13** o la población de dichas células, que comprende introducir el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización A9** o **A10** y/o el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización A11** o **A12** en una o más células, opcionalmente en donde la introducción ocurre *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

[00441] Forma de realización B1. Un anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo, que comprende: un VH que comprende:

(i) una CDRH1 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (i-1) la secuencia de aminoácidos de CDRH1 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381-399, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (i-2) la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 321-323; y/o (i-3) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 320, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente Q, N o S, o cualquier aminoácido que no sea A;

(ii) una CDRH2 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (ii-1) la secuencia de aminoácidos de CDRH2 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381-399, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (ii-2) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 341; y/o (ii-3) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 340, en donde X_1 es cualquier aminoácido y X_2 es cualquier aminoácido, opcionalmente en donde CDRH2 no comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 340, en donde X_1 y X_2 son K y M, respectivamente, L y M, respectivamente, I y M, respectivamente, M y K, respectivamente, M y L, respectivamente, o M y I, respectivamente; y

(iii) una CDRH3 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (iii-1) la secuencia de aminoácidos de CDRH3 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381-399, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (iii-2) la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 361-369 y 300-303; y/o (iii-3) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 360, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente D o E, X_2 es cualquier aminoácido, opcionalmente E, D o S, y X_3 es cualquier aminoácido, opcionalmente D, E, S, A, T o D, opcionalmente en donde el VH es, comprende, o está compuesto en un nanocuerpo.

[00442] Forma de realización B2. El anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo de la **Forma de realización B1**, en donde el VH comprende:

(i) una FRH1 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o

consiste en: (i-1) la secuencia de aminoácidos de FRH1 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381-399, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (i-2) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 311 o 312; y/o (i-3) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 310, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente E o D, X_2 es cualquier aminoácido, opcionalmente A o T, y X_3 es cualquier aminoácido, opcionalmente S, opcionalmente en donde FRH1 no comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 310, en donde X_1 , X_2 y X_3 son E, A y A, respectivamente;

(ii) una FRH2 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (ii-1) la secuencia de aminoácidos de FRH2 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381-399, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (ii-2) la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 331-333; y/o (ii-3) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 330, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente Y, X_2 es cualquier aminoácido, opcionalmente Q o G, X_3 es cualquier aminoácido, opcionalmente R, X_4 es cualquier aminoácido, opcionalmente L o W, X_5 es cualquier aminoácido, opcionalmente I, y X_6 es cualquier aminoácido, opcionalmente A, opcionalmente en donde FRH2 no comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 330, en donde X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 y X_6 son V, G, L, W, V y S, respectivamente;

(iii) una FRH3 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (iii-1) la secuencia de aminoácidos de FRH3 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381-399, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (iii-2) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 351 o 352; y/o (iii-3) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 350, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente D o G, X_2 es cualquier aminoácido, opcionalmente L, X_3 es cualquier aminoácido, opcionalmente M, X_4 es cualquier aminoácido, opcionalmente T, X_5 es cualquier aminoácido, opcionalmente D o E, X_6 es cualquier aminoácido, opcionalmente N o S, X_7 es cualquier aminoácido, opcionalmente S o A, X_8 es cualquier aminoácido, opcionalmente M, X_9 es cualquier aminoácido, opcionalmente R o K, y X_{10} es cualquier aminoácido, opcionalmente A o P, opcionalmente en donde FRH3 no comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 350, en donde X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , X_9 y X_{10} son D, V, I, R, D, N, S, L, R y E, respectivamente, y/o

(iv) una FRH4 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en: (i-1) la secuencia de aminoácidos de FRH4 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381-399, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; (i-2) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 371 o 372; y/o (i-3) la secuencia de aminoácidos de SEQ

ID NO: 370, en donde X_1 es cualquier aminoácido, opcionalmente R o W y X_2 es cualquier aminoácido, opcionalmente Q o L.

[00443] Forma de realización B3. El anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo de la **Forma de realización B1** o **B2**, en donde en el VH:

(I) (I-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 381, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 321, 341 y 361; y (I-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 381;

(II) (II-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en cualquiera de SEQ ID NO: 382-385, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 322, 341 y 362; y (II-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 382-385;

(III) (III-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 386, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 321, 341 y 362; y (III-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 386;

(IV) (IV-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de

aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 387, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 323, 341 y 362; y (IV-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 387;

(V) (V-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 388, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 322, 341 y 361; y (V-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 388;

(VI) (VI-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 389, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 322, 341 y 300; y (VI-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 389;

(VII) (VII-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 390, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 322, 341 y 301; y (VII-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 390;

(VIII) (VIII-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 391, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 322, 341 y 302; y (VIII-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 391;

(IX) (IX-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 392, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 322, 341 y 303; y (IX-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 392;

(X) (X-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 393, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 321, 341 y 363; y (X-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 393;

(XI) (XI-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de

aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 394, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 321, 341 y 364; y (XI-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 394;

(XII) (XII-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 395, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 321, 341 y 365; y (XII-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 395;

(XIII) (XIII-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 396, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 321, 341 y 366; y (XIII-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 396;

(XIV) (XIV-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 397, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 321, 341 y 367; y (XIV-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 397;

(XV) (XV-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 398, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 321, 341 y 368; y (XV-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 398; o

(XVI) (XVI-1) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en: (i) la secuencia de aminoácidos de CDRH1, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3, respectivamente, contenidas en SEQ ID NO: 399, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y/o (ii) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 321, 341 y 369; y (XVI-2) opcionalmente el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 399.

[00444] Forma de realización B4. El anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización B1-B3**, en donde el VH comprende secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 381-399.

[00445] Forma de realización B5. El anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización B1-B4**, en donde el VH comprende secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 381.

[00446] Forma de realización B6. El anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización B1-B5**, que:

(i) es, comprende, o está incluido en un nanocuerpo o un fragmento Fd;

(ii) está incluido en un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo (que opcionalmente comprende una estructura como se representa en cualquiera de las **Figuras 24-35**, además opcionalmente, la **Figura 24**) que comprende (ii-1) una primera región de unión al antígeno específica para un primer antígeno, opcionalmente en donde el primer antígeno es Fzd4 y una segunda región de unión al antígeno que comprende dicho VH.

(iii) que además comprende un VL y es, comprende o está incluido en un fragmento Fab, Fab', un F(ab')₂, un scFab, un Fv, un scFv, un diacuerpo o un triacuerpo que comprende dicho VH y dicho VL.

[00447] Forma de realización B7. El anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización B1-B6**, que comprende uno o más de los siguientes:

(a) un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina 1 (CH1) o una variante de este, opcionalmente en donde el CH1 o una variante de este: (a-1) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano; y/o (a-2) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 o 22 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a esta;

(b) una bisagra de inmunoglobulina o una variante de esta, opcionalmente en donde la bisagra o una variante de esta: (b-1) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano; y/o (b-2) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a esta;

(c) un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina 2 (CH2) o una variante de este, opcionalmente en donde el CH2 o una variante de este: (c-1) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano; y/o (c-2) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 41-46 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a esta;

al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a esta;

(d) un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina 3 (CH3) o una variante de este, opcionalmente en donde el CH3 o una variante de este: (d-1) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano; y/o (d-2) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 51-54, 61-64 y 66-69 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C) o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a esta; y/o

(e) un dominio constante de la cadena liviana de inmunoglobulina (CL) o una variante de este, opcionalmente en donde el CL o una variante de este: (e-1) es de un dominio constante de la cadena liviana kappa (CL κ), opcionalmente CL κ humano y que comprende opcionalmente una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con respecto a esta; o (e-2) es de un dominio constante de la cadena liviana lambda (CL λ), opcionalmente CL λ humano y que comprende opcionalmente una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con respecto a esta, opcionalmente en donde el anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de CH2 y CH3 de SEQ ID NO: 42 y 51, respectivamente, SEQ ID NO: 43 y 51, respectivamente, SEQ ID NO: 45 y 61, respectivamente, SEQ ID NO: 45 y 66, respectivamente, SEQ ID NO: 46 y 61, respectivamente, o SEQ ID NO: 46 y 66, respectivamente.

[00448] Forma de realización B8. El anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización B1-B7**, que comprende una región de fragmento cristizable (Fc), opcionalmente en donde la región Fc:

(I) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano, o una variante de esta;

(II) es de: (i) una IgG1 o una variante de esta, que comprende opcionalmente

una o más de las siguientes sustituciones de aminoácido: N297A, N297Q, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, G236-eliminada, P238A, A327Q, A327G, P329A, P329G, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, P331S, F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L, S239D, I332E, S298A, E333A, K334A, L234Y, L235Q, G236W, S239M, H268D, D270E, K326D, A330M, K334E, G236A, K326W, S239D, E333S, S267E, H268F, S324T, E345R, E430G, S440Y M428L, N434S, H310A, L328F, M252Y, I253A, S254T, T256E, H435Q, H435A y/o cualquier combinación de esta, de acuerdo con la numeración de EU; (ii) una IgG2 o una variante de esta, que comprende opcionalmente una o más de las siguientes sustituciones de aminoácido: P238S, V234A, G237A, H268A, H268Q, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E y/o cualquier combinación de estas, de acuerdo con la numeración de EU; (iii) una IgG3 o una variante de esta, que comprende opcionalmente la sustitución de aminoácido E235Y, de acuerdo con la numeración de EU; o (iv) una IgG4 o una variante de esta, que comprende opcionalmente una o más de las siguientes sustituciones de aminoácido: E233P, F234V, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q y/o cualquier combinación de estas, de acuerdo con la numeración de EU:

(III) comprende una o más sustituciones de aminoácido que reducen una función efectora de Fc, opcionalmente en donde la una o más sustituciones de aminoácido están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 234, 235, 236, 237, 265, 297 y 329, de acuerdo con la numeración de EU;

(IV) comprende al menos las siguientes sustituciones de aminoácido de acuerdo con la numeración de EU: (ii-1) L234A, L235A y P329G; (ii-2) L234A y L235A; (ii-3) I253A, H310A y H435Q; (ii-4) I253A, H310A y H435A; (ii-5) D265A y P329A; (ii-6) M252Y, S254T y T256E; y/o (ii-7) M428L y N434S, opcionalmente con respecto a una región Fc de IgG1 humana y/o con cualquiera de SEQ ID NO: 71-74 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C); y/o

(V) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 71-74, 81-84, 86-89, 91-94, 96-99, 471-474, 476-479, 481-484 y 486-489 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C) o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o es 100 % idéntica a esta.

[00449] Forma de realización B9. Un ácido nucleico o una combinación de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo de

cualquiera de las **Formas de realización B1-B8**, opcionalmente en donde los ácidos nucleicos son ADN, cADN, ARN, mARN, mARN modificado o un híbrido de ADN/ARN.

[00450] Forma de realización B10. El ácido nucleico o una combinación de ácidos nucleicos de las **Formas de realización B9**, que comprende: (a) un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende dicho VH; y (b) un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que comprende dicho VL.

[00451] Forma de realización B11. Un vector o una combinación de vectores que comprende el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización B9 o B10**, opcionalmente en donde: (i) los vectores comprenden uno o más promotores ligados operativamente a los ácidos nucleicos; (ii) los vectores son un vector de expresión; y/o (iii) los vectores comprenden un plásmido, un vector viral (opcionalmente viral adenoasociado, adenoviral, lentiviral o retroviral), un vector a base de lípido, un vector de ARN de autorreplicación, una partícula tipo virus, un vector a base de polímero y/o una nanopartícula, opcionalmente una nanopartícula a base de lípidos.

[00452] Forma de realización B12. El vector o una combinación de vectores de la **Forma de realización B11**, que codifica el anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización B1-B8** y comprende: (a) un primer vector que comprende un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende dicho VH; y (b) un segundo vector que comprende un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que comprende dicho VL.

[00453] Forma de realización B13. Una célula huésped, que comprende: (A) el anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización B1-B8**; (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización B9 o B10**; y/o (C) el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización B11 o B12**, opcionalmente en donde la célula huésped es: (i) de mamífero, opcionalmente de ser humano, primate no humano, mono, conejo, roedor, hámster, rata o ratón; o (ii) no mamífero, opcionalmente de planta, bacteriana, fúngica, de levadura, protozoos o insectos, y opcionalmente en donde la célula huésped es: (i) una célula de riñón embrionario humano (HEK), opcionalmente una célula HEK293, o una variante de esta, además opcionalmente una célula Expi293F™; (ii) una célula CHO (ovario de hámster chino); (iii) una célula inmunitaria o (iv) un hibridoma.

[00454] Forma de realización B14. Una población de células, que comprende dos o más células huésped de la **Forma de realización B13**.

[00455] Forma de realización B15. Una composición farmacéutica, que

comprende: (I) (A) el anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización B1-B8**; (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización B9 o B10**; (C) el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización B11 o B12**; y/o (D) la célula huésped de la **Forma de realización B13** o la población de células de la **Forma de realización B14**; y (II) un portador y/o excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[00456] Forma de realización B16. Un método para tratar un sujeto que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de: (A) el anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización B1-B8**; (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización B9 o B10**; (C) el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización B11 o B12**; y/o (D) la célula huésped de la **Forma de realización B13** o la población de células de la **Forma de realización B14**; y/o (E) la composición farmacéutica de la **Forma de realización B15**, opcionalmente en donde: (a) el sujeto es (i) un mamífero, opcionalmente un ser humano, un primate no humano, un mono, un caballo, una vaca, oveja, una cabra, un cerdo, un perro, un gato, un conejo, un roedor, un hámster, una rata o un ratón; o (ii) un vertebrado no mamífero, opcionalmente un ave, pez, un anfibio o un reptil; (b) el sujeto comprende o presenta riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o una afección; y/o (c) el método comprende además administrar al sujeto un agente adicional, opcionalmente un adyuvante o un agente terapéutico.

[00457] Forma de realización B17. Un método para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o una afección en un sujeto que necesita dicho tratamiento, en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de: (A) el anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización B1-B8**; (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización B9 o B10**; (C) el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización B11 o B12**; y/o (D) la célula huésped de la **Forma de realización B13** o la población de células de la **Forma de realización B14**; y/o (E) la composición farmacéutica de la **Forma de realización B15**, opcionalmente en donde: (a) el sujeto es (i) un mamífero, opcionalmente un ser humano, un primate no humano, un mono, un caballo, una vaca, oveja, una cabra, un cerdo, un perro, un gato, un conejo, un roedor, un hámster, una rata, o un ratón; o (ii) un vertebrado no mamífero, opcionalmente un ave, pez, un anfibio o un reptil; y/o (b) el método comprende además administrar al sujeto un agente adicional, opcionalmente un adyuvante o un agente terapéutico.

[00458] Forma de realización B18. Un método para elaborar el anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización B1-B8**, que comprende: (a) cultivar células que comprenden el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización B9 o B10** en una afección que permite la expresión de dicho anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo y (b) recolectar y purificar el anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo del cultivo celular de (a).

[00459] Forma de realización B19. Un método para elaborar la célula huésped de la **Forma de realización B13** o la población de dichas células, que comprende introducir el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización B9 o B10** y/o el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización B11 o B12** en una o más células, opcionalmente en donde la introducción ocurre *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

[00460] Forma de realización C1. Un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo que comprende al menos: (A) una primera región de unión al antígeno que se une específicamente a Fzd4 y comprende un primer dominio variable de la cadena pesada (VH1) y un primer dominio variable de la cadena liviana (VL1), (B) una segunda región de unión al antígeno que se une específicamente a LRP5 y/o LRP6 y comprende al menos un segundo dominio variable de la cadena pesada (VH2), en donde: (A) el VH1 y el VL1 es de acuerdo con el VH y VL de cualquiera del anticuerpo anti-Fzd4 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización A1-A8**; y/o (B) el VH2 es de acuerdo con el VH de cualquiera del anticuerpo anti-LRP5/6 o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización B1-B8**.

[00461] Forma de realización C2. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de la **Forma de realización C1**, en donde: (A) la primera región de unión al antígeno es, comprende, o está incluida en un fragmento de unión al antígeno (Fab), un fragmento Fab', un F(ab')₂, un Fab monocatenario (scFab), un fragmento variable (Fv), un Fv monocatenario (scFv), un diacuerpo o un triacuerpo; y/o (B) la segunda región de unión al antígeno: (i) es, comprende, o está incluido en un nanocuerpo o un fragmento Fd; o (ii) comprende además un segundo dominio variable de la cadena liviana (VL2) y es, comprende, o está incluido en un Fab, un fragmento Fab', un F(ab')₂, un scFab, un Fv, un scFv, un diacuerpo o un triacuerpo.

[00462] Forma de realización C3. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de la **Forma de realización C1 o C2**, que comprende uno o más de los siguientes:

(a) un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina 1 (CH1) o una

variante de este, opcionalmente en donde el CH1 o una variante de este: (a-1) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano; y/o (a-2) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 o 22 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a esta;

(b) una bisagra de inmunoglobulina o una variante de esta, opcionalmente en donde la bisagra o una variante de esta: (b-1) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano; y/o (b-2) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a esta;

(c) un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina 2 (CH2) o una variante de este, opcionalmente en donde el CH2 o una variante de este: (c-1) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano; y/o (c-2) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 41-46 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a esta;

(d) un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina 3 (CH3) o una variante de este, opcionalmente en donde el CH3 o una variante de este: (d-1) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano; y/o (d-2) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 51-54, 61-64 y 66-69 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C) o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a esta; y/o

(e) un dominio constante de la cadena liviana de inmunoglobulina (CL) o una variante de este, opcionalmente en donde el CL o una variante de este: (e-1) es de un dominio constante de la cadena liviana kappa (CL_k), opcionalmente CL_k humano y que

comprende opcionalmente una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con respecto a esta; o (e-2) es de un dominio constante de la cadena liviana lambda (CL λ), opcionalmente CL λ humano y que comprende opcionalmente una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con respecto a esta, opcionalmente en donde el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de CH2 y CH3 SEQ ID NO: 42 y 51, respectivamente, SEQ ID NO: 43 y 51, respectivamente, SEQ ID NO: 45 y 61, respectivamente, SEQ ID NO: 45 y 66, respectivamente, SEQ ID NO: 46 y 61, respectivamente, o SEQ ID NO: 46 y 66, respectivamente.

[00463] Forma de realización C4. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización C1-C3**, que comprende una región Fc, opcionalmente en donde la región Fc:

(I) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano, o una variante de esta;

(II) es de: (i) una IgG1 o una variante de esta, que comprende opcionalmente una o más de las siguientes sustituciones de aminoácido: N297A, N297Q, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, G236-eliminada, P238A, A327Q, A327G, P329A, P329G, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, P331S, F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L, S239D, I332E, S298A, E333A, K334A, L234Y, L235Q, G236W, S239M, H268D, D270E, K326D, A330M, K334E, G236A, K326W, S239D, E333S, S267E, H268F, S324T, E345R, E430G, S440Y M428L, N434S, H310A, L328F, M252Y, I253A, S254T, T256E, H435Q, H435A y/o cualquier combinación de esta, de acuerdo con la numeración de EU; (ii) una IgG2 o una variante de esta, que comprende opcionalmente una o más de las siguientes sustituciones de aminoácido: P238S, V234A, G237A, H268A, H268Q, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E y/o cualquier combinación de estas, de acuerdo con la numeración de EU; (iii) una IgG3 o una variante de esta, que comprende opcionalmente la sustitución de aminoácido E235Y, de acuerdo con la numeración de EU; o (iv) una

IgG4 o una variante de esta, que comprende opcionalmente una o más de las siguientes sustituciones de aminoácido: E233P, F234V, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q y/o cualquier combinación de estas, de acuerdo con la numeración de EU:

(III) comprende una o más sustituciones de aminoácido que reducen una función efectora de Fc, opcionalmente en donde la una o más sustituciones de aminoácido están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 234, 235, 236, 237, 265, 297 y 329, de acuerdo con la numeración de EU;

(IV) comprende al menos las siguientes sustituciones de aminoácido de acuerdo con la numeración de EU: (ii-1) L234A, L235A y P329G; (ii-2) L234A y L235A; (ii-3) I253A, H310A y H435Q; (ii-4) I253A, H310A y H435A; (ii-5) D265A y P329A; (ii-6) M252Y, S254T y T256E; y/o (ii-7) M428L y N434S, opcionalmente con respecto a una región Fc de IgG1 humana y/o con cualquiera de SEQ ID NO: 71-74 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C); y/o

(V) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 71-74, 81-84, 86-89, 91-94, 96-99, 471-474, 476-479, 481-484 y 486-489 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C) o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o es 100 % idéntica a esta.

[00464] Forma de realización C5. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización C1-C4**, que comprende una estructura como se representa en cualquiera de las **Figuras 24-35**, opcionalmente cualquiera de las estructuras representadas en la **Figura 24**.

[00465] Forma de realización C6. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización C1-C5**, que comprende: (a) un primer polipéptido que comprende dicho VH1; y (b) un segundo polipéptido que comprende dicho VH2 y dicho VL1, en donde el primero y segundo polipéptidos interactúan entre sí, opcionalmente a través de uno o más enlaces disulfuro, lo que permite que dichos VH1 y VL1 formen dicha primera región de unión al antígeno, opcionalmente en donde:

(a) el primer polipéptido comprende lo siguiente en el orden del extremo N al extremo C:

(a-1) dicho VH1 y

(a-2) una CH1 o una variante de este, opcionalmente en donde la CH1 o una

variante de esta: (i) es de una IgG, opcionalmente de una IgG1 o una IgG4, además opcionalmente de IgG1 o IgG4 humana; y/o (ii) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 o 22 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o es 100 % idéntica a esta;

(a-3) una bisagra de inmunoglobulina o una variante de esta, opcionalmente en donde la bisagra o una variante de esta: (i) es de una IgG, opcionalmente de una IgG1 o una IgG4, además opcionalmente de IgG1 o IgG4 humana; y/o (ii) que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o es 100 % idéntica a esta;

(a-4) una CH2 o una variante de este, opcionalmente en donde la CH2 o una variante de esta: (i) es de una IgG, opcionalmente de una IgG1 o una IgG4, además opcionalmente de IgG1 o IgG4 humana; y/o (ii) que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 41-46 o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o es 100 % idéntica a esta; y

(a-5) una CH3 o una variante de este, opcionalmente en donde la CH3 o una variante de esta: (i) es de una IgG, opcionalmente de una IgG1 o una IgG4, además opcionalmente de IgG1 o IgG4 humana; y/o (ii) que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 51-54, 61-64 y 66-69 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C) o que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o es 100 % idéntica a esta; y/o

(b) el segundo polipéptido comprende lo siguiente en el orden del extremo N al extremo C:

(b-1) dicho VH2;

(b-2) opcionalmente un ligador, que es opcionalmente un ligador peptídico, además opcionalmente un ligador flexible, opcionalmente en donde el ligador: (i) comprende uno o más aminoácidos, opcionalmente uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce aminoácidos; (ii) consiste en pequeños

aminoácidos que consisten en G, S y/o A; (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, G, GG, GGG, GS, SG, GGS, GSG, SGG, GSS, SGS y SSG; y/o (iv) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en múltiples repeticiones de la secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, G, GG, GGG, GS, SG, GGS, GSG, SGG, GSS, SGS y SSG;

(b-3) dicho VL1; y (b-4) una CL o una variante de esta, opcionalmente en donde la CL o una variante de esta: (i) es de un CLK, opcionalmente CLK humano y que comprende opcionalmente una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con respecto a esta; o (ii) es de un CLA, opcionalmente CLA humano y que comprende opcionalmente una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con respecto a esta, además opcionalmente en donde el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo comprende: dos de dichos primeros polipéptidos que forman un dímero entre sí opcionalmente a través de uno o más enlaces disulfuro; y dos de dichos segundos polipéptidos, en donde uno de los segundos polipéptidos interactúa con uno de los primeros polipéptidos opcionalmente a través de un enlace disulfuro y el otro de los segundos polipéptidos interactúa con el otro de los primeros polipéptidos opcionalmente a través de un enlace disulfuro.

[00466] Forma de realización C7. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización C1-C6**, que comprende una región Fc, en donde la región Fc:

(I) es de una IgG, opcionalmente de una IgG1 o una IgG4, además opcionalmente de ser humano, o una variante de esta;

(II) comprende al menos las siguientes sustituciones de aminoácido de acuerdo con la numeración de EU: (ii-1) L234A, L235A y P329G; (ii-2) L234A y L235A; (ii-3) I253A, H310A y H435Q; y/o (ii-4) I253A, H310A y H435A, opcionalmente con respecto

a una región Fc de IgG1 humana y/o con respecto a cualquiera de SEQ ID NO: 71-74 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C); y/o

(III) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 71-74, 81-84, 86-89, 91-94, 96-99, 471-474, 476-479, 481-484 y 486-489 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C) o comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a esta.

[00467] Forma de realización C8. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización C1-C7**, que comprende: (a) un primer polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 7, 8, 9, 450, 451, 452 y 453 (opcionalmente sin K de extremo C); y (b) un segundo polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

[00468] Forma de realización C9. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de la **Forma de realización C8**, que comprende: dos de dichos primeros polipéptidos que forman un dímero entre sí a través de uno o más enlaces disulfuro; y dos de dichos segundos polipéptidos, en donde uno de los segundos polipéptidos interactúa con uno de los primeros polipéptidos a través de un enlace disulfuro y el otro de los segundos polipéptidos interactúa con el otro de los primeros polipéptidos a través de un enlace disulfuro.

[00469] Forma de realización C10. Un ácido nucleico o una combinación de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización C1-C9**, opcionalmente en donde los ácidos nucleicos son ADN, cADN, ARN, mARN, mARN modificado o un híbrido de ADN/ARN.

[00470] Forma de realización C11. El ácido nucleico o una combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización C10**, que comprende: (a) un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende dicho VH1; y (b) un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que comprende dicho VH2 y dicho VL1.

[00471] Forma de realización C12. Un vector o una combinación de vectores que comprende el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización C10 o C11**, opcionalmente en donde: (i) los vectores comprenden uno o

más promotores ligados operativamente a los ácidos nucleicos; (ii) los vectores son un vector de expresión; y/o (iii) los vectores comprenden un plásmido, un vector viral (opcionalmente viral adenoasociado, adenoviral, lentiviral o retroviral), un vector a base de lípido, un vector de ARN de autorreplicación, una partícula tipo virus, un vector a base de polímero y/o una nanopartícula, opcionalmente una nanopartícula a base de lípidos.

[00472] Forma de realización C13. El vector o una combinación de vectores de la **Forma de realización C12**, que codifica el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización C1-C9** y comprende: (a) un primer vector que comprende un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende dicho VH1; y (b) un segundo vector que comprende un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que comprende dicho VH2 y dicho VL1.

[00473] Forma de realización C14. Una célula huésped, que comprende: (A) el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización C1-C9**; (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización C10 o C11**; y/o (C) el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización C12 o C13**, opcionalmente en donde la célula huésped es: (i) de mamífero, opcionalmente de ser humano, primate no humano, mono, conejo, roedor, hámster, rata o ratón; o (ii) no mamífero, opcionalmente de planta, bacteriana, fúngica, de levadura, protozoos o insectos, y opcionalmente en donde la célula huésped es: (i) una célula de riñón embrionario humano (HEK), opcionalmente una célula HEK293, o una variante de esta, además opcionalmente una célula Expi293F™; (ii) una célula CHO (ovario de hámster chino); (iii) una célula inmunitaria o (iv) un hibridoma.

[00474] Forma de realización C15. Una población de células, que comprende dos o más células huésped de la **Forma de realización B13**.

[00475] Forma de realización C16. Una composición farmacéutica, que comprende: (I) (A) el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización C1-C9**; (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización C10 o C11**; (C) el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización C12 o C13**; y/o (D) la célula huésped de la **Forma de realización C14** o la población de células de la **Forma de realización C15**; y (II) un portador y/o excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[00476] Forma de realización C17. Un método para tratar un sujeto que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de: (A) el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de**

realización C1-C9; (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización C10 o C11**; (C) el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización C12 o C13**; y/o (D) la célula huésped de la **Forma de realización C14** o la población de células de la **Forma de realización C15**; y/o (E) la composición farmacéutica de la **Forma de realización C16**, opcionalmente en donde: (a) el sujeto es (i) un mamífero, opcionalmente un ser humano, un primate no humano, un mono, un caballo, una vaca, oveja, una cabra, un cerdo, un perro, un gato, un conejo, un roedor, un hámster, una rata o un ratón; o (ii) un vertebrado no mamífero, opcionalmente un ave, pez, un anfibio o un reptil; (b) el sujeto comprende o presenta riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o una afección; y/o (c) el método comprende además administrar al sujeto un agente adicional, opcionalmente un adyuvante o un agente terapéutico.

[00477] Forma de realización C18. Un método para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o una afección en un sujeto que necesita dicho tratamiento, en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de: (A) el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización C1-C9**; (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización C10 o C11**; (C) el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización C12 o C13**; y/o (D) la célula huésped de la **Forma de realización C14** o la población de células de la **Forma de realización C15**; y/o (E) la composición farmacéutica de la **Forma de realización C16**, opcionalmente en donde: (a) el sujeto es (i) un mamífero, opcionalmente un ser humano, un primate no humano, un mono, un caballo, una vaca, oveja, una cabra, un cerdo, un perro, un gato, un conejo, un roedor, un hámster, una rata, o un ratón; o (ii) un vertebrado no mamífero, opcionalmente un ave, pez, un anfibio o un reptil; y/o (b) el método comprende además administrar al sujeto un agente adicional, opcionalmente un adyuvante o un agente terapéutico.

[00478] Forma de realización C19. Un método para inducir, promover, estimular, potenciar y/o respaldar una señalización Wnt en una célula diana de un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de: (A) el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización C1-C9**; (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización C10 o C11**; (C) el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización C12 o C13**; y/o (D) la célula huésped de la **Forma de realización C14** o la población de células de la **Forma de realización C15**; y/o (E) la composición farmacéutica de la **Forma de realización C16**, opcionalmente en donde: (a) el sujeto es (i) un mamífero,

opcionalmente un ser humano, un primate no humano, un mono, un caballo, una vaca, oveja, una cabra, un cerdo, un perro, un gato, un conejo, un roedor, un hámster, una rata, o un ratón; o (ii) un vertebrado no mamífero, opcionalmente un ave, pez, un anfibio o un reptil; (b) el sujeto comprende o presenta riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o una afección; y/o (c) el método comprende además administrar al sujeto un agente adicional, opcionalmente un adyuvante o un agente terapéutico, y opcionalmente en donde: (i) la señalización Wnt es o comprende señalización Wnt/ β -catenina; y/o (ii) el método promueve, estimula, mejora y/o respalda el reclutamiento de múltiples complejos receptores, en donde cada uno comprende (ii-1) Fzd4 y (ii-2) LRP5 o LRP6.

[00479] Forma de realización C20. El método de cualquiera de las **Formas de realización C17-C19**, en donde la enfermedad, el trastorno o la afección comprende uno o más de los siguientes:

(a) una retinopatía, opcionalmente una enfermedad vascular retiniana (opcionalmente generada por la inhibición de desarrollo vascular o angiogénesis excesiva) y/u opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en vitreorretinopatía exudativa, vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR), retinopatía de premadurez, enfermedad de Norrie, retinopatía diabética (DR), edema macular diabético, isquemia macular diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD) (que incluye AMD húmeda y AMD seca), retinopatía de premadurez (ROP), síndrome de osteoporosis con pseudoglioma (OPPG), oclusión de la vena retiniana y enfermedad de Coats;

(b) un trastorno vascular, opcionalmente malformación vascular o deficiencia vascular, además opcionalmente asociada con neovascularización asociada con isquemia;

(c) una enfermedad ósea o fractura, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en osteoporosis (que incluye síndrome de osteoporosis con pseudoglioma (OPPG) y osteoporosis primaria juvenil), variabilidad de densidad mineral ósea y osteólisis asociada con cáncer;

(d) una enfermedad de desgaste muscular, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en sarcopenia, caquexia y distrofias musculares; y/o

(e) una enfermedad neuronal o neurodegenerativa, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en apoplejía, lesión cerebral traumática, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia de Friedreich, enfermedad de cuerpo de Lewy, atrofia muscular espinal, enfermedad de las neuronas motoras, esclerosis múltiple, enfermedad de

Batten y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

[00480] Forma de realización C21. El método de cualquiera de las **Formas de realización C17-C20**, en donde:

(I) la administración se realiza: (i) en uno o más de los ojos del sujeto, opcionalmente por vía intravítrea o por gotas oculares; (ii) con administración local, opcionalmente al ojo, oído, nariz (opcionalmente por vía intranasal), piel (opcionalmente por vía transdérmica o epicutánea), mucosa, piel o vagina, o mediante inhalación; o (iii) administración parenteral, opcionalmente mediante inyección (opcionalmente por administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intratecal, intraarterial, intraarticular, intraósea o intraperitoneal) o mediante inhalación; o (iv) administración entérica, opcionalmente por vía oral, sublingual, bucal o rectal; y/o

(II) la administración que comprende administrar el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-20 a uno o más de los ojos del sujeto a alrededor de 0,1-100000 ng por ojo, alrededor de 1-100000 ng por ojo, alrededor de 1-10000 ng por ojo, alrededor de 10-10000 ng por ojo, alrededor de 1-100 ng por ojo, alrededor de 200-300 ng por ojo, alrededor de 300-400 ng por ojo, alrededor de 400-500 ng por ojo, alrededor de 500-600 ng por ojo, alrededor de 600-700 ng por ojo, alrededor de 700-800 ng por ojo, alrededor de 800-900 ng por ojo, alrededor de 900-1000 ng por ojo, alrededor de 1000-2000 ng por ojo, alrededor de 2000-3000 ng por ojo, alrededor de 3000-4000 ng por ojo, alrededor de 4000-5000 ng por ojo, alrededor de 5000-6000 ng por ojo, alrededor de 6000-7000 ng por ojo, alrededor de 7000-8000 ng por ojo, alrededor de 8000-9000 ng por ojo, alrededor de 9000-10000 ng por ojo, alrededor de 10000-20000 ng por ojo, alrededor de 20000-30000 ng por ojo, alrededor de 30000-40000 ng por ojo, alrededor de 40000-50000 ng por ojo, alrededor de 50000-60000 ng por ojo, alrededor de 60000-70000 ng por ojo, alrededor de 70000-80000 ng por ojo, alrededor de 80000-90000 ng por ojo o alrededor de 90000-100000 ng por ojo.

[00481] Forma de realización C22. Un método para inducir, promover, estimular, potenciar y/o respaldar una señalización Wnt en una célula diana que comprende poner en contacto una célula diana con una cantidad eficaz de: (A) el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización C1-C9**; (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización C10** o **C11**; (C) el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización C12** o **C13**; y/o (D) la célula huésped de la **Forma de realización C14** o la población de células de la **Forma de realización C15**; y/o (E) la composición farmacéutica de la **Forma de realización C16**, opcionalmente en donde: (I) el contacto

ocurre *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, (II) el método es para (i) preparar una célula y/o tejido para implantación, (ii) diferenciación de una célula madre y/o (iii) preparación de un organoide, (III) el método es para la formación ósea, la formación vascular y/o la formación neuronal y/o diferenciación.

[00482] Forma de realización C23. Un método para elaborar el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización C1-C9**, que comprende: (a) cultivar células que comprenden el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización C10** o **C11** en una afección que permite la expresión de dicho anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo y (b) recolectar y purificar el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo del cultivo celular de (a).

[00483] Forma de realización C24. Un método para elaborar la célula huésped de la **Forma de realización C14** o la población de dichas células, que comprende introducir el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización C10** o **C11** y/o el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización C12** o **C13** en una o más células, opcionalmente en donde la introducción ocurre *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

[00484] Formas de realización C25. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización C1-C9**; el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización C10** o **C11**; el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización C12** o **C13**; la célula huésped de la **Forma de realización C14** o la población de células de la **Forma de realización C15**; y/o la composición farmacéutica de la **Forma de realización C16**, para su uso en medicina.

[00485] Formas de realización C26. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización C1-C9**; el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización C10** o **C11**; el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización C12** o **C13**; la célula huésped de la **Forma de realización C14** o la población de células de la **Forma de realización C15**; y/o la composición farmacéutica de la **Forma de realización C16**, para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección, opcionalmente en donde la enfermedad, el trastorno o la afección comprende una o más de las indicadas en las **Formas de realización C20**.

[00486] Formas de realización C27. El uso del anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las **Formas de realización C1-C9**; el ácido

nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de la **Forma de realización C10** o **C11**; el vector o la combinación de vectores de la **Forma de realización C12** o **C13**; la célula huésped de la **Forma de realización C14** o la población de células de la **Forma de realización C15**; y/o la composición farmacéutica de la **Forma de realización C16**, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección, opcionalmente en donde la enfermedad, el trastorno o la afección comprende una o más de las indicadas en las **Formas de realización C20**.

APÉNDICE

APÉNDICE Tabla A: Anti-Fzd4 VH CDR y secuencias de FR definidas por Kabat

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencias	Notas
110	Secuencia común de anti-Fzd4 FRH1	EVQLVESGGGLV <u>X</u> ₁ PG GSLRLSCAASGFTFT	X ₁ es cualquier aminoácido.
111	Anti-Fzd4 FRH1	EVQLVESGGGLV <u>Q</u> PGG SLRLSCAASGFTFT	
112	Anti-Fzd4 FRH1	EVQLVESGGGLV <u>K</u> PGG SLRLSCAASGFTFT	
120	Secuencia común anti-Fzd4 CDRH1	<u>X</u> ₁ YAMS	X ₁ es cualquier aminoácido.
121	Anti-Fzd4 CDRH1	<u>S</u> YAMS	
122	Anti-Fzd4 CDRH1	<u>N</u> YAMS	
123	Anti-Fzd4 CDRH1	<u>A</u> YAMS	
124	Anti-Fzd4 CDRH1	<u>Q</u> YAMS	
130	Secuencia común anti-Fzd4 FRH2	WVRQAPGKGLEWVS	
131	Anti-Fzd4 FRH2	WVRQAPGKGLEWVS	
140	Secuencia común de anti-Fzd4 CDRH2	AISGSGGSTYYA <u>X</u> ₁ SVK G	X ₁ es cualquier aminoácido.
141	Anti-Fzd4 CDRH2	AISGSGGSTYYA <u>E</u> SVK G	
142	Anti-Fzd4 CDRH2	AISGSGGSTYYA <u>D</u> SVK G	
143	Anti-Fzd4 CDRH2	AISGSGGSTYYA <u>A</u> SVK G	
144	Anti-Fzd4 CDRH2	AISGSGGSTYYA <u>S</u> SVK G	
150	Secuencia común de anti-Fzd4 FRH3	RFTISRDX <u>1</u> SKNTLYLQ MNSL <u>X</u> ₂ <u>X</u> ₃ EDTAVYYCA R	X ₁ es cualquier aminoácido; X ₂ es cualquier aminoácido; y X ₃ es cualquier

			aminoácido.
151	Anti-Fzd4 FRH3	RFTISRDN <u>NS</u> KNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR	
152	Anti-Fzd4 FRH3	RFTISRDD <u>S</u> KNTLYLQM NSLK <u>T</u> EDTAVYYCAR	
160	Secuencia común de anti-Fzd4 CDRH3	ATGFGTVVFX ₁ Y	X ₁ es cualquier aminoácido.
161	Anti-Fzd4 CDRH3	ATGFGTVVFDY	
170	Secuencia común de anti-Fzd4 FRH4	WGQGTLVTVSS	
171	Anti-Fzd4 FRH4	WGQGTLVTVSS	

APÉNDICE Tabla B: Secuencias de VH anti-Fzd4

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencias	Notas
180	Secuencia común de VH anti-Fzd4	EVQLVESGGGLVX ₁ PGGSLRL SCAASGFTFTX ₂ YAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTYYA X ₃ SVKGRFTISRDX ₄ SKNTLYLQ MNSLX ₅ X ₆ EDTAVYYCARATGF GTVVFX ₇ YWGQGTLVTVSS	X ₁ es cualquier aminoácido; X ₂ es cualquier aminoácido; X ₃ es cualquier aminoácido; X ₄ es cualquier aminoácido; X ₅ es cualquier aminoácido; X ₆ es cualquier aminoácido; y X ₇ es cualquier aminoácido.
181	VH anti-Fzd4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFTSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYAE SVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARATGFGT VVDYWGQGTLVTVSS	
182	VH anti-Fzd4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFTNYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQM NSLKTEDTAVYYCARATGFGT VVDYWGQGTLVTVSS	
183	VH anti-Fzd4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFTQYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQM NSLKTEDTAVYYCARATGFGT VVDYWGQGTLVTVSS	

184	VH anti-Fzd4	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLS CAASGFTFTSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQM NSLKTEDTAVYYCARATGFGT VFDYWGQGTLVTVSS	
185	VH anti-Fzd4	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLS CAASGFTFTAYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQM NSLKTEDTAVYYCARATGFGT VFDYWGQGTLVTVSS	
186	VH anti-Fzd4	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLS CAASGFTFTNYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYAS SVKGRFTISRDDSKNTLYLQM NSLKTEDTAVYYCARATGFGT VFDYWGQGTLVTVSS	
187	VH anti-Fzd4	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLS CAASGFTFTNYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYAE SVKGRFTISRDDSKNTLYLQM NSLKTEDTAVYYCARATGFGT VFDYWGQGTLVTVSS	
188	VH anti-Fzd4	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLS CAASGFTFTNYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYAA SVKGRFTISRDDSKNTLYLQM NSLKTEDTAVYYCARATGFGT VFDYWGQGTLVTVSS	

APÉNDICE Tabla C: Anti-Fzd4 VL y VL CDR y secuencias de FR

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencias
211	Anti-Fzd4 FRL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
221	Anti-Fzd4 CDRL1	RASQSISSYLN
231	Anti-Fzd4 FRL2	WYQQKPGKAPKLLIY
241	Anti-Fzd4 CDRL2	AASSLQS
251	Anti-Fzd4 FRL3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
261	Anti-Fzd4 CDRL3	QQSYSTPLT
271	Anti-Fzd4 FRL4	FGGGTKVEIK

281	VL anti-Fzd4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK
-----	--------------	--

APÉNDICE Tabla D: Anti-LRP5/6 VH CDR y secuencias de FR

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencias	Notas
310	Secuencia común de anti-LRP5/6 FRH1	<u>X</u> ₁ VQLVESGGGLVQPGGSLRLSC <u>X</u> ₂ <u>X</u> ₃ S	X ₁ es cualquier aminoácido; X ₂ es cualquier aminoácido; y X ₃ es cualquier aminoácido.
311	Anti-LRP5/6 FRH1	<u>E</u> VQLVESGGGLVQPGGSLRLSC <u>A</u> SS	
312	Anti-LRP5/6 FRH1	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSS	
320	Secuencia común de anti-LRP5/6 CDRH1	AN <u>I</u> <u>X</u> ₁ SIET	X ₁ es cualquier aminoácido.
321	Anti-LRP5/6 CDRH1	AN <u>I</u> <u>Q</u> SIET	
322	Anti-LRP5/6 CDRH1	AN <u>I</u> <u>N</u> SIET	
323	Anti-LRP5/6 CDRH1	AN <u>I</u> <u>S</u> SIET	
330	Secuencia común de anti-LRP5/6 FRH2	LGW <u>X</u> ₁ RQAPGK <u>X</u> ₂ <u>X</u> ₃ <u>E</u> <u>X</u> ₄ <u>X</u> ₅ <u>X</u> ₆	X ₁ es cualquier aminoácido; X ₂ es cualquier aminoácido; X ₃ es cualquier aminoácido; X ₄ es cualquier aminoácido; X ₅ es cualquier aminoácido; y X ₆ es cualquier aminoácido.
331	Anti-LRP5/6 FRH2	LGWY <u>R</u> QAPGK <u>Q</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>A</u>	
332	Anti-LRP5/6 FRH2	LGWY <u>R</u> QAPGK <u>G</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>I</u> <u>A</u>	
333	Anti-LRP5/6 FRH2	LGWY <u>R</u> QAPGK <u>Q</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>I</u> <u>A</u>	
340	Secuencia común de anti-LRP5/6 CDRH2	N <u>X</u> ₁ RGGGY <u>X</u> ₂	X ₁ es cualquier aminoácido; y X ₂ es cualquier aminoácido.
341	Anti-LRP5/6 CDRH2	N <u>M</u> RGGGY <u>M</u>	

350	Secuencia común de anti-LRP5/6 FRH3	KYAX ₁ SX ₂ KGRFTX ₃ SX ₄ X ₅ X ₆ X ₇ KNTX ₈ YLQMNSLX ₉ X ₁₀ EDTAVYYC	X ₁ es cualquier aminoácido; X ₂ es cualquier aminoácido; X ₃ es cualquier aminoácido; X ₄ es cualquier aminoácido; X ₅ es cualquier aminoácido; X ₆ es cualquier aminoácido; X ₇ es cualquier aminoácido; X ₈ es cualquier aminoácido; X ₉ es cualquier aminoácido; y X ₁₀ es cualquier aminoácido.
351	Anti-LRP5/6 FRH3	KYADSLKGRFTMSTDNSKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYC	
352	Anti-LRP5/6 FRH3	KYAGSLKGRFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYC	
360	Secuencia común de anti-LRP5/6 CDRH3	YVKLRX ₁ X ₂ X ₃ YVY	X ₁ es cualquier aminoácido; X ₂ es cualquier aminoácido; y X ₃ es cualquier aminoácido.
361	Anti-LRP5/6 CDRH3	YVKLRDEDYVY	
362	Anti-LRP5/6 CDRH3	YVKLRDDDYVY	
363	Anti-LRP5/6 CDRH3	YVKLRDEEYVY	
364	Anti-LRP5/6 CDRH3	YVKLRDESYVY	
365	Anti-LRP5/6 CDRH3	YVKLRDEAYVY	
366	Anti-LRP5/6 CDRH3	YVKLRDETYVY	
367	Anti-LRP5/6 CDRH3	YVKLRSEYVY	
368	Anti-LRP5/6 CDRH3	YVKLRSTYVY	
369	Anti-LRP5/6 CDRH3	YVKLRESSYVY	
300	Anti-LRP5/6 CDRH3	YVKLREDEYVY	
301	Anti-LRP5/6 CDRH3	YVKLRESDYVY	
302	Anti-LRP5/6 CDRH3	YVKLRSDEYVY	
303	Anti-LRP5/6	YVKLRSSDYVY	

	CDRH3		
370	Secuencia común de anti-LRP5/6 FRH4	<u>X</u> ₁ GQGT <u>X</u> ₂ VTVSS	X ₁ es cualquier aminoácido; y X ₂ es cualquier aminoácido.
371	Anti-LRP5/6 FRH4	<u>R</u> GQGT <u>Q</u> VTVSS	
372	Anti-LRP5/6 FRH4	<u>W</u> GQGT <u>L</u> VTVSS	

APÉNDICE Tabla E: Secuencias de anti-LRP5/6 VH

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencias	Notas
380	Secuencia común de anti-LRP5/6 VH	X ₁ VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCX ₂ X ₃ SANIX ₄ SIETLGWX ₅ RQAPGKX ₆ X ₇ EX ₈ X ₉ X ₁₀ NX ₁₁ RGGGYX ₁₂ KYAX ₁₃ SX ₁₄ KGRFTX ₁₅ SX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ KNTX ₂₀ YMQMNSLX ₂₁ X ₂₂ EDTAVYYCYVKLRX ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ YVYX ₂₆ GQGTX ₂₇ VTVSS	X ₁ es cualquier aminoácido; X ₂ es cualquier aminoácido; y X ₃ es cualquier aminoácido; X ₄ es cualquier aminoácido; X ₅ es cualquier aminoácido; X ₆ es cualquier aminoácido; X ₇ es cualquier aminoácido; X ₈ es cualquier aminoácido; X ₉ es cualquier aminoácido; y X ₁₀ es cualquier aminoácido; X ₁₁ es cualquier aminoácido; X ₁₂ es cualquier aminoácido; X ₁₃ es cualquier aminoácido; X ₁₄ es cualquier aminoácido; X ₁₅ es cualquier aminoácido; X ₁₆ es cualquier aminoácido; X ₁₇ es cualquier aminoácido; X ₁₈ es cualquier aminoácido; X ₁₉ es cualquier aminoácido; X ₂₀ es cualquier aminoácido; X ₂₁ es cualquier aminoácido; X ₂₂ es cualquier aminoácido; X ₂₃ es cualquier aminoácido; X ₂₄ es cualquier aminoácido; X ₂₅ es cualquier aminoácido; X ₂₆ es cualquier aminoácido; y X ₂₇ es cualquier aminoácido.
381	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSANIQSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYADSLKGRFTMSTDNSKNTMYLQMNSLRAEDT	

		AVYYCYVKLRDEDYVYRG QGTQVTVSS	
382	Anti-LRP5/6 VH	DVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCTSSANINSIETLGW YRQAPGKQRELIANMRGG GYMKYAGSLKGRFTMSTE SAKNTMYLQMNSLKPEDT AVYYCYVKLRDDDYVYRG QGTQVTVSS	
383	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANINSIETLGWY RQAPGKGREWIANMRGG GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLRDDDYVYW GQGTLVTVSS	
384	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANINSIETLGWY RQAPGKQREWIANMRGG GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLRDDDYVYW GQGTLVTVSS	
385	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANINSIETLGWY RQAPGKQRELIANMRGG GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLRDDDYVYRG QGTQVTVSS	
386	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANIQSIETLGWY RQAPGKQRELIANMRGG GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLRDDDYVYRG QGTQVTVSS	
387	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANISSIETLGWY RQAPGKQRELIANMRGG GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLRDDDYVYRG QGTQVTVSS	

388	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANINSIETLGWY RQAPGKQRELIANMRGG GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLRDEDYVYRG QGTQVTVSS	
389	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANINSIETLGWY RQAPGKQRELIANMRGG GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLREDEYVYRG QGTQVTVSS	
390	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANINSIETLGWY RQAPGKQRELIANMRGG GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLRSDYVYRG QGTQVTVSS	
391	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANINSIETLGWY RQAPGKQRELIANMRGG GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLRSDEYVYRG QGTQVTVSS	
392	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANINSIETLGWY RQAPGKQRELIANMRGG GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLRSSDYVYRG QGTQVTVSS	
393	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANIQSIETLGWY RQAPGKQRELIANMRGG GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLRDEEYVYRG QGTQVTVSS	
394	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANIQSIETLGWY RQAPGKQRELIANMRGG	

		GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLRDESYVYRG QGTQVTVSS	
395	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANIQSIETLGWY RQAPGKQRELIANMRGG GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLRDEAYVYRG QGTQVTVSS	
396	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANIQSIETLGWY RQAPGKQRELIANMRGG GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLRDETYVYRG QGTQVTVSS	
397	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANIQSIETLGWY RQAPGKQRELIANMRGG GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLRESEYVYRG QGTQVTVSS	
398	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANIQSIETLGWY RQAPGKQRELIANMRGG GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLRETYVYRG QGTQVTVSS	
399	Anti-LRP5/6 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCASSANIQSIETLGWY RQAPGKQRELIANMRGG GYMKYADSLKGRFTMSTD NSKNTMYLQMNSLRAEDT AVYYCYVKLRESSYVYRG QGTQVTVSS	

APÉNDICE Tabla F: Secuencias de unidad ligadora

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencias
101	Unidad ligadora 1	GGGGS
102	Unidad ligadora 2	GGSGS
103	Unidad ligadora 3	GSGSG

104	Unidad ligadora 4	GGGS
105	Unidad ligadora 5	GGGGGS

APÉNDICE Tabla G: Secuencias de dominio constante

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencias
11	CK de IgG humana	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
12	CL de IgG humana	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN KYAASSYLSTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST VEKTVAPECS
21	CH1 de IgG1 humana, referencia 1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK V
22	CH1 de IgG1 humana, referencia 2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RV
31	Bisagra de IgG1 humana, referencia	EPKSCDKTHTCPPCP
41	CH2 de IgG1 humana, referencia	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAK
42	CH2 de IgG1 humana, referencia + LALAPG	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAK
43	CH2 de IgG1 humana, referencia + LALA	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAK
44	CH2 de IgG1 humana, referencia + IAHA	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAK
45	CH2 de IgG1 humana, referencia + LALAPG-IAHA	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTISKAK
46	CH2 de IgG1	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCV

	humana, referencia + LALA-IAHA	VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVL <u>A</u> QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
51	CH3 de IgG1 humana, referencia 1 (356E y 358M)	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
52	CH3 de IgG1 humana, referencia 2 (356D y 358L)	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
53	CH3 de IgG1 humana, referencia 3 (356D, 358L y V422I)	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
54	CH3 de IgG1 humana, referencia 4 (356D, 358L y A431G)	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNH YTQKSLSLSPGK
61	CH3 de IgG1 humana, referencia 1 + HQ	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN <u>Q</u> YTQKSLSLSPGK
62	CH3 de IgG1 humana, referencia 2 + HQ	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN <u>Q</u> YTQKSLSLSPGK
63	CH3 de IgG1 humana, referencia 3 + HQ	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHN <u>Q</u> Y TQKSLSLSPGK
64	CH3 de IgG1 humana, referencia 4 + HQ	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHN <u>Q</u> YTQKSLSLSPGK
66	CH3 de IgG1 humana, referencia 1 + HA	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN <u>A</u> YTQKSLSLSPGK
67	CH3 de IgG1 humana, referencia 2 + HA	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN <u>A</u> YTQKSLSLSPGK
68	CH3 de IgG1 humana, referencia 3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF

	+ HA	FLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHN <u>AY</u> TQKSLSLSPGK
69	CH3 de IgG1 humana, referencia 4 + HA	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCSVMHEGLHN <u>A</u> YTQKSLSLSPGK

Los residuos subrayados son diferencias con respecto a la secuencia de referencia correspondiente.

APÉNDICE Tabla H: Secuencias de la región Fc

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencias
71	Fc de IgG1 humana, referencia 1 (356E y 358M)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
72	Fc de IgG1 humana, referencia 2 (356D y 358L)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
73	Fc de IgG1 humana, referencia 3 (356D, 358L y V422I)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNIFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
74	Fc de IgG1 humana, referencia 4 (356D, 358L y A431G)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK
81	Fc de IgG1 humana, referencia 1 + LALAPG	DKTHTCPPCPAPE <u>A</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKAL <u>G</u> APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

		PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
82	Fc de IgG1 humana, referencia 2 + LALAPG	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
83	Fc de IgG1 humana, referencia 3 + LALAPG	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNIFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
84	Fc de IgG1 humana, referencia 4 + LALAPG	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK
86	Fc de IgG1 humana, referencia 1 + LALA	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
87	Fc de IgG1 humana, referencia 2 + LALA	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
88	Fc de IgG1 humana, referencia 3 + LALA	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNIFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
89	Fc de IgG1	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS

	humana, referencia 4 + LALA	RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK
91	Fc de IgG1 humana, referencia 1 + IAHAHQ	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMAS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNQYTQKSLSLSPGK
92	Fc de IgG1 humana, referencia 2 + IAHAHQ	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMAS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNQYTQKSLSLSPGK
93	Fc de IgG1 humana, referencia 3 + IAHAHQ	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMAS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNIFSCSVMHEALHNQYTQKSLSLSPGK
94	Fc de IgG1 humana, referencia 4 + IAHAHQ	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMAS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEGLHNQYTQKSLSLSPGK
96	Fc de IgG1 humana, referencia 1 + IAHAHA	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMAS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
97	Fc de IgG1 humana, referencia 2 + IAHAHA	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMAS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP

		SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHN <u>A</u> YTQKSLSLSPGK
98	Fc de IgG1 humana, referencia 3 + IAHAHA	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM <u>A</u> S RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL <u>A</u> QDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNIFSCSVMHEALHN <u>A</u> YTQKSLSLSPGK
99	Fc de IgG1 humana, referencia 4 + IAHAHA	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM <u>A</u> S RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL <u>A</u> QDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEGLHN <u>A</u> YTQKSLSLSPGK
471	Fc de IgG1 humana, referencia 1 + LALAPG- IAHAHQ	DKTHTCPPCPAPE <u>A</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL <u>A</u> QDWLNGKE YKCKVSNKAL <u>G</u> APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHN <u>Q</u> YTQKSLSLSPGK
472	Fc de IgG1 humana, referencia 2 + LALAPG- IAHAHQ	DKTHTCPPCPAPE <u>A</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL <u>A</u> QDWLNGKE YKCKVSNKAL <u>G</u> APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHN <u>Q</u> YTQKSLSLSPGK
473	Fc de IgG1 humana, referencia 3 + LALAPG- IAHAHQ	DKTHTCPPCPAPE <u>A</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL <u>A</u> QDWLNGKE YKCKVSNKAL <u>G</u> APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNIFSCSVMHEALHN <u>Q</u> YTQKSLSLSPGK
474	Fc de IgG1 humana, referencia 4 + LALAPG- IAHAHQ	DKTHTCPPCPAPE <u>A</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL <u>A</u> QDWLNGKE YKCKVSNKAL <u>G</u> APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEGLHN <u>Q</u> YTQKSLSLSPGK

476	Fc de IgG1 humana, referencia 1 + LALAPG-IAHAHA	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
477	Fc de IgG1 humana, referencia 2 + LALAPG-IAHAHA	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
478	Fc de IgG1 humana, referencia 3 + LALAPG-IAHAHA	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
479	Fc de IgG1 humana, referencia 4 + LALAPG-IAHAHA	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNAYTQKSLSLSPGK
481	Fc de IgG1 humana, referencia 1 + LALA-IAHAHQ	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNQYTQKSLSLSPGK
482	Fc de IgG1 humana, referencia 2 + LALA-IAHAHQ	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNQYTQKSLSLSPGK
483	Fc de IgG1 humana, referencia 3 +	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEY

	LALA-IAHAHQ	YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNQYTQKSLSLSPGK
484	Fc de IgG1 humana, referencia 4 + LALA-IAHAHQ	DKTHTCPPCPAPEA <u>A</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLA <u>Q</u> DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHN <u>Q</u> YTQKSLSLSPGK
486	Fc de IgG1 humana, referencia 1 + LALA-IAHAHA	DKTHTCPPCPAPEA <u>A</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLA <u>Q</u> DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN <u>A</u> YTQKSLSLSPGK
487	Fc de IgG1 humana, referencia 2 + LALA-IAHAHA	DKTHTCPPCPAPEA <u>A</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLA <u>Q</u> DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN <u>A</u> YTQKSLSLSPGK
488	Fc de IgG1 humana, referencia 3 + LALA-IAHAHA	DKTHTCPPCPAPEA <u>A</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLA <u>Q</u> DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHN <u>A</u> YTQKSLSLSPGK
489	Fc de IgG1 humana, referencia 4 + LALA-IAHAHA	DKTHTCPPCPAPEA <u>A</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLA <u>Q</u> DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHN <u>A</u> YTQKSLSLSPGK

Los residuos subrayados son diferencias con respecto a la secuencia de referencia correspondiente.

APÉNDICE Tabla I: Biespecíficos – secuencias comunes de ejemplo

SEQ	Nombre	Secuencias	Notas
-----	--------	------------	-------

ID NO:			
401	Secuencia común de LC biespecífica	X ₁ VQLVESGGGLVQP GGSLRLSCX ₂ X ₃ SANIX ₄ SIETLGWX ₅ RQAPGK X ₆ X ₇ EX ₈ X ₉ X ₁₀ NX ₁₁ RGG GYX ₁₂ KYAX ₁₃ SX ₁₄ KGR FTX ₁₅ SX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ KN TX ₂₀ YLQMNSLX ₂₁ X ₂₂ E DTAVYYCYVKLRX ₂₃ X ₂ ₄ X ₂₅ YVYX ₂₆ GQGTXT ₂₇ VT VSSGGGGSDIQMTQS PSSLSASVGDRVITC RASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATY YCQQSYSTPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQW KVADNLQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSTL TLKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFN RGEK	X ₁ es cualquier aminoácido; X ₂ es cualquier aminoácido; y X ₃ es cualquier aminoácido; X ₄ es cualquier aminoácido; X ₅ es cualquier aminoácido; X ₆ es cualquier aminoácido; X ₇ es cualquier aminoácido; X ₈ es cualquier aminoácido; X ₉ es cualquier aminoácido; y X ₁₀ es cualquier aminoácido; X ₁₁ es cualquier aminoácido; X ₁₂ es cualquier aminoácido; X ₁₃ es cualquier aminoácido; X ₁₄ es cualquier aminoácido; X ₁₅ es cualquier aminoácido; X ₁₆ es cualquier aminoácido; X ₁₇ es cualquier aminoácido; X ₁₈ es cualquier aminoácido; X ₁₉ es cualquier aminoácido; X ₂₀ es cualquier aminoácido; X ₂₁ es cualquier aminoácido; X ₂₂ es cualquier aminoácido; X ₂₃ es cualquier aminoácido; X ₂₄ es cualquier aminoácido; X ₂₅ es cualquier aminoácido; X ₂₆ es cualquier aminoácido; y X ₂₇ es cualquier aminoácido.
402	Secuencia común de HC biespecífica (LALAPG)	EVQLVESGGGLVX ₁ PG GSLRLSCAASGFTFTX ₂ YAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYY AX ₃ SVKGRFTISRDX ₄ S KNTLYLQMNSLX ₅ X ₆ E DTAVYYCARATGFGT VVF ₇ X ₇ YWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVK DYFPEPTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKHTT CPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRT	X ₁ es cualquier aminoácido; X ₂ es cualquier aminoácido; X ₃ es cualquier aminoácido; X ₄ es cualquier aminoácido; X ₅ es cualquier aminoácido; X ₆ es cualquier aminoácido; y X ₇ es cualquier aminoácido.

		PEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNNHYTQKS LSLSPGK	
407	Secuencia común de HC biespecífica (LALA)	EVQLVESGGGLVX ₁ PG GSLRLSCAASGFTFTX ₂ YAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYY AX ₃ SVKGRFTISRDX ₄ S KNTLYLQMNSLX ₅ X ₆ E DTAVYYCARATGFGT VVFX ₇ YWGGGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSVTVTPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNNHYTQKS LSLSPGK	X ₁ es cualquier aminoácido; X ₂ es cualquier aminoácido; X ₃ es cualquier aminoácido; X ₄ es cualquier aminoácido; X ₅ es cualquier aminoácido; X ₆ es cualquier aminoácido; y X ₇ es cualquier aminoácido.
408	Secuencia común de HC biespecífica (IAHAHQ)	EVQLVESGGGLVX ₁ PG GSLRLSCAASGFTFTX ₂ YAMSWVRQAPGKGL	X ₁ es cualquier aminoácido; X ₂ es cualquier aminoácido; X ₃ es cualquier aminoácido; X ₄ es

		EWVSAISGSGGSTYY AX ₃ SVKGRFTISRDX ₄ S KNTLYLQMNSLX ₅ X ₆ E DTAVYYCARATGFGT VVFX ₇ YWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMAS RTP EVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLAQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPVY TLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNQYTQKSL SLSPGK	cualquier aminoácido; X ₅ es cualquier aminoácido; X ₆ es cualquier aminoácido; y X ₇ es cualquier aminoácido.
409	Secuencia común de HC biespecífica (IAHAHA)	EVQLVESGGGLVX ₁ PG GSLRLSCAASGFTFTX ₂ YAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYY AX ₃ SVKGRFTISRDX ₄ S KNTLYLQMNSLX ₅ X ₆ E DTAVYYCARATGFGT VVFX ₇ YWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMAS RTP EVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNA	X ₁ es cualquier aminoácido; X ₂ es cualquier aminoácido; X ₃ es cualquier aminoácido; X ₄ es cualquier aminoácido; X ₅ es cualquier aminoácido; X ₆ es cualquier aminoácido; y X ₇ es cualquier aminoácido.

		KTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLAQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCS VMHEALHN A YTQKSL SLSPGK	
460	Secuencia común de HC biespecífica (LALAPG- IAHAHQ)	EVQLVESGGGLVX ₁ PG GSLRLSCAASGFTFTX Y ₂ AMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYY AX ₃ SVKGRFTISRDX ₄ S KNTLYLQMNSLX ₅ X ₆ E DTAVYYCARATGFGT VVF ₇ X ₇ YWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPE A AGGPSV FLFPPKPKDTLM A SRT PEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYR VSVLTVL A QDWLNG KEYKCKVSNKAL G API EKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHN Q YTQKS LSLSPGK	X ₁ es cualquier aminoácido; X ₂ es cualquier aminoácido; X ₃ es cualquier aminoácido; X ₄ es cualquier aminoácido; X ₅ es cualquier aminoácido; X ₆ es cualquier aminoácido; y X ₇ es cualquier aminoácido.
461	Secuencia común de HC biespecífica (LALAPG- IAHAHA)	EVQLVESGGGLVX ₁ PG GSLRLSCAASGFTFTX Y ₂ AMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYY AX ₃ SVKGRFTISRDX ₄ S	X ₁ es cualquier aminoácido; X ₂ es cualquier aminoácido; X ₃ es cualquier aminoácido; X ₄ es cualquier aminoácido; X ₅ es cualquier aminoácido; X ₆ es

		KNTLYLQMNSLX ₅ X ₆ E DTAVYYCARATGFGT VVF ₇ YWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPE A AGGPSV FLFPPKPKDTLM A SRT PEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYR VVS ₇ LTVL A QDWLNG KEYKCKVSNKAL G API EKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHN A YTQKS LSLSPGK	cualquier aminoácido; y X ₇ es cualquier aminoácido.
462	Secuencia común de HC biespecífica (LALA-IAHAHQ)	EVQLVESGGGLVX ₁ PG GSLRLSCAASGFTFTX ₂ YAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYY AX ₃ SVKGRFTISRDX ₄ S KNTLYLQMNSLX ₅ X ₆ E DTAVYYCARATGFGT VVF ₇ YWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPE A AGGPSV FLFPPKPKDTLM A SRT PEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYR VVS ₇ LTVL A QDWLNG	X ₁ es cualquier aminoácido; X ₂ es cualquier aminoácido; X ₃ es cualquier aminoácido; X ₄ es cualquier aminoácido; X ₅ es cualquier aminoácido; X ₆ es cualquier aminoácido; y X ₇ es cualquier aminoácido.

		KEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNQYTQKS LSLSPGK	
463	Secuencia común de HC biespecífica (LALA-IAHAHA)	EVQLVESGGGLVX ₁ PG GSLRLSCAASGFTFTX Y ₂ AMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYY AX ₃ SVKGRFTISRDX ₄ S KNTLYLQMNSLX ₅ X ₆ E DTAVYYCARATGFGT VVF ₇ X ₇ YWGQGT ₁ LVTVS SASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVT ₁ SWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSV ₁ TPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMASRT PEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYR VVS ₁ LT ₁ VL ₁ AQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNA ₁ YTQKS LSLSPGK	X ₁ es cualquier aminoácido; X ₂ es cualquier aminoácido; X ₃ es cualquier aminoácido; X ₄ es cualquier aminoácido; X ₅ es cualquier aminoácido; X ₆ es cualquier aminoácido; y X ₇ es cualquier aminoácido.

APÉNDICE Tabla J: Biespecíficos – secuencias de HC y LC de ejemplo

SEQ NO:	ID	Nombre	Secuencias
1		hp4SD1-3 LC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSANIQSIETLG WYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYADSLKGRFT

		MSTDNSKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCYVKLRDE DYVYRGQGTQVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQSYSTPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
2	hp4SD1-3 HC (con LALAPG Fc)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAESVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARATGF GTVVFDYWGGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL G APIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
7	hp4SD1-3 variante HC (con LALA Fc)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAESVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARATGF GTVVFDYWGGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
8	hp4SD1-3 variante HC (con IAHAHQ Fc)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAESVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARATGF GTVVFDYWGGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLG GPSVFLFPPKPKDTLM A SRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

		VLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNQYTQKSLSL SPGK
9	hp4SD1-3 variante HC (con IAHAHA Fc)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAESVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARATGF GTVVFDYWGGQTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNAITQKSLSL SPGK
450	hp4SD1-3 variante HC (con LALAPG- IAHAHQ Fc)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAESVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARATGF GTVVFDYWGGQTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNQYTQKSL SLSPGK
451	hp4SD1-3 variante HC (con LALAPG- IAHAHA Fc)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAESVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARATGF GTVVFDYWGGQTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS

		KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNA ~~Y~~ TQKSLS LSPGK
452	hp4SD1-3 variante HC (con LALA- IAHAHQ Fc)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAESVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARATGF GTVVFDYWGQGT ~~L~~ TVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAG GPSVFLFPPKPKDTLM A SRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN Q YTQKSLSL SPGK
453	hp4SD1-3 variante HC (con LALA- IAHAHA Fc)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAESVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARATGF GTVVFDYWGQGT ~~L~~ TVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAG GPSVFLFPPKPKDTLM A SRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN A YTQKSLSL SPGK
421	4SD1- 03_LALAPG LC	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLG WYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKGRFT MSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDD DYVYRGQGTQVTVSSGGSGSDIQMTQSPSSLSAS VGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
422	4SD1- 03_LALAPG HC (con LALAPG Fc)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTNYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARATGF GTVVFDYWGQGT ~~L~~ TVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV

		HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
--	--	---

APÉNDICE Tabla K: Secuencias misceláneas

SEQ NO:	ID	Nombre	Secuencias
3		Norrin humana	MRKHVLAASFMSLSLLVIMGDTDSKTDSSFIMDS DPR RCMRHHYVDSISHPLYKCSSKMVLLARCEGHCSQAS RSEPLVSFSTVLKQPFRSSCHCCRPQTSKLKALRLRC SGGMRLTATYRYILSCHCEECS
4		Fzd4 humano	MAWRGAGPSVPGAPGGVGLSLGLLLQLLLLLGPARG FGDEEERRCDPIRISMCQNLGYNVTKMPNLVGHELQ TDAELQLTTFTPLIQYGCSSQLQFFLCVYVPMCTEKI NIPIGPCGGMCLSVKRRCEPVLKEFGFAWPESLNC SK FPPQNDHNMCMMEGPGDEEVPLPHKTPIQPGEECH SVGTNSDQYIWVKRSLNCVLKCGYDAGLYSRSAKEF TDIWMMAVWASLCFISTAFTVLTFLIDSSRFSYPERPIIFL SMCYNISYIAYIVRLTVGRERISCDFEEAAEPVLIQEG KNTGCAIIFLLMYFFGMASIIWWVILTLTWFLAAGLKW GHEAIEMHSSYFHIAAWAIPAVKTIVILIMRLVDADEL TGLCYVGNQNLDAITGFVVAPLFTYLVIGTLFIAAGLVA LFKIRSNLQKDGTGKTDKLERLMVKIGVFSVLYTVPATC VIACYFYEISNWALFRYSADDSNMAVEMLKIFMSLLVG ITSGMWIWSAKTLHTWQKCSNRLVNSGKVKREKRG N GWVKPGKGSETVV
5		LRP5 humano	MEAAPPGPWPPLLLLLLLLLLALCGCPAPAAASPLLLFA NRRDVRLVDAGGVKLESTIVVSGLEDAAAVDFQFSKG AVYWTDVSEEAIKQTYLNQTGA AVQNVVISGLVSPDG LACDWVGKKLYWTDSETNRIEVANLNGTSRKVLFWQ DLDQPRAIALDPAHGYMYWTDWGETPRIERAGMDG STRKIIVDSDIYWPNGLTIDLEEQKLYWADAKLSFIHRA NLDGSFRQKVVEGSLTHPFALTLSGDTLYWTDWQTR SIHACNKRTGGKRKEILSALYSPMDIQVLSQERQPF F HTRCEEDNGGCSHLCLLSPSEPFYTCACPTGVQLQD NGRTCKAGAAEVL LLARRTDLRRISLDTPDFTDIVLQV DDIRHAIADYDPLEGYVYWTDDEVRAIRRAYLDGSGA QTLVNTEINDPDGIAVDWVARNLYWTDGTGTDRIEVTR LNGTSRKILVSEDLDEPRAIALHPVMGLMYWTDWGE

		NPKIECANLDGQERRVLVNASLGWPNGLALDLQEGK LYWGDAKTDKIEVINVDGTKRRTLLEDKLPHFIFTLL GDFIYWTDWQRRSIERVHKVKASRDVIIDQLPDLMLG KAVNVAKVVGNTNPCADRNGGCSHLCFFTPHATRCGC PIGLELLSDMKTICIVPEAFLVFTSRAAIHRISLETNNND VAIPLTGVKEASALDFDVSNNHIYWTDVSLKTISRAFM NGSSVEHVVEFGLDYPEGMAVDWMGKNLYWADTGT NRIEVARLDGQFRQVLVWRDLNPRSLALDPTKGYIY WTEWGGKPRIVRAFMGTNCMTLVDKVGRANDLTID YADQRLYWTDLDTNMIESSNMLGQERVVIADDLPHPF GLTQYSDYIYWTDWNLHSIERADKTSGRNRTLIQGH LDFVMDILVFHSSRQDGLNDCMHNNNGQCGQLCLAI PGGHRCGCASHYTLDPSSRNCSPPTTFLFSQKSAISRM IPDDQHSPDLILPLHGLRNVKAIDYDPLDKFIYWVDGR QNIKRAKDDGTQPFVLTSLSQGQNPDRQPHDLSIDIY SRTLFWTCEATNTINVHRLSGEAMGVVLRGDRDKPR AIVVNAERGYLYFTNMQDRAAKIERAALDGTREVEVLF TTGLIRPVALVDNTLGKLFWVDADLKRIESCDLSGAN RLTLLEDANIVQPLGLTILGKHLYWIDRQQQMIEERVEKT TGDKRTRIQRVAHLTGIIHAVEEVSLEEFSAHPCARD NGGCSHICIAKGDGTPRCSCPVLHLLQNLLTCGEPP TCSPDQFACATGEIDCIPGAWRCDGFPECDQSDDEE GCPVCSAAQFPCARGQCVDLRLRCDGEADCQDRSD EADCDALCLPNQFRCASGQCVLKQQCDSFPDCIDGS DELMCEITKPPSDDSPAHSAGPVIGIILSLFVMGGVY FVCQRVVCQRYAGANGPFPHEYVSGTPHVPLNFIAP GGSQHGPFTGIACGKSMSSVSLMGGRGGVPLYDR NHVTGASSSSSSSTKATLYPPILNPPSPATDPSLYN MDMFYSSNIPATARPYPYIIRGMAPPPTTPCSTDVCD SDYSASRWKASKYYLDLNSDSDPYPPPPTPHSQYLS AEDSCPPSPATERSYFHLFPPPPSPCTDSS
6	LRP6 humano	MGAVALRSLLACSFVLLRAAPLLLYANRRDLRLVDAT NGKENATIVVGGLEDAAAVDFVFSHGLIYWSDVSEEA IKRTEFNKTESVQNVVVSGLLSPDGLACDWLGEKLY WTDSETNRIEVSNDLGSRLRKVLFWQELDQPRAIALDP SSGFMYWTDWGEVPKIERAGMDGSSRFIIINSEIYWP NGLTLDYEEQKLYWADAKLNFHKSNDGTNRQAVVK GSLPHPFALTLEFIDLYWTDWSTHSILACNKYTGEGL REIHSDIFSPMDIHAFSQQRQPNATNPCGIDNGGCSH LCLMSPVKPFYQCACPTGVKLENGKTCKDGATELLL LARRTDLRRISLDTPTDFTDIVLQLEDIRHAIADYDPVE GYIYWTDDEVRAIRRSFIDGSGSQFVVTAQIAHPDGIA VDWWARNLYWTDGTGTDRIEVTRLNGTMRKILISEDLE EPRAIVLDPVMGYMYWTDWGEIPKIERAALDGSDRV VLVNTSLGWPNGLALDYDEGKIYWGDAKTDKIEVMN TDGTGRRVLVEDKIPHFIFTLLGDYVYWTDWQRRSI

		ERVHKRSAEREVIIDQLPDLMLKATNVHRVIGSNPC AEENGCGSHLCLYRPQGLRCACPIGFELISDMKTCIV PEAFLLFSSRRADIRRISLETNNNNVAIPLTGVKEASALD FDVTDNRIYWTDISLKTISRAFMNGSALEHVVEFGLDY PEGMAVDWLKGKNLYWADTGTNRIEVSKLDGQHRQV LVWKDLDSPRALALDPAEGFMYWTEWGGKPKIDRAA MDGSERTTLVPNVGRANGLTIDYAKRRLYWTDLDTN LIESSNMLGLNREVIADDLPHPFGLTQYQDYIYWTDW SRRSIERANKTSGQNRTIIQGHLDYVMDILVFHSSRQS GWNECASSNGHCSHLCLAVPVGGFVCGCPAHYSLN ADNRTC SAPTTFLFSQKSAINRMVIDEQQSPDIILPIH SLRNVRAIDYDPLDKQLYWIDSRQNMIRKAQEDGSQ GFTVVVSSVPSQNLEIQPYDLSIDIYSRYIYWTCATN VINVTRLDGRSVGVVLKGEQDRPRAVVVNPEKGYMY FTNLQERSPKIERAALDGTREVLFFSGLSKPIALALD SRLGKLFWADSDLRRIESSDLSGANRIVLEDSNILQPV GLTVFENWLYWIDKQQQMIEKIDMTGREGRTKVQARI AQLSDIHAVKELNLQEYRQHPCAQDNGGCSHICLVK GDGTTRCSCPMHLVLLQDELSCGEPPTCSPQQFTCF TGEIDCIPVAWRCDGFTECEDHSDELNCPVCSESQF QCASGQCIDGALRCNGDANCQDKSDEKNCEVLCLID QFRCANGQCIGKHKKCDHNVDKSDKDELDCYPTTE PAPQATNTVGSVIGVITIFVSGTVYFICQRMLCPRMK GDGETMTNDYVVHGPASVPLGYVPHPSLSGSLPG MSRGKSMISLSIMGGSSGPPYDRAHVTGASSSSSS STKGTYFPAILNPPPSPATERSHYTMEFGYSSNSPST HRSYSYRPYSYRHFAPPTTPCSTDVCDSDYAPSRRM TSVATAKGYTSDLNYDSEPVPPPPTPRSQYLSAEENY ESCPPSPYTERSYSHHLYPPPPSPCTDSS
410	Anti-LRP5/6 CDRH3 motivo DEDY	DEDY
411	Anti-LRP5/6 CDRH3 mutante motivo DEDY	DEEY
412	Anti-LRP5/6 CDRH3 mutante motivo DEDY	DESY
413	Anti-LRP5/6 CDRH3	DEAY

	mutante motivo DEDY	
414	Anti-LRP5/6 CDRH3 mutante motivo DEDY	DETY
415	Anti-LRP5/6 CDRH3 mutante motivo DEDY	ESEY
416	Anti-LRP5/6 CDRH3 mutante motivo DEDY	ESTY
417	Anti-LRP5/6 CDRH3 mutante motivo DEDY	ESSY
418	Anti-LRP5/6 CDRH3 motivo DDDY	DDDY
430	Línea germinal humana 3- 66*01 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMS WVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGQGTLVTVS S
431	Anti-LRP5/6 VH (hVHH3- H1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASANINSIETLGWV RQAPGKGLEWVSNMRGGGYMKYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKLRDDDYVYWG QGTLVTVSS
440	Línea germinal humana IGHV3- 23*04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTIS RDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
441	Línea germinal humana IGHJ4*01	YFDYWGQGTLVTVSS

APÉNDICE Tabla L: Anti-LRP5/6 VH CDR y secuencias de FR en base a IMGT o Kabat

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencias
311	Anti-LRP5/6 FRH1 (IMGT)	<u>E</u> VQLVESGGGLVQPGGSLRLSC <u>A</u> SS
321	Anti-LRP5/6 CDRH1 (IMGT)	AN <u>I</u> QSIET
531	Anti-LRP5/6 FRH2 (IMGT)	LGWYRQAPGKQ <u>R</u> EL <u>A</u> N
541	Anti-LRP5/6 CDRH2 (IMGT)	<u>M</u> RGGGY <u>M</u>
351	Anti-LRP5/6 FRH3 (IMGT)	KYAD <u>S</u> LKGRFT <u>M</u> STDNSKNT <u>M</u> YLQMNSL <u>R</u> AEDTAVYYC
361	Anti-LRP5/6 CDRH3 (IMGT)	YVKLR <u>D</u> EDYVY
371	Anti-LRP5/6 FRH4 (IMGT)	<u>R</u> GQGTQVTVSS
611	Anti-LRP5/6 FRH1 (Kabat)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSANIQS
621	Anti-LRP5/6 CDRH1 (Kabat)	<u>I</u> ETL <u>G</u>
631	Anti-LRP5/6 FRH2 (Kabat)	WYRQAPGKQRELIA
641	Anti-LRP5/6 CDRH2 (Kabat)	<u>N</u> MRGGGYMKYADSLK <u>G</u>
651	Anti-LRP5/6 FRH3 (Kabat)	RFTMSTDNSKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCYV
661	Anti-LRP5/6 CDRH3 (Kabat)	<u>K</u> LRDE <u>D</u> YVY
671	Anti-LRP5/6 FRH4 (Kabat)	RGQGTQVTVSS

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo que comprende al menos:

- (A) una primera región de unión al antígeno que se une específicamente a un receptor de clase Frizzled 4 (Fzd4) y comprende un primer dominio variable de la cadena pesada (VH1) y un primer dominio variable de la cadena liviana (VL1),
- (B) una segunda región de unión al antígeno que se une específicamente a la proteína relacionada con receptor de lipoproteínas de baja densidad 5 y/o 6 (LRP5 y/o LRP6) y comprende al menos un segundo dominio variable de la cadena pesada (VH2),

en donde:

(A) el VH1 comprende:

- (i) una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 1 (CDRH1) que tiene una secuencia de aminoácidos que:
 - (i-1) tiene al menos 80 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121, o la secuencia de aminoácidos de CDRH1 contenida en SEQ ID NO: 181, definida opcionalmente de acuerdo con Kabat;
 - o
 - (i-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de CDRH1 contenida en SEQ ID NO: 181, definida opcionalmente de acuerdo con Kabat;
- (ii) una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 2 (CDRH2) que tiene una secuencia de aminoácidos que:
 - (ii-1) tiene al menos 90 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141, o la secuencia de aminoácidos de CDRH2 contenida en SEQ ID NO: 181, definida opcionalmente de acuerdo con Kabat;
 - o
 - (ii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141; o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de CDRH2 contenida en SEQ ID NO: 181, definida opcionalmente por Kabat; y

- (iii) una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 3 (CDRH3) que tiene una secuencia de aminoácidos que:
 - (iii-1) tiene al menos 90 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 161, o la secuencia de aminoácidos de CDRH3 contenida en SEQ ID NO: 181, definida opcionalmente por Kabat; o
 - (iii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 161, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de CDRH3 contenida en SEQ ID NO: 181, definida opcionalmente por Kabat; y

el VL1 comprende:

- (iv) una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana 1 (CDRL1) que tiene una secuencia de aminoácidos que:
 - (iv-1) tiene al menos 90 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 221, o la secuencia de aminoácidos de CDRL1 contenida en SEQ ID NO: 281, definida opcionalmente por Kabat; o
 - (iv-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 221, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de CDRL1 contenida en SEQ ID NO: 281, definida opcionalmente de acuerdo con Kabat;
- (v) una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana 2 (CDRL2) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en:
 - (v-1) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 241; o
 - (v-2) la secuencia de aminoácidos de CDRL2 contenida en SEQ ID NO: 281, definida opcionalmente de acuerdo con Kabat;

y
- (vi) una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana 3 (CDRL3) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en:
 - (vi-1) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 261; o
 - (vi-2) la secuencia de aminoácidos de CDRL3 contenida en SEQ ID NO: 281, definida opcionalmente de acuerdo con Kabat;

y

(B) el VH2 comprende:

- (i) una CDRH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en:
 - (i-1) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 321; o
 - (i-2) la secuencia de aminoácidos de CDRH1 contenida en SEQ ID NO: 381, definida opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat;
- (ii) una CDRH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que:
 - (ii-1) tiene al menos 90 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 341, o la secuencia de aminoácidos de CDRH3 contenida en SEQ ID NO: 381, definida opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat;
 - (ii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 341; o
 - (ii-3) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de CDRH2 contenida en SEQ ID NO: 381, definida opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; y
- (iii) una CDRH3 que tiene una secuencia de aminoácidos que:
 - (iii-1) tiene al menos 90 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 361, o la secuencia de aminoácidos de CDRH3 contenida en SEQ ID NO: 381, definida opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; o
 - (iii-2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO: 361 y 363-366, o comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de CDRH3 contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381 y 393-396, definida opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat.

2. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el VH2 es, comprende o está incluido en un nanocuerpo.
3. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que es un anticuerpo biespecífico o fragmento de anticuerpo.
4. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con

cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde:

(A) el VH1 comprende:

- (i) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 del VH1 que comprenden la secuencia de aminoácidos contenida en SEQ ID NO: 181, opcionalmente de acuerdo con Kabat; o
- (ii) una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 121, 141 y 161, respectivamente, y

el VL1 comprende:

- (i) la CDRL1, la CDRL2 y la CDRL3 del VL1 que comprenden la secuencia de aminoácidos contenida en SEQ ID NO: 281, opcionalmente de acuerdo con Kabat; o
- (ii) una CDRL1, una CDRL2 y una CDRL3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 221, 241 y 261, respectivamente; y

(B) el VH2 comprende:

- (i) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 del VH2 que comprenden la secuencia de aminoácidos contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381 y 393-396, opcionalmente de acuerdo con IMGT o Kabat; o
- (ii) una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 321, 341 y 361, respectivamente, SEQ ID NO: 321, 341 y 363, respectivamente, SEQ ID NO: 321, 341 y 364, respectivamente, SEQ ID NO: 321, 341 y 365, o SEQ ID NO: 321, 341 y 366, respectivamente.

5. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde:

- (A) (i) el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181; y/o
- (ii) el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281; y/o
- (B) el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos contenida en

cualquiera de SEQ ID NO: 381 y 393-396.

6. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde:

- (A) el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181; y/o el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281; y/o
- (B) el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381 y 393-396.

7. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde:

- (A) el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181; y el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281; y
- (B) el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos contenida en cualquiera de SEQ ID NO: 381 y 393-396.

8. Un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:

- (A) una primera región de unión al antígeno que se une específicamente a Fzd4 y comprende un VH1 y un VL1,
- (B) una segunda región de unión al antígeno que se une específicamente a LRP5 y/o LRP6 y comprende al menos un VH2,

en donde:

- (i) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 del VH1 son idénticas a las del dominio variable de la cadena pesada (VH) que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181;
- (ii) la CDRL1, la CDRL2 y la CDRL3 del VL1 son idénticas a las del dominio variable de la cadena liviana (VL) que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281; y
- (iii) la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 del VH2 son idénticas a las de VH que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 381.

9. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la reivindicación 8, en donde:

- (i) el VH1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181; y
- (ii) el VL1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 281; y
- (iii) el VH2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 381.

10. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende una región de fragmento cristizable (Fc), opcionalmente en donde la región Fc:

- (I) es de una IgG, una IgA, una IgE, una IgD, una IgM, opcionalmente de una IgG1, una IgG4, una IgG2 o una IgG3, además opcionalmente de ser humano, o una variante de esta;
- (II) comprende una o más sustituciones de aminoácido que reducen una función efectora de Fc, opcionalmente en donde la una o más sustituciones de aminoácido están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 234, 235, 236, 237, 265, 297 y 329, de acuerdo con la numeración de EU;
- (III) comprende al menos las siguientes sustituciones de aminoácido de acuerdo con la numeración de EU:
 - (ii-1) L234A, L235A y P329G;
 - (ii-2) L234A y L235A;
 - (ii-3) I253A, H310A y H435Q; y/o
 - (ii-4) I253A, H310A y H435A,
 opcionalmente con respecto a una región Fc de IgG1 humana y/o a cualquiera de SEQ ID NO: 71-74 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C); y/o
- (IV) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 71-74, 81-84, 86-89, 91-94, 96-99, 471-474, 476-479, 481-484 y 486-489 (que opcionalmente no incluyen K de extremo C) o que es al menos 80 % idéntica a esta.

11. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende:

- (a) un primer polipéptido que comprende dicho VH1; y
- (b) un segundo polipéptido que comprende

lo siguiente en el orden del extremo N al extremo C:

(b-1) dicho VH2;

(b-2) opcionalmente un ligador, que es opcionalmente un ligador peptídico, además opcionalmente un ligador flexible, opcionalmente en donde el ligador:

(i) comprende uno o más aminoácidos, opcionalmente uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce aminoácidos;

(ii) consiste en pequeños aminoácidos que consisten en G, S y/o A;

(iii) que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, G, GG, GGG, GS, SG, GGS, GSG, SGG, GSS, SGS y SSG; y/o

(iv) comprende o consiste en repeticiones múltiples de un aminoácido o péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, G, GG, GGG, GS, SG, GGS, GSG, SGG, GSS, SGS y SSG; y

(b-3) dicho VL1.

12. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 11, en donde:

(a) el primer polipéptido;

(i) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con respecto a cualquiera de SEQ ID NO: 2, 7, 8, 9, 450, 451, 452 y 453 (opcionalmente sin K de extremo C);

y/o

(ii) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 2, 7, 8, 9, 450, 451, 452 y 453 (opcionalmente sin K de extremo C); y

(b) el segundo polipéptido:

(i) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80

% de identidad con respecto a SEQ ID NO: 1; y/o

- (ii) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

13. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde:

- (a) el primer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 7, 450 o 451 (opcionalmente sin K de extremo C); y
- (b) el segundo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

14. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-13, que comprende: dos de dichos primeros polipéptidos que forman un dímero entre sí a través de uno o más enlaces disulfuro; y dos de dichos segundos polipéptidos, en donde uno de los segundos polipéptidos interactúa con uno de los primeros polipéptidos a través de un enlace disulfuro y el otro de los segundos polipéptidos interactúa con el otro de los primeros polipéptidos a través de un enlace disulfuro.

15. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende:

- (A) dos o más regiones de unión a Fzd4, en donde al menos una de dichas regiones de unión a Fzd4 es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y/o
- (B) dos o más regiones de unión a LRP5 y/o LRP6, en donde al menos una de dichas regiones de unión a LRP5 y/o LRP6 es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno.

16. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 15, en donde:

- (I) la relación de la cantidad de dichas una o más regiones de unión a Fzd4 y la cantidad de dichas una o más regiones de unión a LRP5 y/o LRP6 comprendidas en el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste en 2:1, 1:2, 2:2, 3:1, 1:3, 3:2, 2:3, 3:3, 4:1, 1:4, 4:2, 2:4, 4:3, 3:4 y 4:4;
- (II) la cantidad de dichas una o más regiones de unión a Fzd4 y la cantidad de dichas una o más regiones de unión a LRP5 y/o LRP6 comprendidas en el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo son: 2 y 1,

respectivamente; 1 y 2, respectivamente; 2 y 2, respectivamente; 3 y 1, respectivamente; 1 y 3, respectivamente; 3 y 2, respectivamente; 2 y 3, respectivamente; 3 y 3, respectivamente; 4 y 1, respectivamente; 1 y 4, respectivamente; 4 y 2, respectivamente; 2 y 4, respectivamente; 4 y 3, respectivamente; 3 y 4, respectivamente; o 4 y 4 respectivamente; y/o

(III) el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo comprende:

- (a) dos regiones de unión a Fzd4 idénticas, cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y una región de unión a LRP5 y/o LRP6 que es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno;
- (b) dos regiones de unión a Fzd4, que son diferentes entre sí y (i) al menos una de las cuales es, comprende o está incluida o (ii) cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y una región de unión a LRP5 y/o LRP6 que es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno;
- (c) una región de unión a Fzd4 que es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y dos regiones de unión a LRP5 y/o LRP6 idénticas, cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno;
- (d) una región de unión a Fzd4 que es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y dos regiones de unión a LRP5 y/o LRP6, que son diferentes entre sí y (i) al menos una de las cuales es, comprende o está incluida o (ii) cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno;
- (e) dos regiones de unión a Fzd4 idénticas, cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y dos regiones de unión a LRP5 y/o LRP6 idénticas, cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno;
- (f) dos regiones de unión a Fzd4, que son diferentes entre sí y (i) al menos una de las cuales es, comprende o está incluida o (ii) cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y dos regiones de unión a LRP5 y/o LRP6 idénticas, cada una de las cuales es comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno;

(g) dos regiones de unión a Fzd4 idénticas, cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y dos regiones de unión a LRP5 y/o LRP6, que son diferentes entre sí y (i) al menos una de las cuales es, comprende o está incluida o (ii) cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno; y/o

(h) dos regiones de unión a Fzd4, que son distintas entre sí y (i) al menos una de las cuales es, comprende o está incluida o (ii) cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha primera región de unión al antígeno; y dos regiones de unión a LRP5 y/o LRP6, que son distintas entre sí y (i) al menos una de las cuales es, comprende o está incluida o (ii) cada una de las cuales es, comprende o está incluida en dicha segunda región de unión al antígeno.

17. Un ácido nucleico o una combinación de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, opcionalmente en donde los ácidos nucleicos son ADN, cADN, ARN, mARN, mARN modificado o un híbrido de ADN/ARN.

18. El ácido nucleico o una combinación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 17, que codifica el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-14 y comprende:

- (a) un primer ácido nucleico que codifica el primer polipéptido; y
- (b) un segundo ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido.

19. Un vector o una combinación de vectores que comprende el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, opcionalmente en donde:

- (i) los vectores comprenden uno o más promotores ligados operativamente a los ácidos nucleicos;
- (ii) los vectores son un vector de expresión; y/o
- (iii) los vectores comprenden un plásmido, un vector viral (opcionalmente viral adenoasociado, adenoviral, lentiviral o retroviral), un vector a base de lípido, un vector de ARN de autorreplicación, una partícula tipo virus, un vector a base de polímero y/o una nanopartícula, opcionalmente una nanopartícula a base de lípidos.

20. El vector o una combinación de vectores de acuerdo con la reivindicación 19, que codifica el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con

cualquiera de las reivindicaciones 11-14 y comprende:

- (a) un primer vector que comprende un primer ácido nucleico que codifica el primer polipéptido; y
- (b) un segundo vector que comprende un segundo ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido.

21. Una célula huésped, que comprende:

- (A) el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16;
- (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 17 o 18; y/o
- (C) el vector o la combinación de vectores de acuerdo con la reivindicación 19 o 20,

opcionalmente en donde la célula huésped es:

- (i) mamífero, opcionalmente ser humano, primate no humano, mono, conejo, roedor, hámster, rata o ratón; o
- (ii) no mamífero, opcionalmente de planta, bacteriana, fúngica, de levadura, protozoos o insectos,

y opcionalmente en donde la célula huésped es:

- (i) una célula de riñón embrionario humano (HEK), opcionalmente una célula HEK293, o una variante de esta, además opcionalmente una célula Expi293F™;
- (ii) una célula CHO (ovario de hámster chino);
- (iii) una célula inmunitaria o
- (iv) un hibridoma.

22. Una población de células, que comprende dos o más células huésped de acuerdo con la reivindicación 21.

23. Una composición farmacéutica, que comprende:

- (I)
 - (A) el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16;
 - (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 17 o 18;
 - (C) el vector o la combinación de vectores de acuerdo con la reivindicación 19 o 20, y/o
 - (D) la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 21 o la población de células de acuerdo con la reivindicación 22; y
- (II) un portador y/o excipiente aceptable desde el punto de vista

farmacéutico.

24. Un método para tratar un sujeto que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de:

- (A) el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16;
- (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 17 o 18;
- (C) el vector o la combinación de vectores de acuerdo con la reivindicación 19 o 20;
- (D) la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 21 o la población de células de acuerdo con la reivindicación 22; y/o
- (E) la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 23,

opcionalmente en donde:

- (a) el sujeto es
 - (i) un mamífero, opcionalmente un ser humano, un primate no humano, un mono, un caballo, una vaca, oveja, una cabra, un cerdo, un perro, un gato, un conejo, un roedor, un hámster, una rata o un ratón; o
 - (ii) un vertebrado no mamífero, opcionalmente un ave, pez, un anfibio o un reptil;
- (b) el sujeto comprende o presenta riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o una afección; y/o
- (c) el método comprende además administrar al sujeto un agente adicional, opcionalmente un adyuvante o un agente terapéutico.

25. Un método para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o una afección en un sujeto que necesita dicho tratamiento, en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de:

- (A) el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16;
- (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 17 o 18;
- (C) el vector o la combinación de vectores de acuerdo con la reivindicación 19 o 20;
- (D) la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 19 o la población de células de acuerdo con la reivindicación 21; y/o
- (E) la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 22,

opcionalmente en donde:

(a) el sujeto es

- (i) un mamífero, opcionalmente un ser humano, un primate no humano, un mono, un caballo, una vaca, oveja, una cabra, un cerdo, un perro, un gato, un conejo, un roedor, un hámster, una rata o un ratón; o
- (ii) un vertebrado no mamífero, opcionalmente un ave, pez, un anfibio o un reptil; y/o

(b) el método comprende además administrar al sujeto un agente adicional, opcionalmente un adyuvante o un agente terapéutico.

26. Un método para inducir, promover, estimular, potenciar y/o respaldar una señalización Wnt en una célula diana de un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de:

- (A) el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16;
- (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 17 o 18;
- (C) el vector o la combinación de vectores de acuerdo con la reivindicación 19 o 20;
- (D) la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 21 o la población de células de acuerdo con la reivindicación 22; y/o
- (E) la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 23,

opcionalmente en donde:

(a) el sujeto es

- (i) un mamífero, opcionalmente un ser humano, un primate no humano, un mono, un caballo, una vaca, oveja, una cabra, un cerdo, un perro, un gato, un conejo, un roedor, un hámster, una rata o un ratón; o
- (ii) un vertebrado no mamífero, opcionalmente un ave, pez, un anfibio o un reptil;

(b) el sujeto comprende o presenta riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o una afección; y/o

(c) el método comprende además administrar al sujeto un agente adicional, opcionalmente un adyuvante o un agente terapéutico,

y opcionalmente en donde:

- (i) la señalización Wnt es o comprende señalización Wnt/ β -catenina; y/o
- (ii) el método promueve, estimula, mejora y/o respalda el reclutamiento de

múltiples complejos receptores, en donde cada uno comprende (ii-1) Fzd4 y (ii-2) LRP5 o LRP6.

27. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-26, en donde la enfermedad, el trastorno o la afección comprende uno o más de los siguientes:

- (a) una retinopatía, opcionalmente una enfermedad vascular retiniana (opcionalmente generada por la inhibición de desarrollo vascular o angiogénesis excesiva) y/u opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en vitreorretinopatía exudativa, vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR), retinopatía de premadurez, enfermedad de Norrie, retinopatía diabética (DR), edema macular diabético, isquemia macular diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD) (que incluye AMD húmeda y AMD seca), retinopatía de premadurez (ROP), síndrome de osteoporosis con pseudoglioma (OPPG), oclusión de la vena retiniana y enfermedad de Coats;
- (b) un trastorno vascular, opcionalmente malformación vascular o deficiencia vascular, además opcionalmente asociada con neovascularización asociada con isquemia;
- (c) una enfermedad ósea o fractura, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en osteoporosis (que incluye síndrome de osteoporosis con pseudoglioma (OPPG) y osteoporosis primaria juvenil), variabilidad de densidad mineral ósea y osteólisis asociada con cáncer;
- (d) una enfermedad de desgaste muscular, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en sarcopenia, caquexia y distrofias musculares; y/o
- (e) una enfermedad neuronal o neurodegenerativa, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en apoplejía, lesión cerebral traumática, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia de Friedreich, enfermedad de cuerpo de Lewy, atrofia muscular espinal, enfermedad de las neuronas motoras, esclerosis múltiple, enfermedad de Batten y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

28. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24-27, en donde:

- (I) la administración se realiza:
 - (i) en uno o más de los ojos del sujeto, opcionalmente por vía intravítrea o por gotas oculares;

- (ii) con administración local, opcionalmente al ojo, oído, nariz (opcionalmente por vía intranasal), piel (opcionalmente por vía transdérmica o epicutánea), mucosa, piel o vagina, o mediante inhalación; o
 - (iii) administración parenteral, opcionalmente mediante inyección (opcionalmente por administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intratecal, intraarterial, intraarticular, intraósea o intraperitoneal) o mediante inhalación; o
 - (iv) administración entérica, opcionalmente por vía oral, sublingual, bucal o rectal; y/o
- (II) la administración que comprende administrar el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-20 a uno o más de los ojos del sujeto a alrededor de 0,1-100000 ng por ojo, alrededor de 1-100000 ng por ojo, alrededor de 1-10000 ng por ojo, alrededor de 10-10000 ng por ojo, alrededor de 1-100 ng por ojo, alrededor de 200-300 ng por ojo, alrededor de 300-400 ng por ojo, alrededor de 400-500 ng por ojo, alrededor de 500-600 ng por ojo, alrededor de 600-700 ng por ojo, alrededor de 700-800 ng por ojo, alrededor de 800-900 ng por ojo, alrededor de 900-1000 ng por ojo, alrededor de 1000-2000 ng por ojo, alrededor de 2000-3000 ng por ojo, alrededor de 3000-4000 ng por ojo, alrededor de 4000-5000 ng por ojo, alrededor de 5000-6000 ng por ojo, alrededor de 6000-7000 ng por ojo, alrededor de 7000-8000 ng por ojo, alrededor de 8000-9000 ng por ojo, alrededor de 9000-10000 ng por ojo, alrededor de 10000-20000 ng por ojo, alrededor de 20000-30000 ng por ojo, alrededor de 30000-40000 ng por ojo, alrededor de 40000-50000 ng por ojo, alrededor de 50000-60000 ng por ojo, alrededor de 60000-70000 ng por ojo, alrededor de 70000-80000 ng por ojo, alrededor de 80000-90000 ng por ojo o alrededor de 90000-100000 ng por ojo.
29. Un método para inducir, promover, estimular, potenciar y/o respaldar una señalización Wnt en un célula diana que comprende poner en contacto una célula diana con una cantidad eficaz de:
- (A) el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16;
 - (B) el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 17 o 18;
 - (C) el vector o la combinación de vectores de acuerdo con la reivindicación 19 o 20;

(D) la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 19 o la población de células de acuerdo con la reivindicación 21; y/o

(E) la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 22,

opcionalmente en donde:

(I) poner en contacto sucede *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*,

(II) el método es para (i) preparar una célula y/o tejido para implantación, (ii) diferenciación de una célula madre y/o (iii) preparación de un organoide,

(III) el método es para la formación ósea, la formación vascular y/o la formación neuronal y/o diferenciación.

30. Un método para elaborar el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, que comprende:

(a) cultivar células que comprenden el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 17 o 18 en una afección que permite la expresión de dicho anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo y

(b) recolectar y purificar el anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo del cultivo celular de (a).

31. Un método para elaborar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 21 o la población de dichas células de acuerdo con la reivindicación 22, que comprende introducir el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 17 o 18 y/o el vector o la combinación de vectores de acuerdo con la reivindicación 19 o 20 en una o más células, opcionalmente en donde la introducción ocurre *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

32. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, el vector o la combinación de vectores de acuerdo con la reivindicación 19 o 20, la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 20, o la población de células de acuerdo con la reivindicación 22 y/o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 23, para su uso en medicina.

33. El anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, el vector o la combinación de vectores de acuerdo con la reivindicación 19 o 20, la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 21, o la población de células de acuerdo con la reivindicación 22 y/o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 23, para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección, opcionalmente en donde la

enfermedad, trastorno o afección comprende uno o más de los siguientes:

- (a) una retinopatía, opcionalmente una enfermedad vascular retiniana (opcionalmente generada por la inhibición de desarrollo vascular o angiogénesis excesiva) y/u opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en vitreorretinopatía exudativa, vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR), retinopatía de premadurez, enfermedad de Norrie, retinopatía diabética (DR), edema macular diabético, isquemia macular diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD) (que incluye AMD húmeda y AMD seca), retinopatía de premadurez (ROP), síndrome de osteoporosis con pseudoglioma (OPPG), oclusión de la vena retiniana y enfermedad de Coats;
- (b) un trastorno vascular, opcionalmente malformación vascular o deficiencia vascular, además opcionalmente asociada con neovascularización asociada con isquemia;
- (c) una enfermedad ósea o fractura, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en osteoporosis (que incluye síndrome de osteoporosis con pseudoglioma (OPPG) y osteoporosis primaria juvenil), variabilidad de densidad mineral ósea y osteólisis asociada con cáncer;
- (d) una enfermedad de desgaste muscular, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en sarcopenia, caquexia y distrofias musculares; y/o
- (e) una enfermedad neuronal o neurodegenerativa, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en apoplejía, lesión cerebral traumática, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia de Friedreich, enfermedad de cuerpo de Lewy, atrofia muscular espinal, enfermedad de las neuronas motoras, esclerosis múltiple, enfermedad de Batten y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

34. Uso del anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, el vector o la combinación de vectores de acuerdo con la reivindicación 19 o 20, la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 21, o la población de células de acuerdo con la reivindicación 22 y/o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 23, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección, opcionalmente en donde la enfermedad, trastorno o afección comprende uno o más de

los siguientes:

- (a) una retinopatía, opcionalmente una enfermedad vascular retiniana (opcionalmente generada por la inhibición de desarrollo vascular o angiogénesis excesiva) y/u opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en vitreorretinopatía exudativa, vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR), retinopatía de premadurez, enfermedad de Norrie, retinopatía diabética (DR), edema macular diabético, isquemia macular diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD) (que incluye AMD húmeda y AMD seca), retinopatía de premadurez (ROP), síndrome de osteoporosis con pseudoglioma (OPPG), oclusión de la vena retiniana y enfermedad de Coats;
- (b) un trastorno vascular, opcionalmente malformación vascular o deficiencia vascular, además opcionalmente asociada con neovascularización asociada con isquemia;
- (c) una enfermedad ósea o fractura, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en osteoporosis (que incluye síndrome de osteoporosis con pseudoglioma (OPPG) y osteoporosis primaria juvenil), variabilidad de densidad mineral ósea y osteólisis asociada con cáncer;
- (d) una enfermedad de desgaste muscular, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en sarcopenia, caquexia y distrofias musculares; y/o
- (e) una enfermedad neuronal o neurodegenerativa, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en apoplejía, lesión cerebral traumática, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia de Friedreich, enfermedad de cuerpo de Lewy, atrofia muscular espinal, enfermedad de las neuronas motoras, esclerosis múltiple, enfermedad de Batten y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

RESUMEN

La presente invención proporciona compuestos que se unen específicamente a uno o más receptores Wnt y métodos relacionados con estos. En algunos aspectos, se proporcionan las composiciones y métodos para tratar trastornos oculares con moduladores de la vía de señalización Wnt. En particular, los trastornos oculares son retinopatías. También se proporcionan métodos de dosificación y composiciones farmacéuticas.

4SD1-03_LALAPG

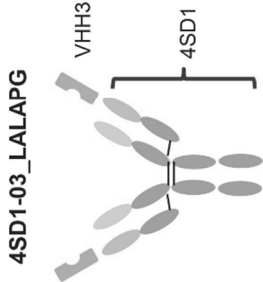
Figura 1

Cadena liviana

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIA**NMRGGGYM**KYAGSLKGRFTMSTESA
KNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCY**VVKLRDDDDYVYRG**QGTQVTVSS**CGSGS**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RA**
SQSISSYLNWYQQKPKGAPKLLIYA**ASSLQ**SGVPSRFSGSGSGTDFLTIISSLPEDFATYYC**QQSYSTPLTFGG**
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 421)

Cadena pesada

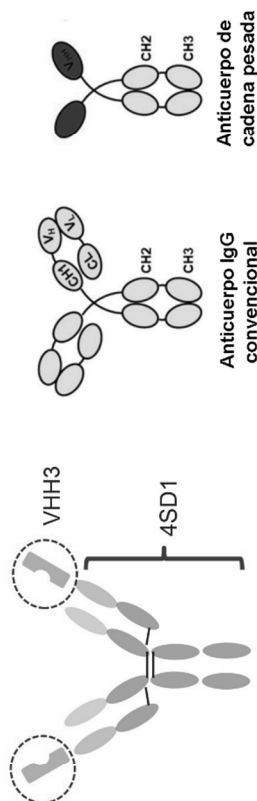
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTNY**AMS**WVRQAPGKGLEWV**SAISGGSGSTY**ADSVKGRFTISRDD
SKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR**ATGFGTV**FDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**G**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV**F**SCSV**M**HEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 422)



VL VH Fc

Secuencia ligadora

CDR: fuente negra en negrita con subrayado
Gris: mutaciones LALAPG



seq	10	20	30	40	50
AbM	10	20	30	40	50
VVHH3	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLCTSS	ANINSIETLG	WYRQAPGKQRELIA	NMRGGGYMK	
	*	**	*	**	**
3-66*01	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTVSSNYMS	WVRQAPGKGLEWVS	VIYSGGSTY	
hVHH3-H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	ANINSIETLG	WVRQAPGKGLEWVS	NMRGGGYMK	
hVHH3-H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASS	ANINSIETLG	WYRQAPGKGREWIA	NMRGGGYMK	
hVHH3-H3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASS	ANINSIETLG	WYRQAPGKQREWIA	NMRGGGYMK	
hVHH3-H4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASS	ANINSIETLG	WYRQAPGKQRELIA	NMRGGGYMK	

seq	60	70	80	90	100	110	
AbM	60	70	80	90	100	110	
VHH3	YAGSLKGRFTMSTESAKNTMYLQMN	SLKPEDTAVYYCYV	KL	RD	DD	YYV	RGQGTQVTSS (SEQ ID NO: 382)
	*	*	*	*	*	*	
3-66*01	YADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR				WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 430)
hVHH3-H1	YADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	KL	RD	DD	YYV WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 431)
hVHH3-H2	YADSLKGRFTMSTD	NKNTMYLQMN	SLRAEDTAVYYCYV	KL	RD	DD	YYV WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 383)
hVHH3-H3	YADSLKGRFTMSTD	NKNTMYLQMN	SLRAEDTAVYYCYV	KL	RD	DD	YYV WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 384)
hVHH3-H4	YADSLKGRFTMSTD	NKNTMYLQMN	SLRAEDTAVYYCYV	KL	RD	DD	YYV RGQGTQVTSS (SEQ ID NO: 385)
							ES

Figura 2A

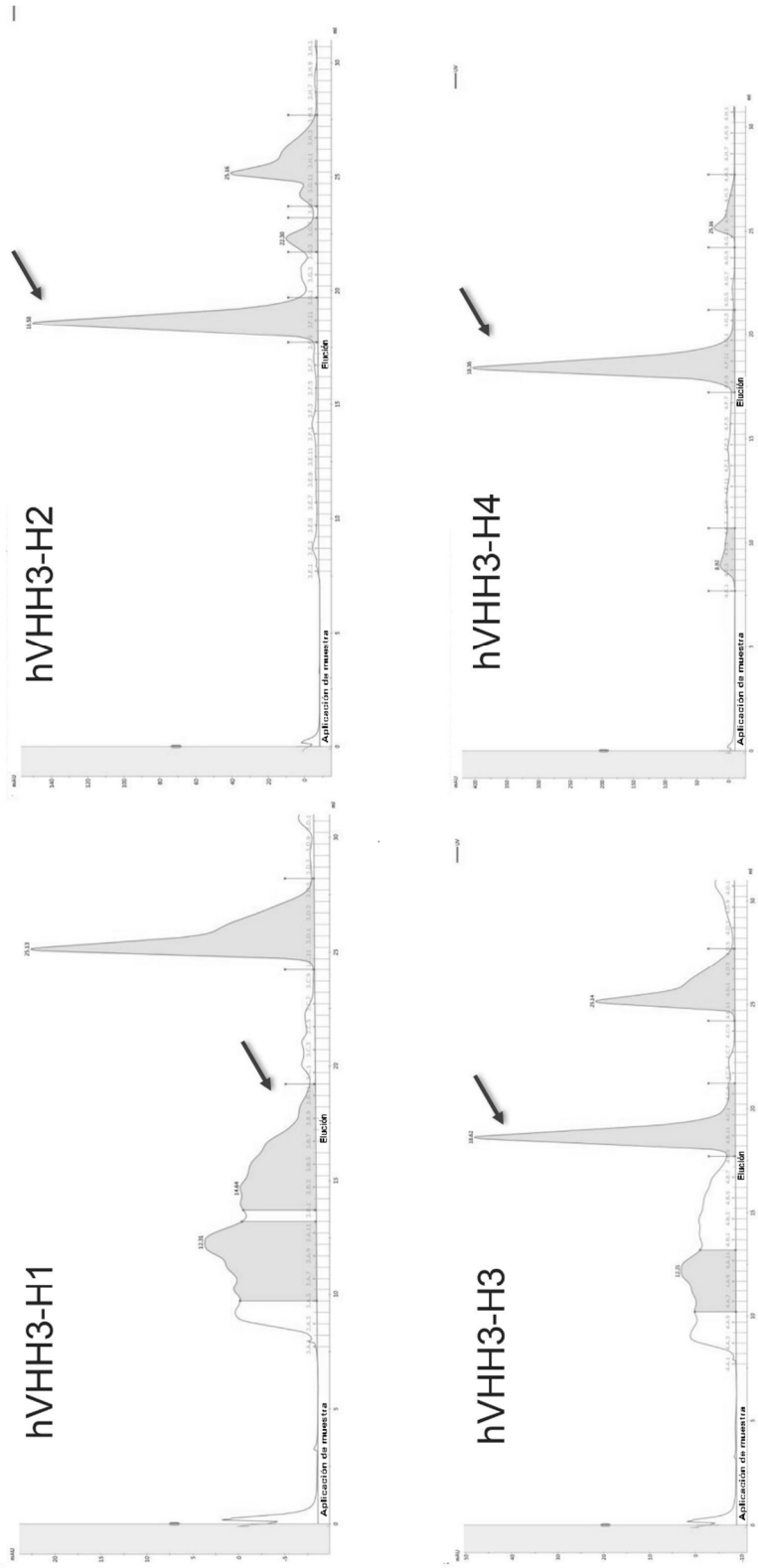


Figura 2B

Reducción del riesgo del motivo de desamidación N29, NS, en hVHH3-H4

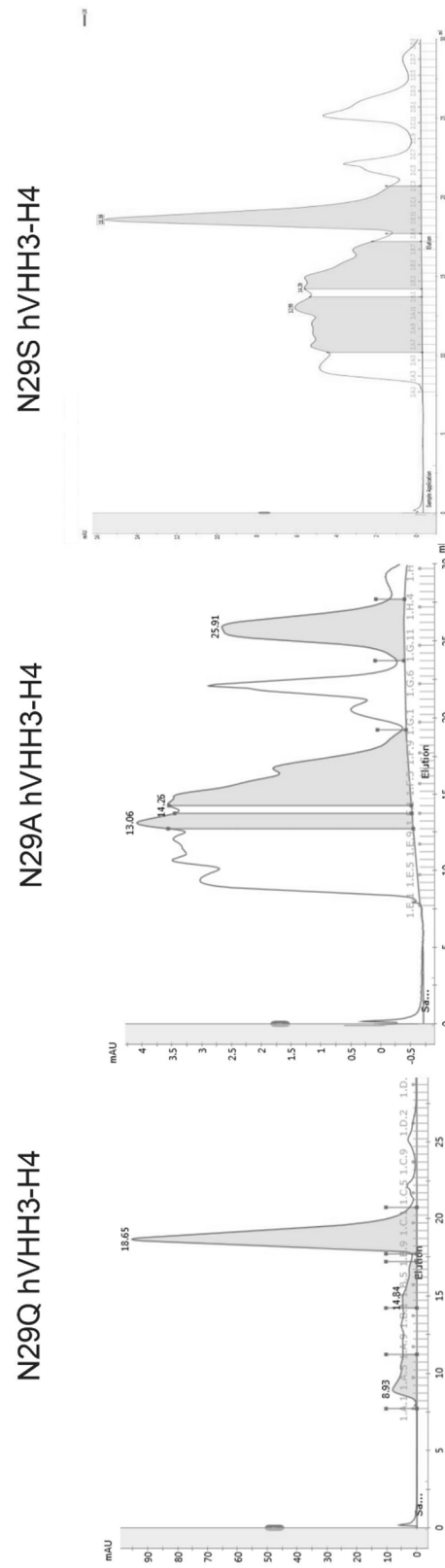


Figura 3

Reducción del riesgo de motivos de isomerización con secuencia DDD de hVHH3-H4

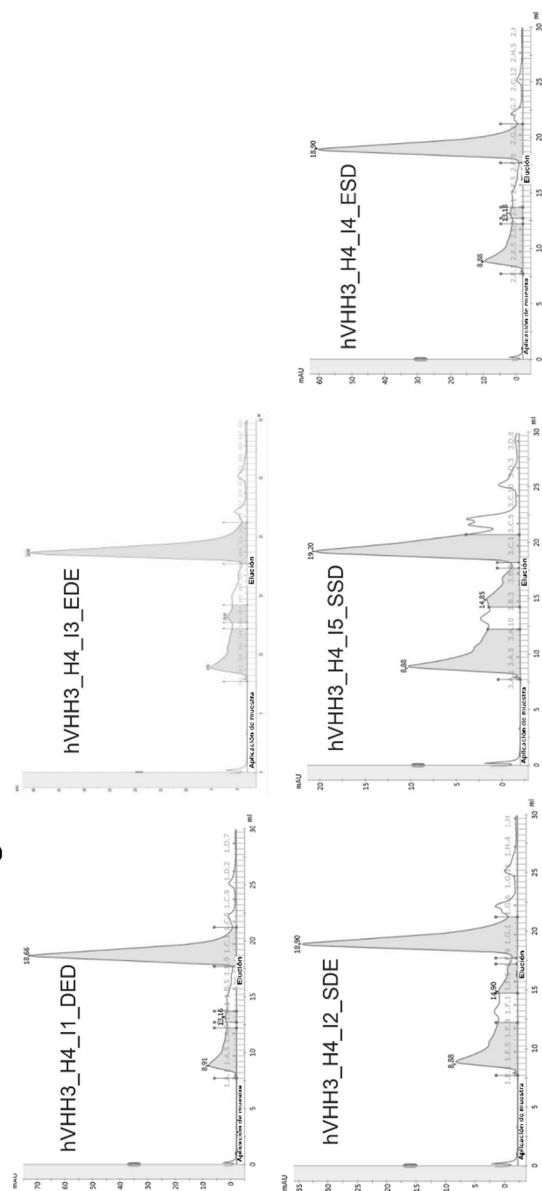
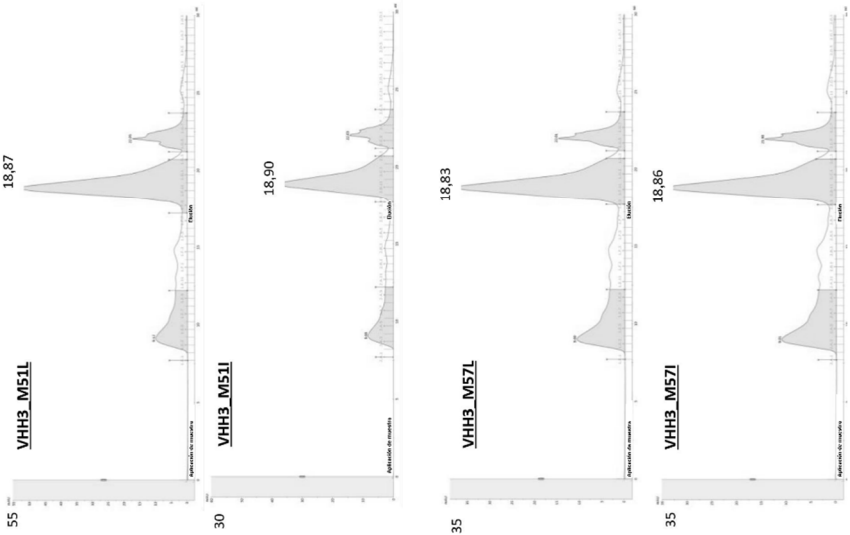


Figura 4

No se puede reducir el riesgo en los residuos sensibles a la oxidación de VHH3



Proteína	Rendimiento
VHH3	100%
VHH3_M51K	<5%
VHH3_M51L	15%
VHH3_M51I	10%
VHH3_M57K	<5%
VHH3_M57L	10%
VHH3_M57I	10%

Figura 5

Reducción del riesgo de residuos susceptibles en bucles de CDR 4SD1-03_LALAPG

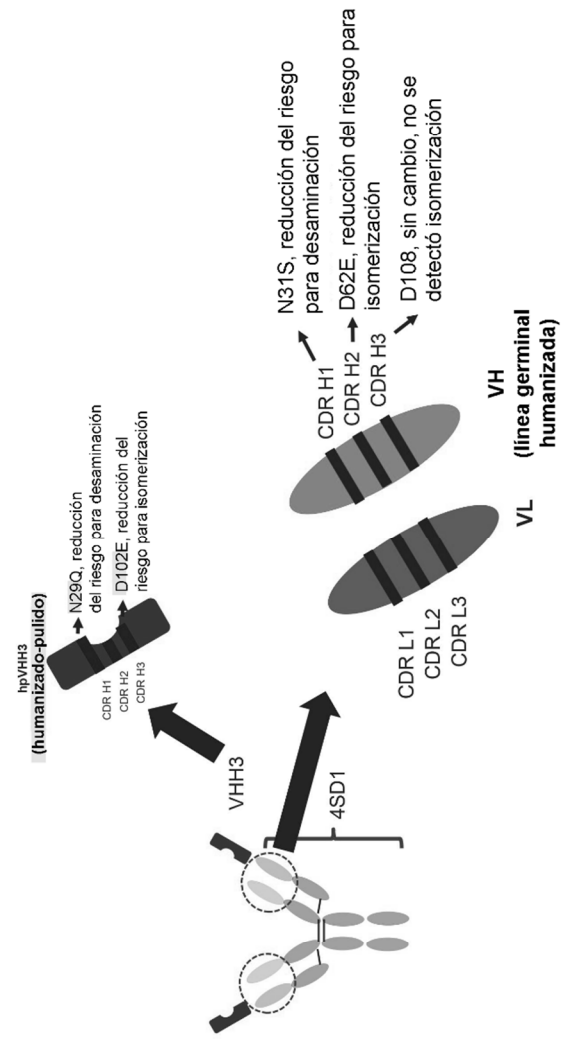


Figura 6

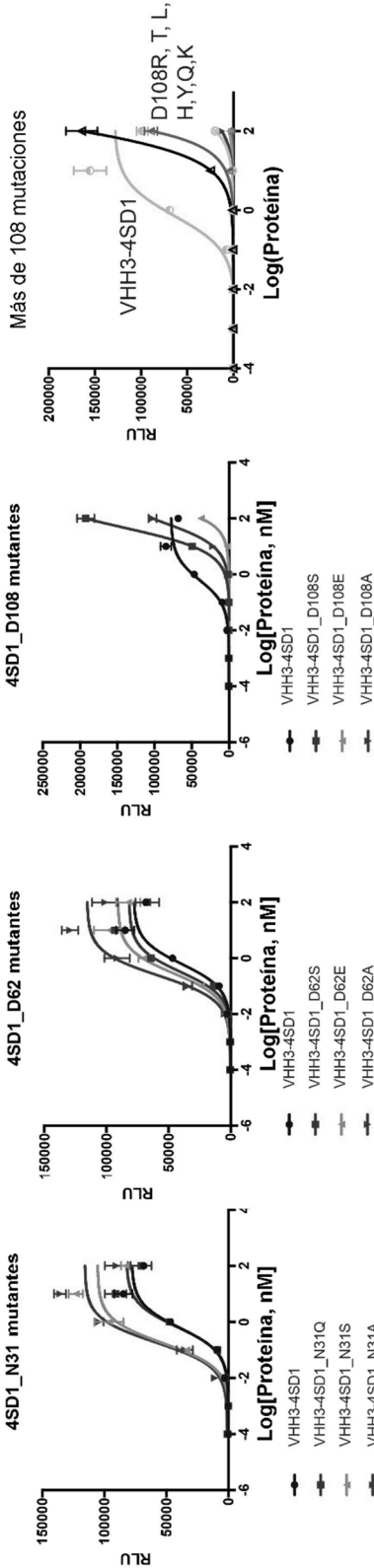
Los aminoácidos susceptibles en 4SD1 (CDR)

4SD1_LC (la porción VL anti-Fzd4)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTFTLTISLQPEDFATYYCQQS
YSTPLTFGGGTEIK (SEQ ID NO: 281)

Residuo 31

4SD1_HC (la porción VH anti-Fzd4)
EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFTNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTE
DTAVYYCARATGFGTVVFDYWGGTLTVSS (SEQ ID NO: 182)

Residuo 108



- Los mutantes de CDR1 N31 y CDR2 D62 en 4SD1 VH tienen actividad de STF similar o mayor en comparación con la molécula de origen.
- D108 en CDR3 de 4SD1 VH no se puede reemplazar.

Figura 7

hp4SD1-03

LC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASS**ANI** **SIETL**GWYRQAPGKQ**RELIANMRGGGYM**KYADSLKGRFTMTSDNSKNTMYL
QMNSLRAEDTAVYYCY**YVKLRD****DYVYR**GQGTVTVSS**GGGG**DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC**RASQSISSYLNWYQQ**
KPGKAPKLLI**YAASSLQ**SGVPSRFSGGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYC**QQSYSTPLT**FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNFP**PREAKV**QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:1)

HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT **YAMS**WVRQAPGKGLEWVS**AI**SGSGGGSTYYA **SVKGRFTISRD**SKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCAR**ATGFTVFDY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAPE**AA**GGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKV
SNKALGAPIEKTI**SKAKGQ**PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNV**FC**SCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:2)

Dominio VHH

VL
VH
Fc

Secuencia ligadora

CDR: **f**uente **n**egra en **n**egrita con **s**ubrayado

Gris: mutaciones LALAPG

Figura 9

Cambios con respecto a secuencia de origen (4SD1-03_LALAPG)

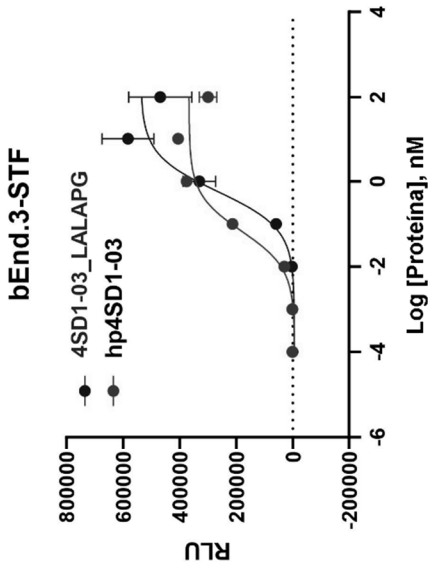
Rojo: Humanización en VHH3

Amarillo: reducción del riesgo de susceptibilidad en VHH3 CDR

Verde: humanización de la línea germinal en estructura HC

Violeta: residuos con reducción del riesgo de susceptibilidad en HC CDR

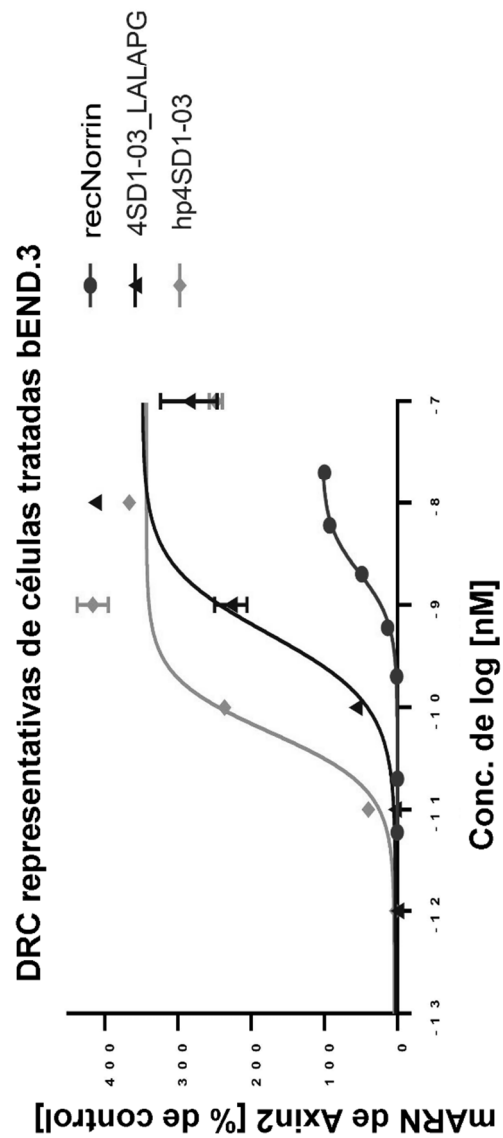
hp4SD1-3 (humanizado pulido) con mayor eficacia en ensayo celular que el 4SD1-03_LALAPG de origen



	hp4SD1-03	4SD1-03_LALAPG
EC50 (nM)	0.06	0.6

Figura 10A

hp4SD1-3 (humanizado pulido) con mayor eficacia en ensayo celular que el 4SD1-03_LALAPG de origen en la inducción de la expresión de Axin2



EC50 promedio en nM de 4 experimentos independientes

	Norrin	4SD1-03_LALAPG	hp4SD1-03
Media	1.811	1.022	0.08865

Figura 10B

Comparación de OIR_eficacia de ratón entre origen y hp4SD1-03

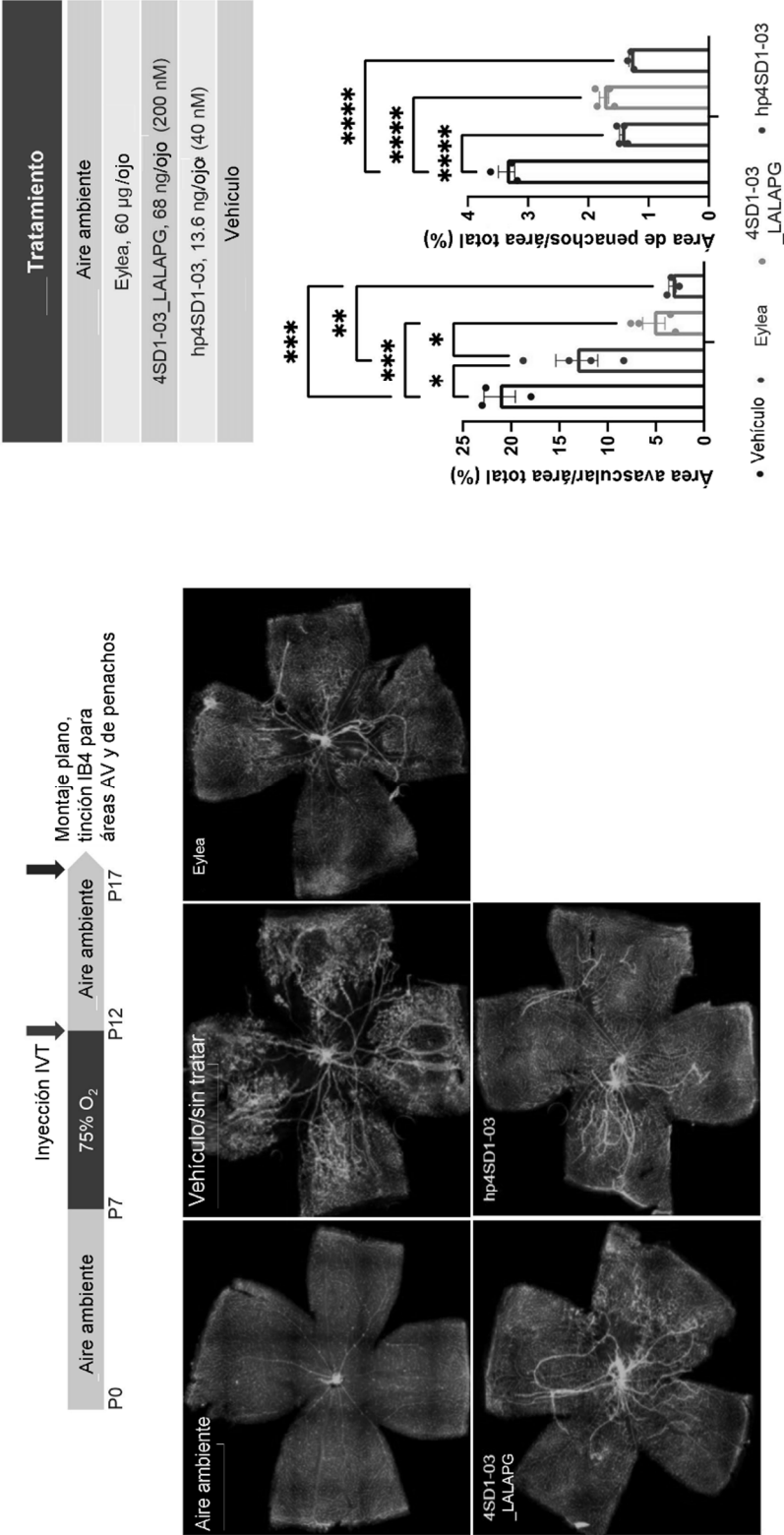
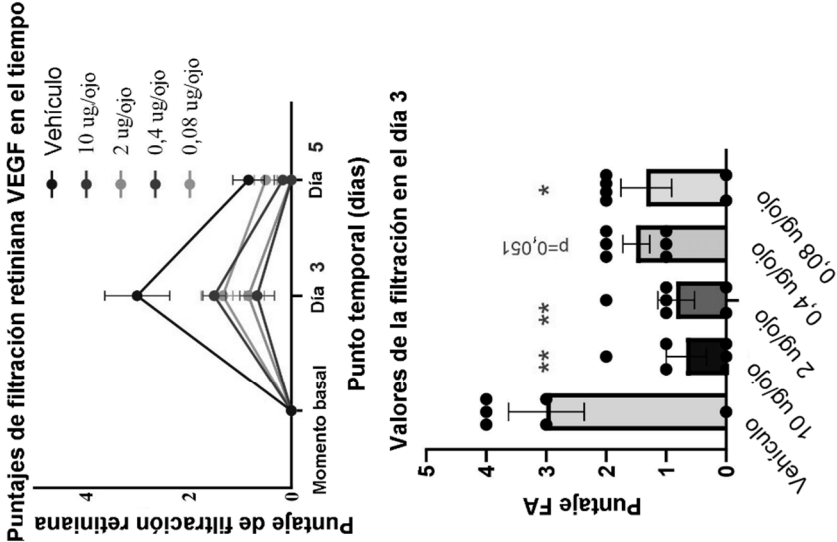


Figura 11

Eficacia de hp4SD1-03 en filtración vascular retiniana inducida por VEGF

Arm	Tratamiento	Cant. de animales	Dosis
1	Control del vehículo	6	Día 0
2	hp4SD1-03_Alto, 10 ug/ojo	6	Día 0
3	hp4SD1-03_Medio, 2 ug/ojo	6	Día 0
4	hp4SD1-03_Bajo, 0,4 ug/ojo	6	Día 0
5	hp4SD1-03_Bajo, 0,08 ug/ojo	6	Día 0
Totales: 30 conejos			



hp4SD1-03 muestra eficacia en el control de filtración vascular sin ninguna anomalía ocular observable

Figura 12

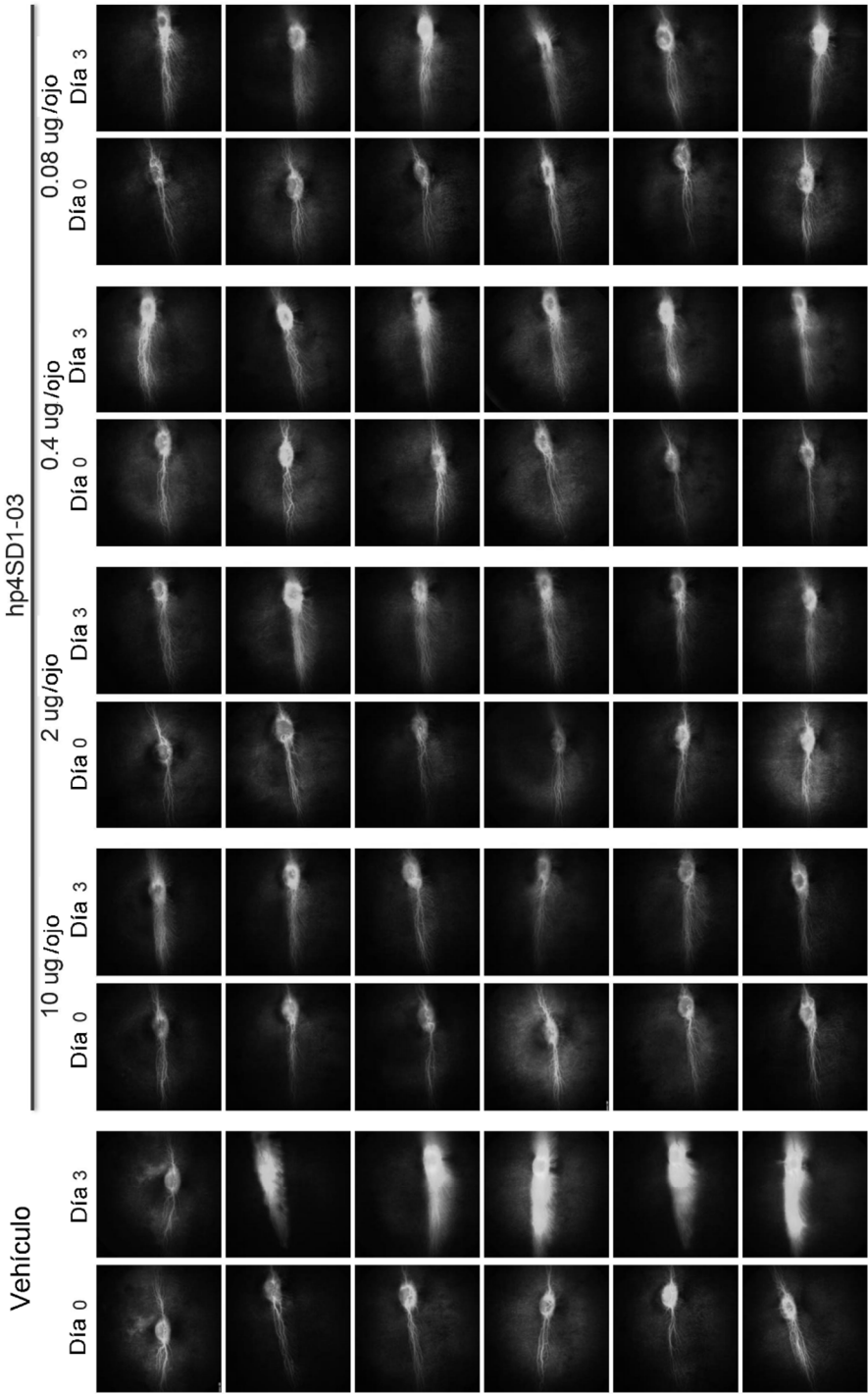
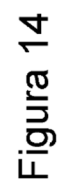
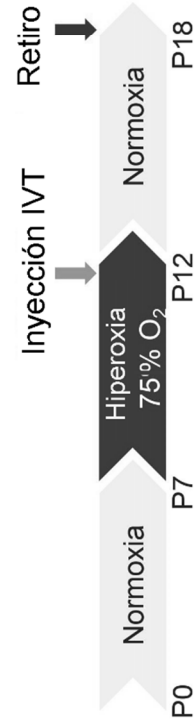


Figura 13





Criterios de valoración:

- Montaje plano de retina, tinción IB4 (OD)
- Medición de las áreas avascular (AV) y de penachos neovasculares (NV)

Group	Injury	Treatment
A	OIR	Vehículo
B	OIR	hp4SD1-03, 13.6 ng, 40 nM
C	OIR	hp4SD1-03, 136 ng, 400 nM
D	OIR	hp4SD1-03, 1360 ng, 4000 nM

Grupo
Lesión
Tratamiento

Figura 15A

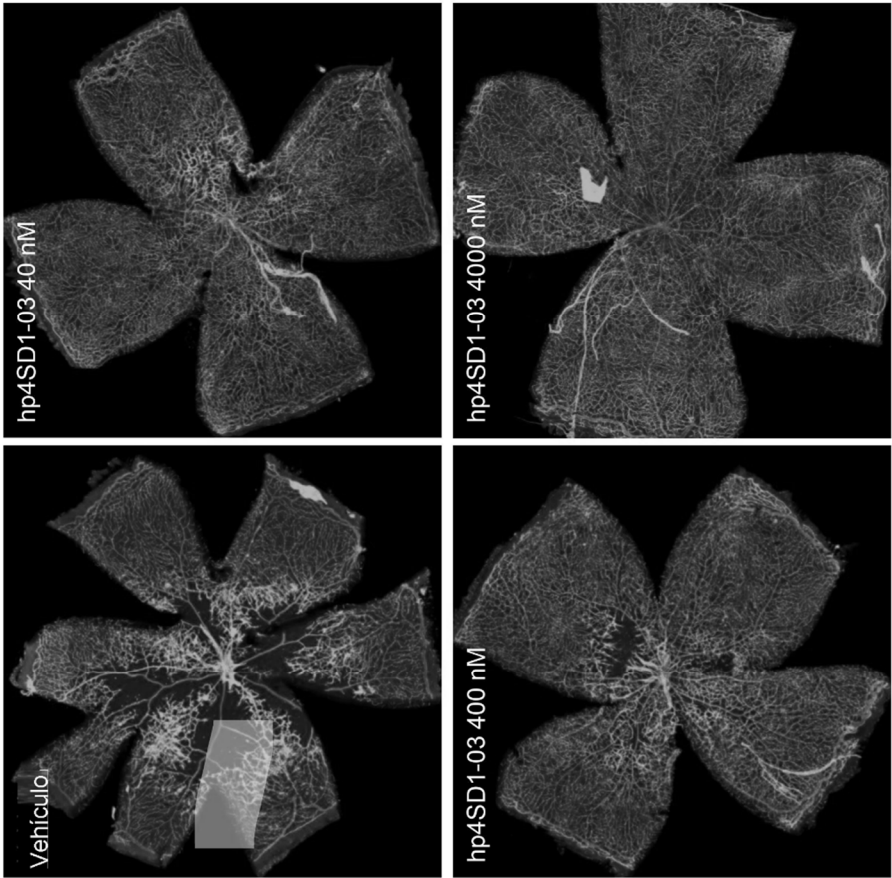


Figura 15B

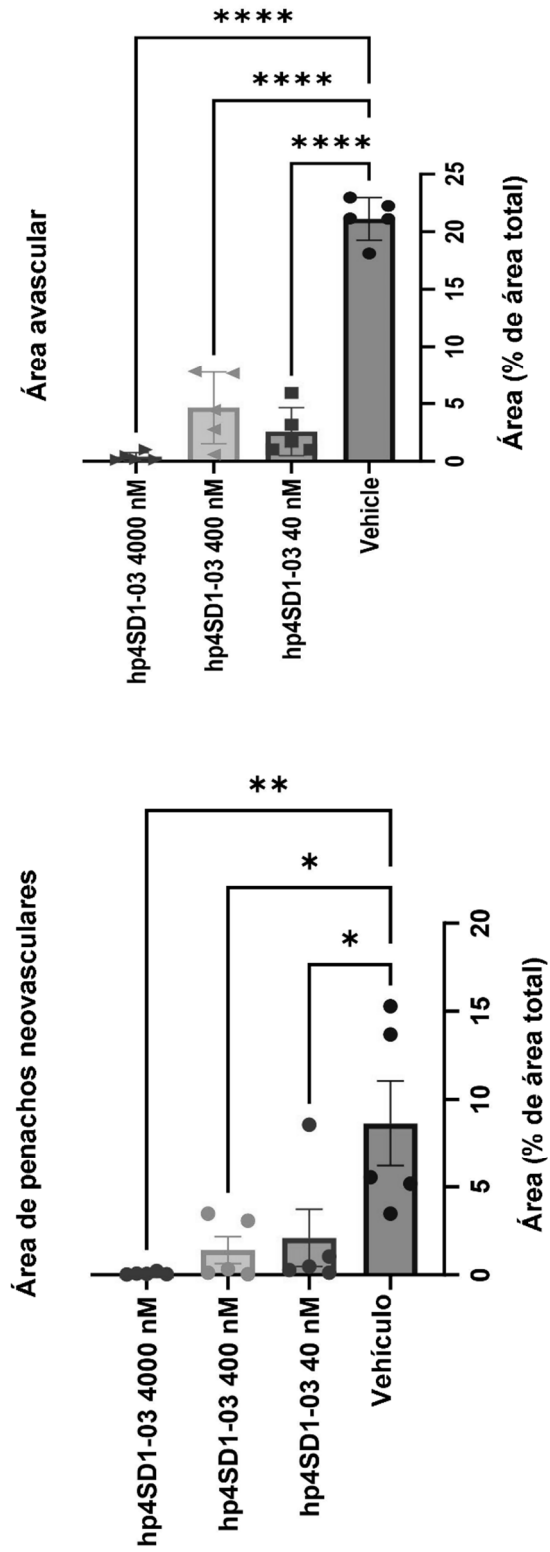


Figura 15C

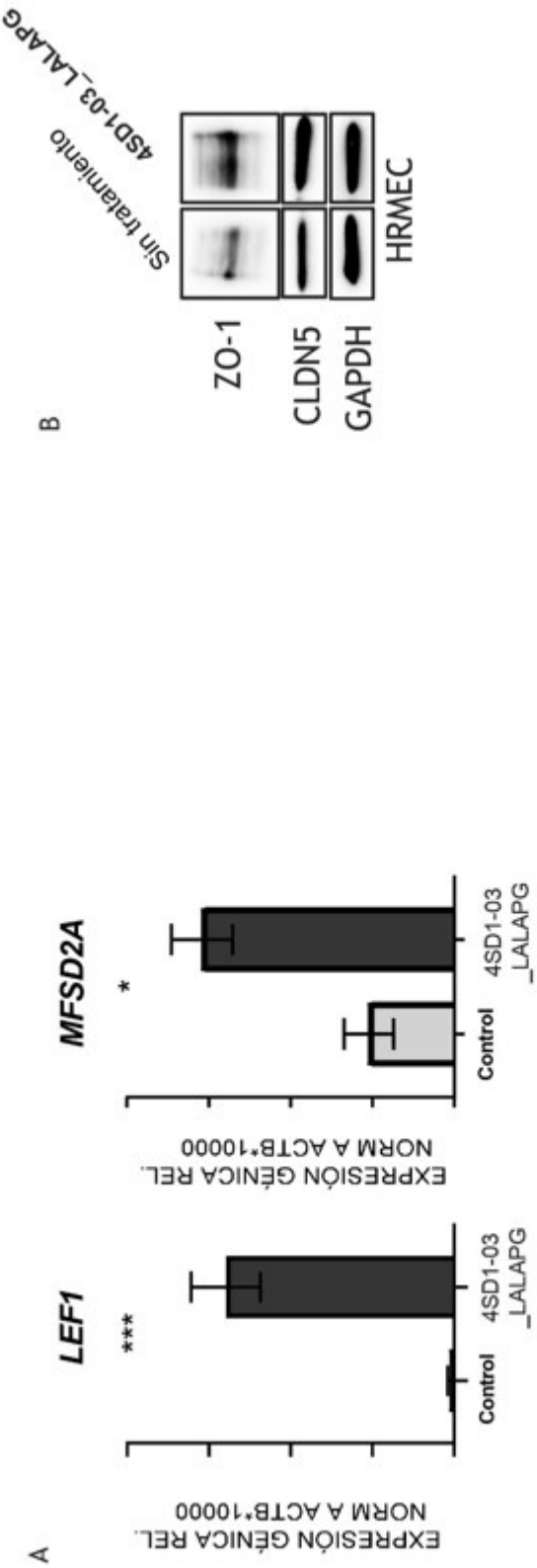


Figura 16B

Figura 16A

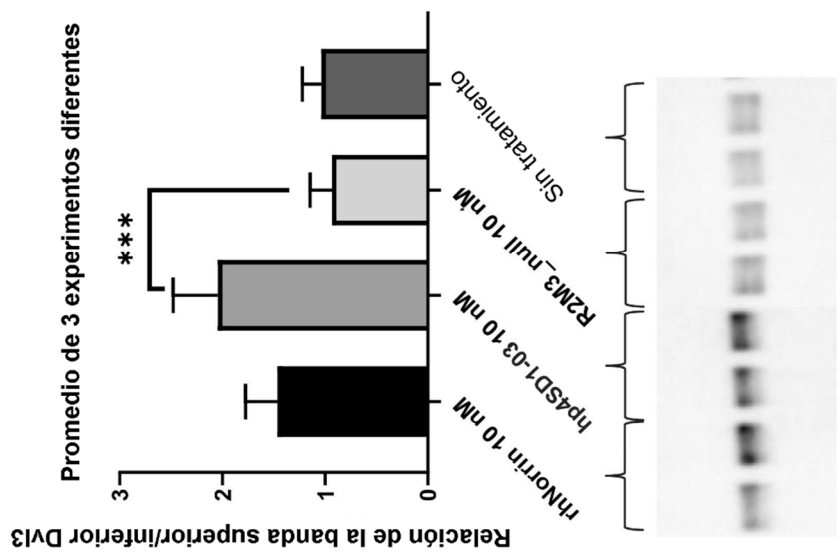


Figura 16C

Mayor afinidad a Fzd4 CRD (mediante BLI)

Figura 17A

4SD1-03_LALAPG

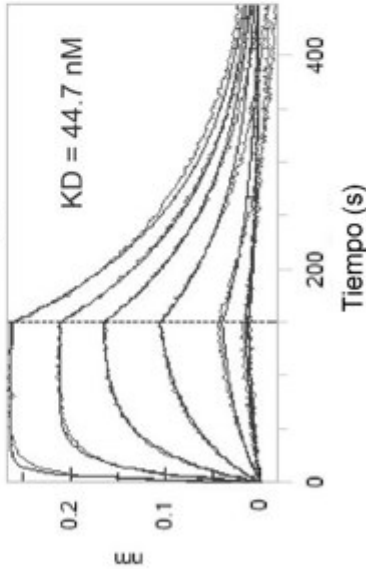


Figura 17B

hp4SD1-03

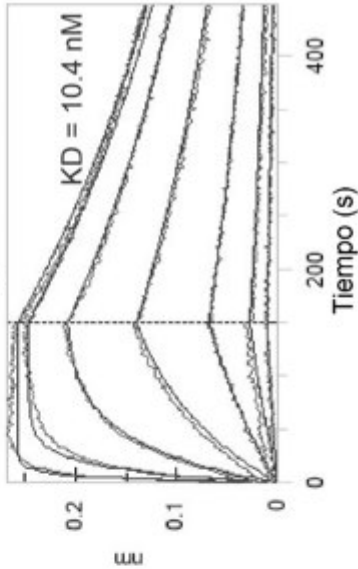


Figura 17C

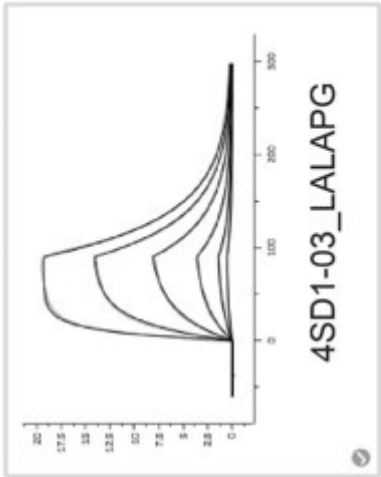
Muestra de carga	Conc. de FZD4 CRD (nM)	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
4SD1-03_LALAPG	1000	4.47E-08	2.04E+05	9.13E-03
	333.3	4.47E-08	2.04E+05	9.13E-03
	111.1	4.47E-08	2.04E+05	9.13E-03
	37	4.47E-08	2.04E+05	9.13E-03
	12.4	4.47E-08	2.04E+05	9.13E-03
	4.12	4.47E-08	2.04E+05	9.13E-03
	1.37	4.47E-08	2.04E+05	9.13E-03
hp4SD1-03	1000	1.04E-08	2.23E+05	2.31E-03
	333.3	1.04E-08	2.23E+05	2.31E-03
	111.1	1.04E-08	2.23E+05	2.31E-03
	37	1.04E-08	2.23E+05	2.31E-03
	12.4	1.04E-08	2.23E+05	2.31E-03
	4.12	1.04E-08	2.23E+05	2.31E-03
	1.37	1.04E-08	2.23E+05	2.31E-03

Mayor afinidad a Fzd4 CRD (mediante SPR)

Figura 18A

Figura 18B

Concentración de captura: 1 µg/mL



Concentración de captura: 1 µg/mL

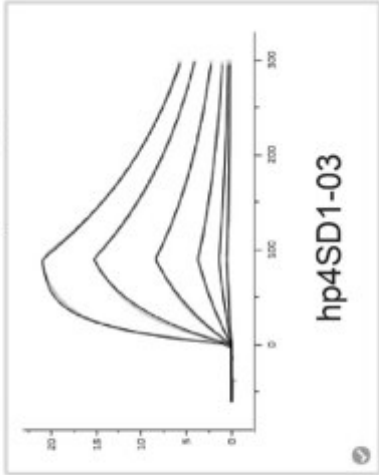


Figura 18C

Promedio de las mediciones en cuatro concentraciones de captura

Muestra	k_a (1/Ms) (desviación estándar)	k_d (1/s) (desviación estándar)	K_D aparente (M) (desviación estándar)
4SD1-03_LALAPG	3,13E+04 (9,20E+02)	2,28E-02 (9,85E-05)	7,29E-07 (2,17E-08)
hp4SD1-03	1,82E+04 (3,38E+02)	6,28E-03 (3,01E-05)	3,45E-07 (6,34E-09)

hp4SD1-03-AAQ

LC VHH=Negrita; recubrimiento G4S =gris claro; VL=negro subrayado; constante de Kappa LC= cursiva negro
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSANIQSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYADSLKG
RFTMSTDNSKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCYVKLRDEDVYRGQGTQVTVSSGGGGSDIQMTQS
PSSLASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC (SEQ ID NO: 1)

24/41

HC VH= cursiva negro; CH=negro; Fc=negrita subrayado
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTYYAESV
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARATGFGTWFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKV
NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNQYTKKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 450)

Figura 19A

hp4SD1-03-AAA

LC VHH=Negrita; recubrimiento G4S=gris claro; VL=negro subrayado; constante de Kappa LC= cursiva negro
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSANIQSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYADSLKG
RFTMSTDNSKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCYVKLRDEDEYVYRGQGTQTVSSGGGGSDIQMTQS
PSSLASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGDTFTLT
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC (SEQ ID NO: 1)

25/41

HC VH= cursiva negro; CH=negro; Fc=negrita subrayado
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAESVK
GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARATGFGTVVFDYWGGGLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYCKVSNKALG
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNAITQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 451)

Figura 19B

hp4SD1-03 y sus mutantes Fc hp4SD1-03 AAQ y AAA se pueden purificar mediante resina por afinidad de proteína A y luego SEC

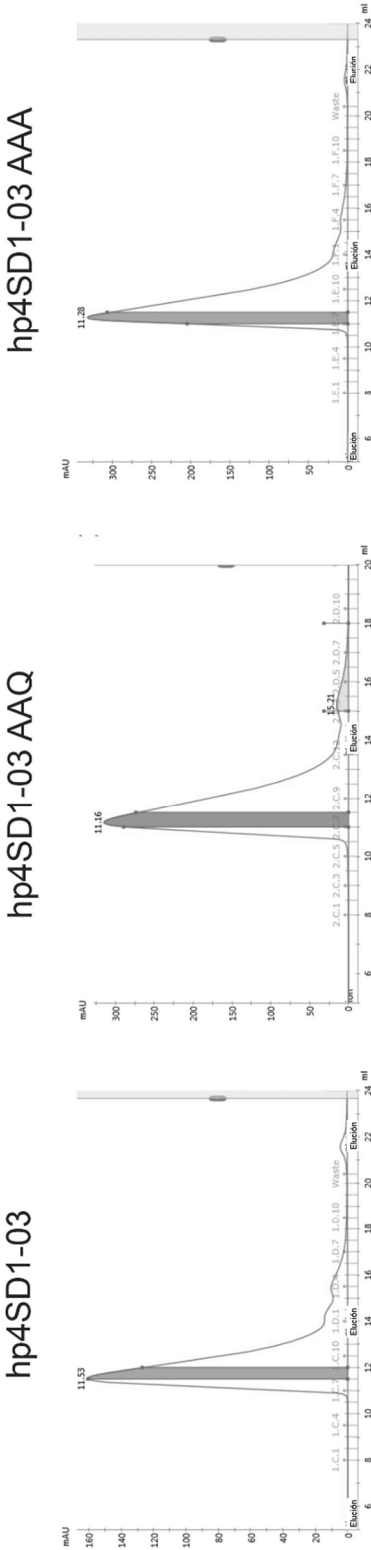


Figura 20

Temperatura de fusión de hp4SD1-03 y hp4SD1-03 AAQ y AAA

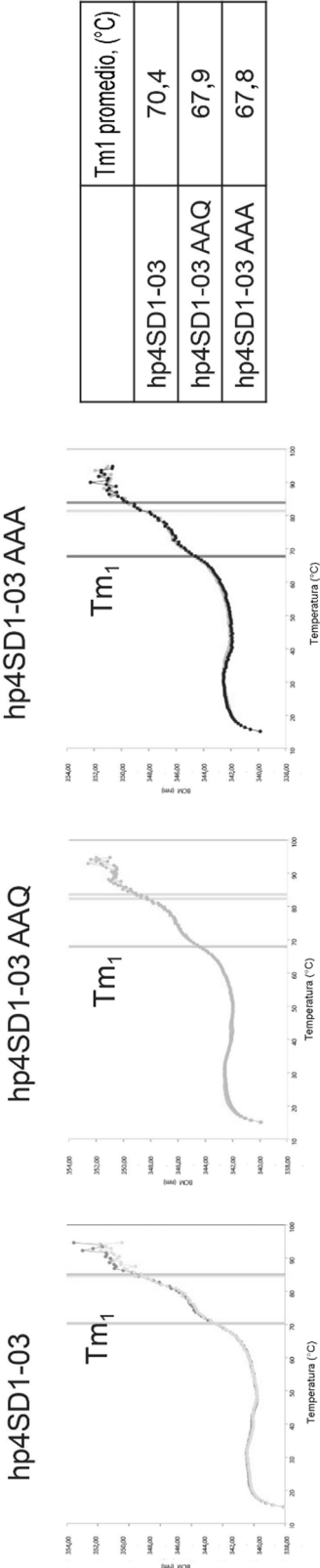
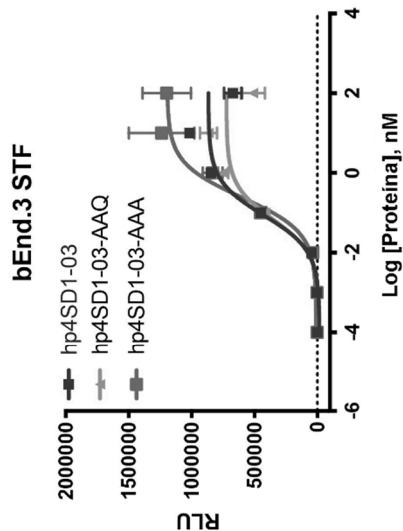


Figura 21

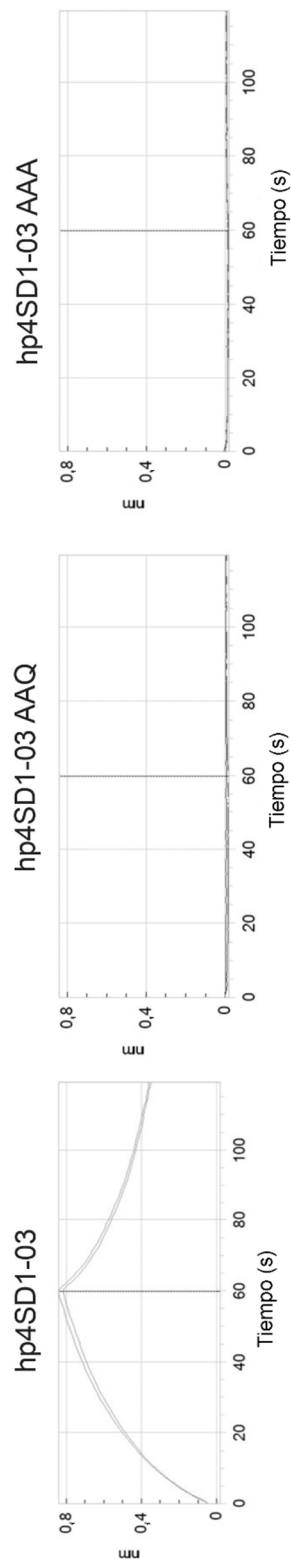
Comparación de la actividad de STF: hp4SD1-03 y sus mutantes Fchp4SD1-03 AAQ y AAA



	hp4SD1-03	hp4SD1-03 AAQ	hp4SD1-03 AAA
EC50 (nM)	0,09	0,07	0,25

Figura 22

Los mutantes Fc de hp4SD1-03, hp4SD1-03-AAQ y hp4SD1-03-AAA no se unen al receptor Fc neonatal, FcRn



Muestra de carga: FcRn 100 nM se capturó en el sensor NTS
Analito: hp4SD1-03, hp4SD1-03-AAQ, hp4SD1-03-AAA 100 nM

Figura 23

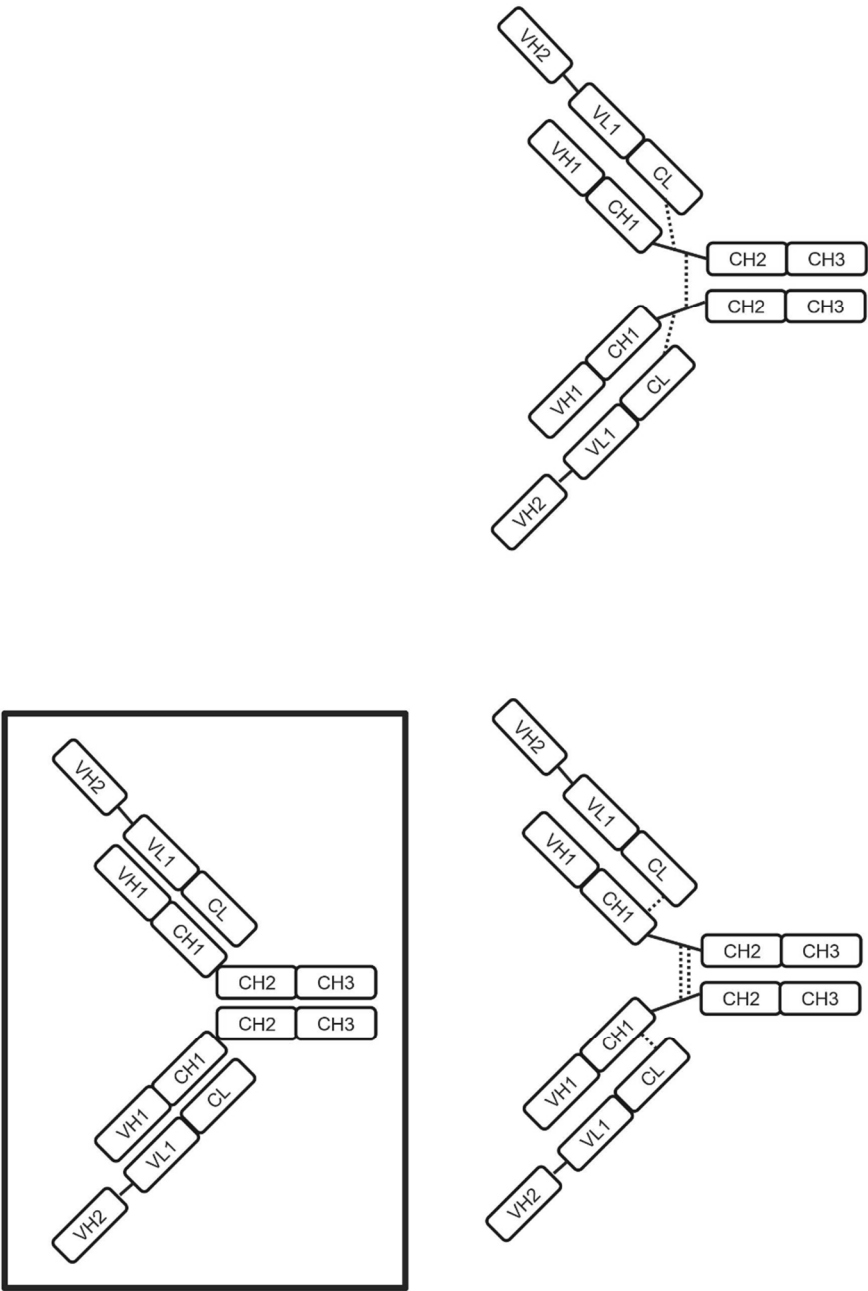


Figura 24

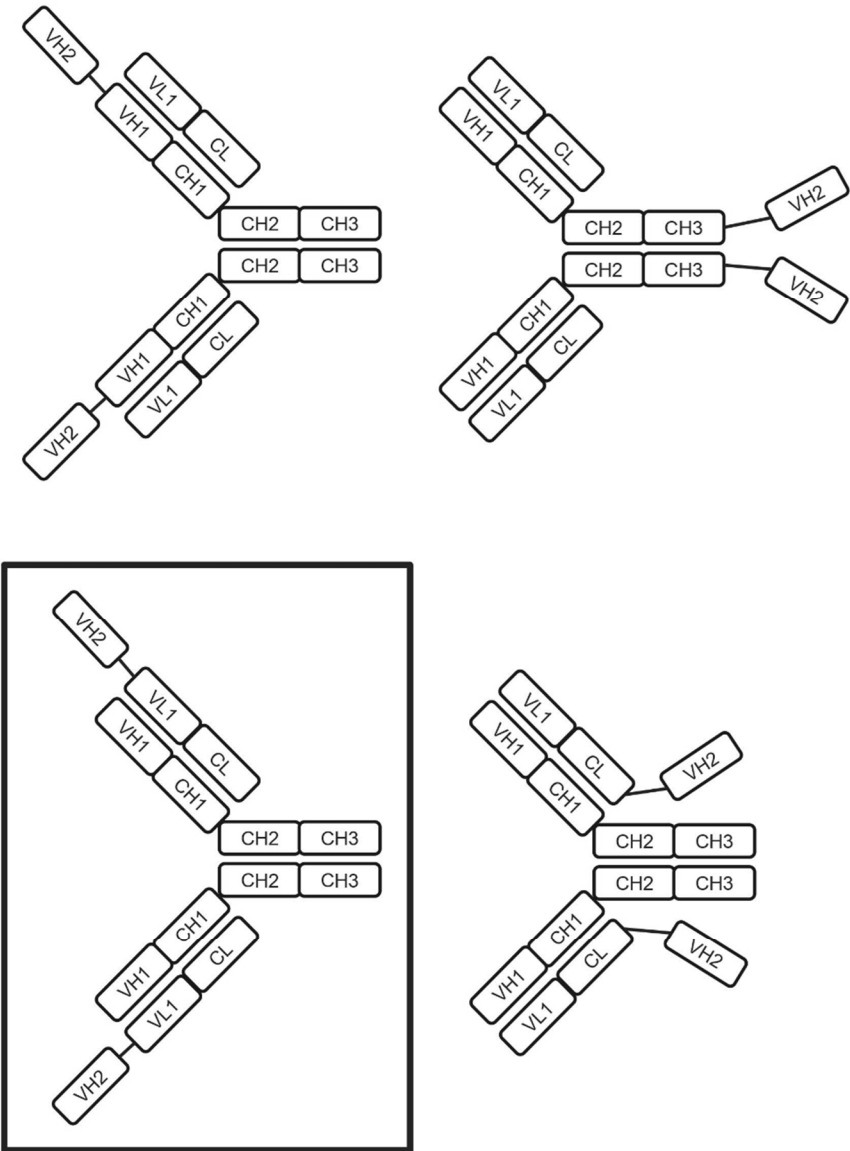


Figura 25

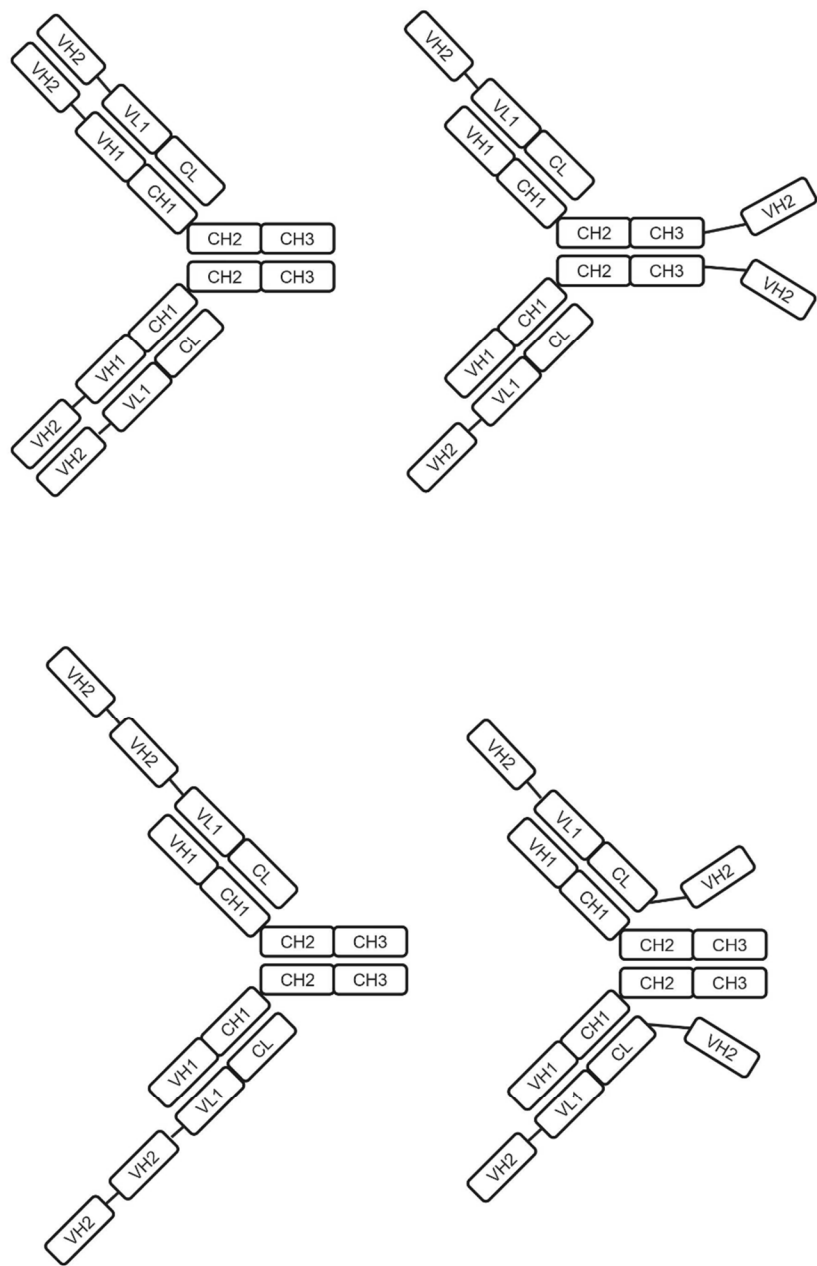


Figura 26

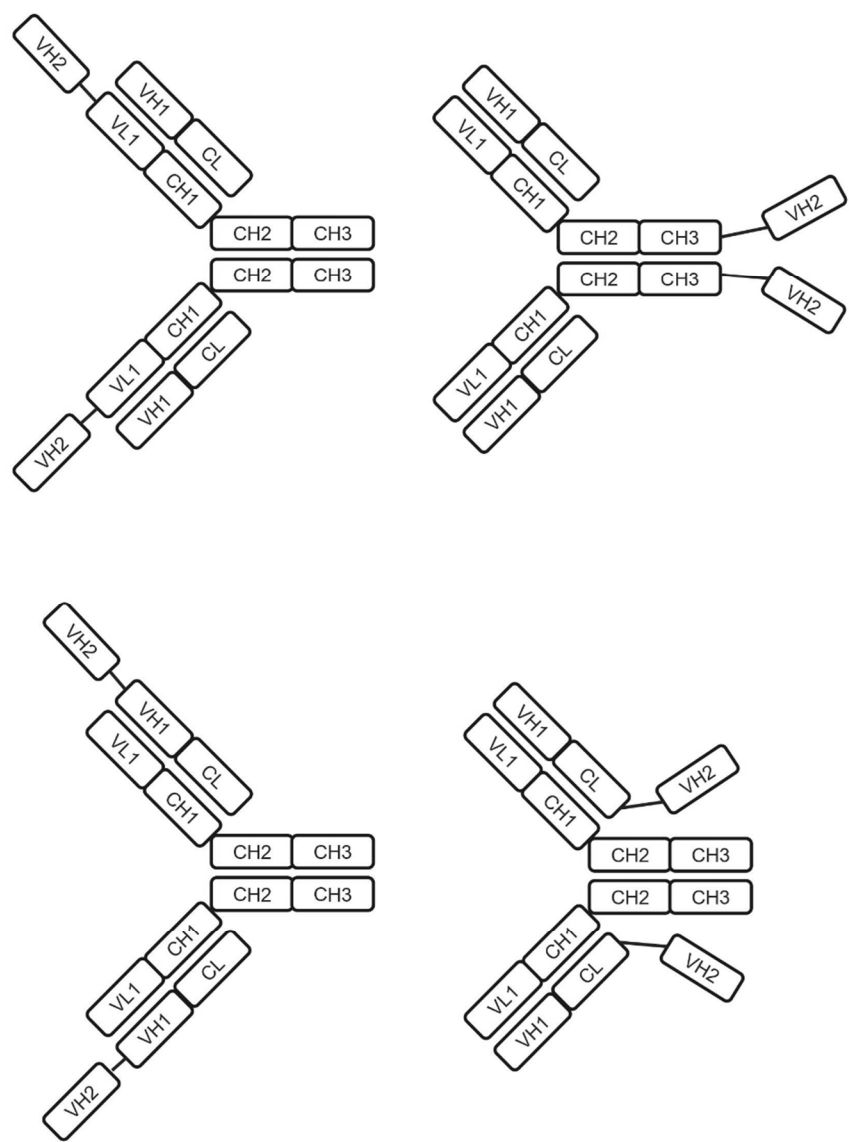


Figura 27

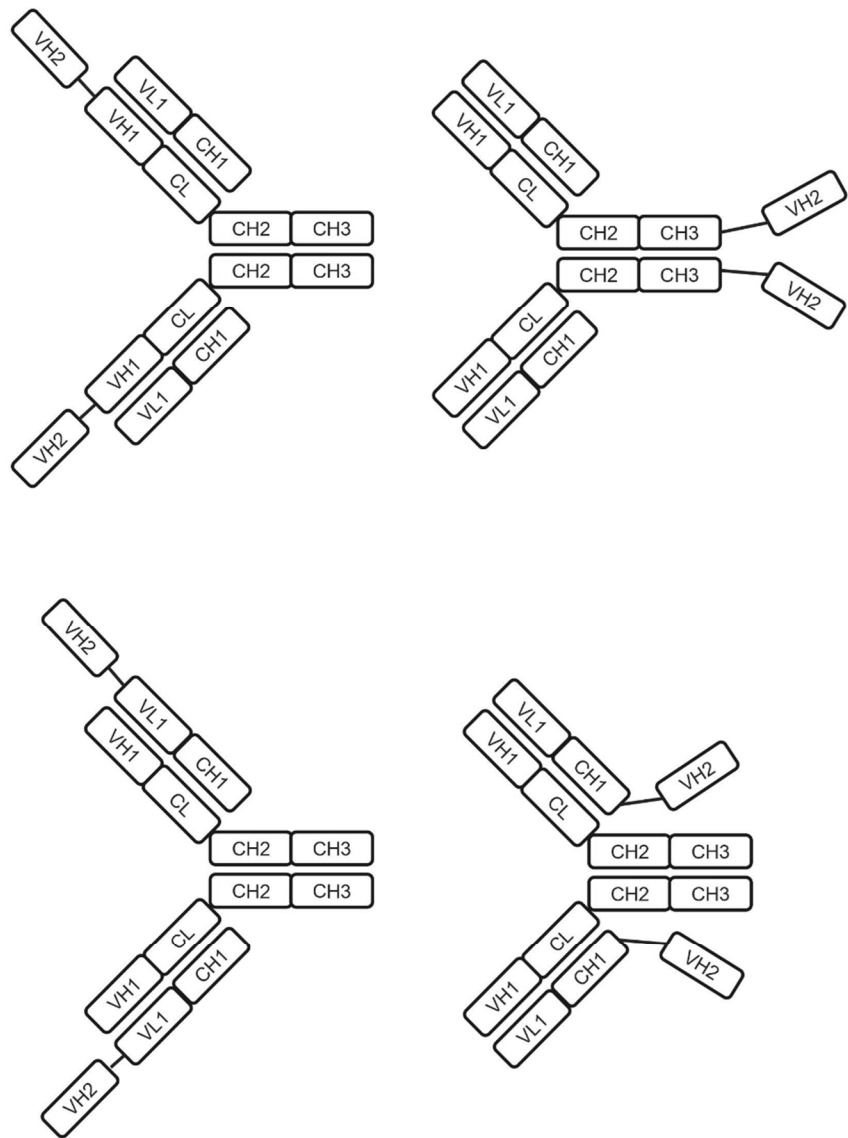


Figura 28

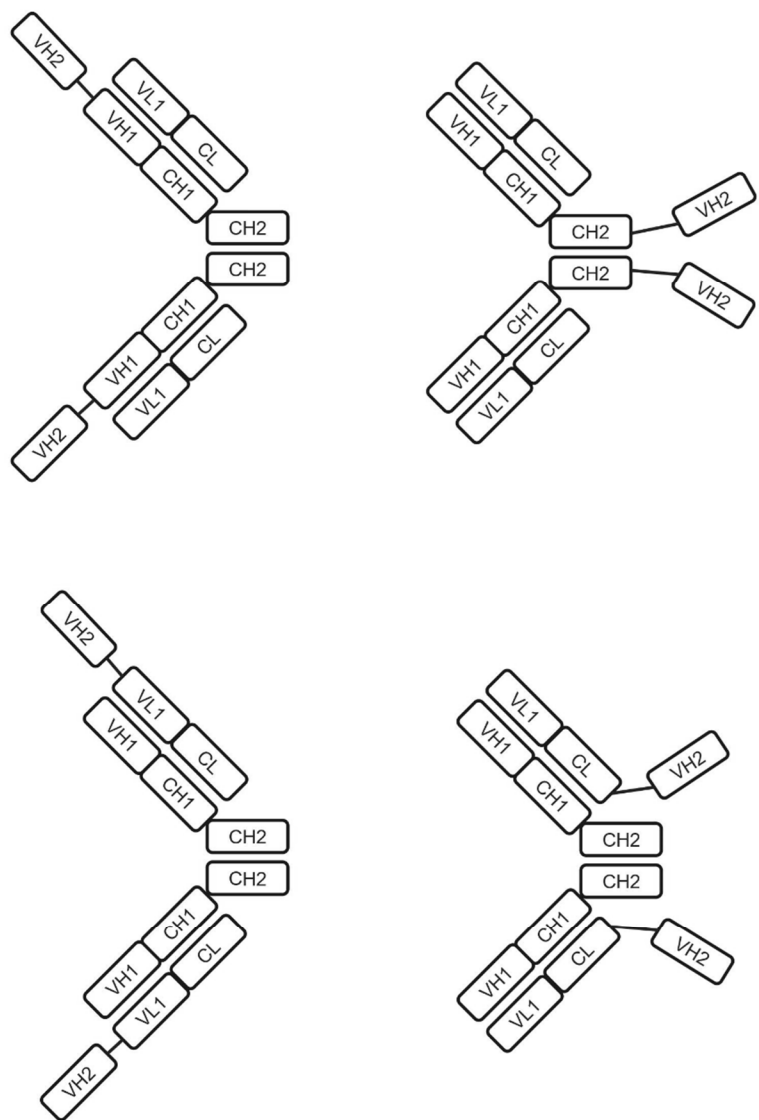


Figura 29

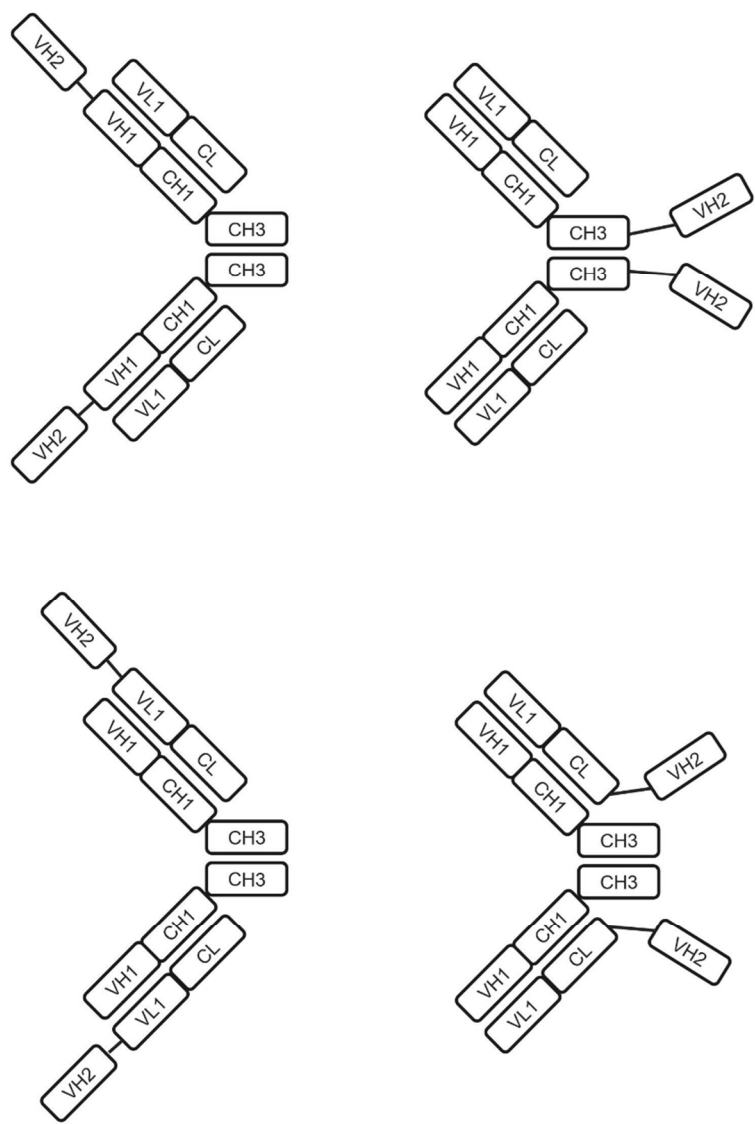


Figura 30

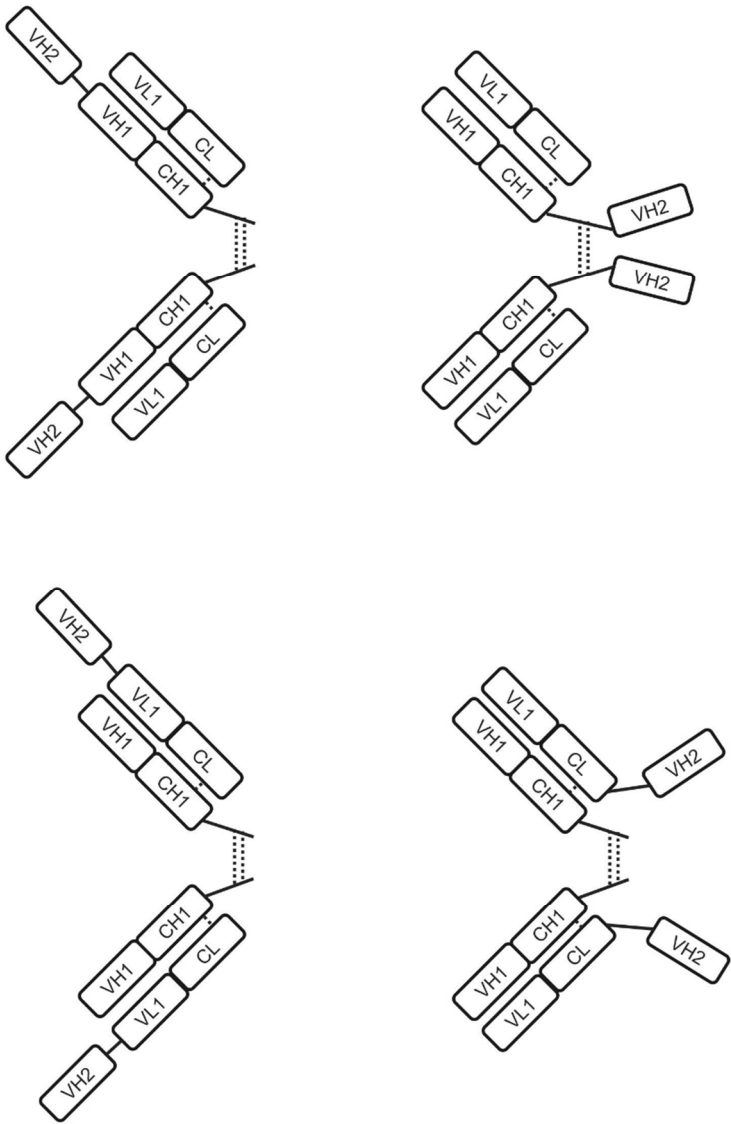


Figure 31

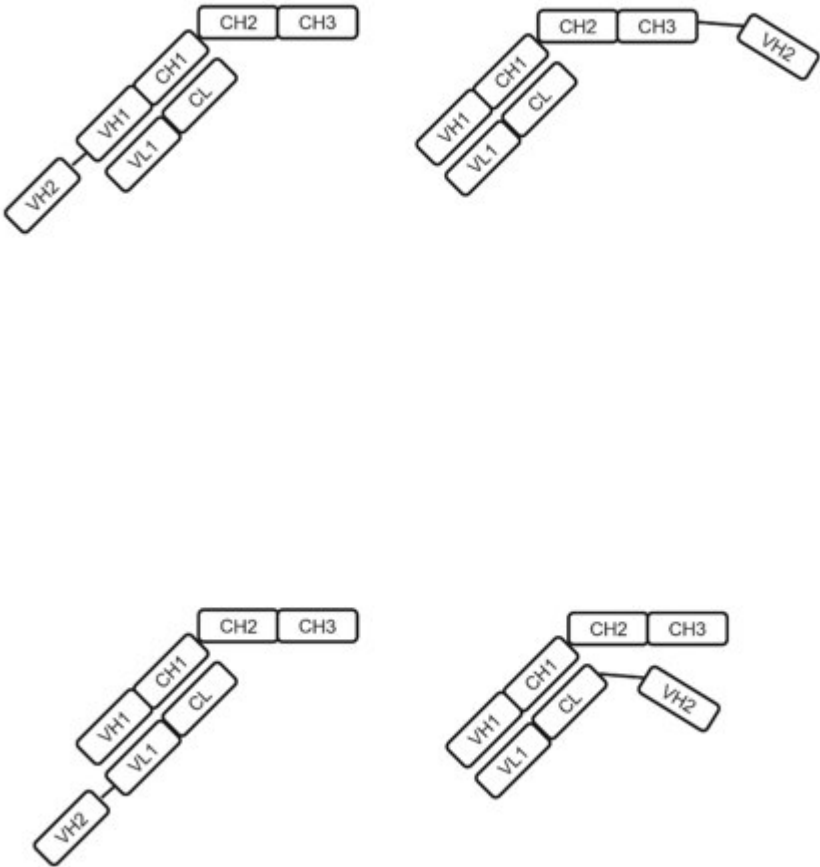


Figura 32A

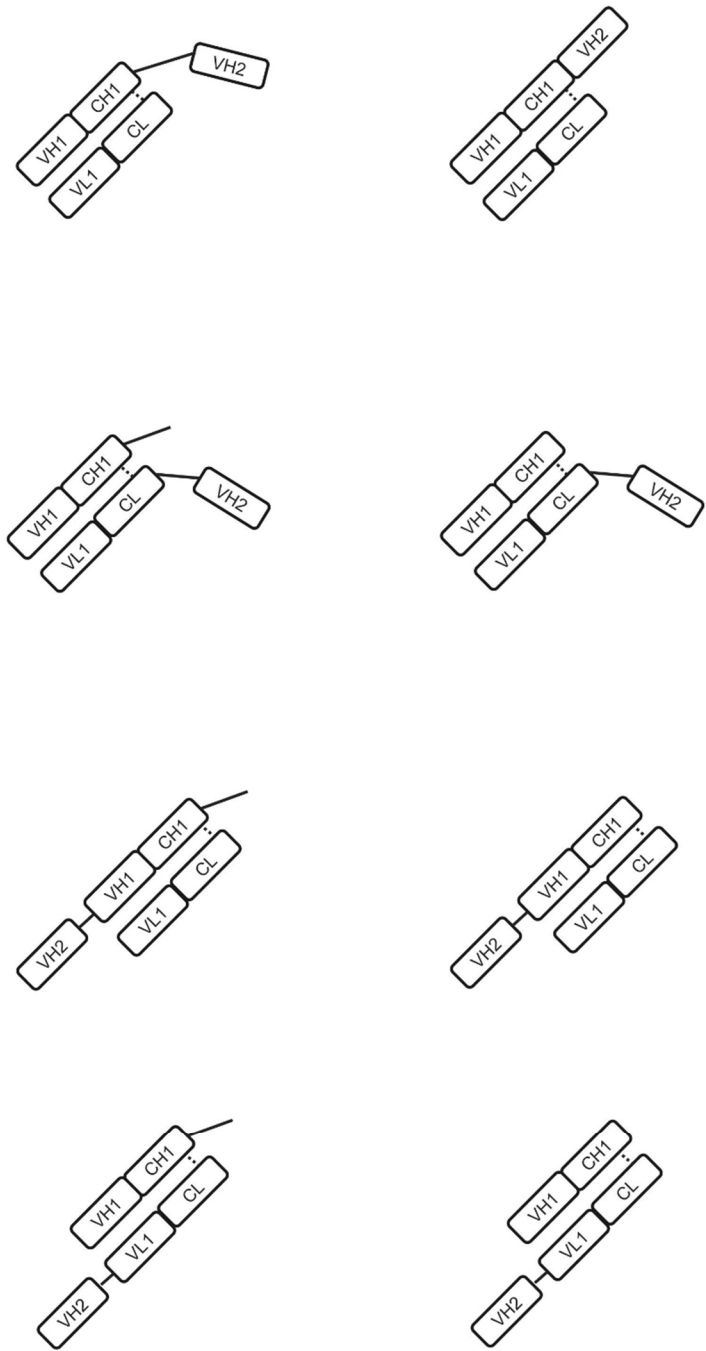


Figura 32B

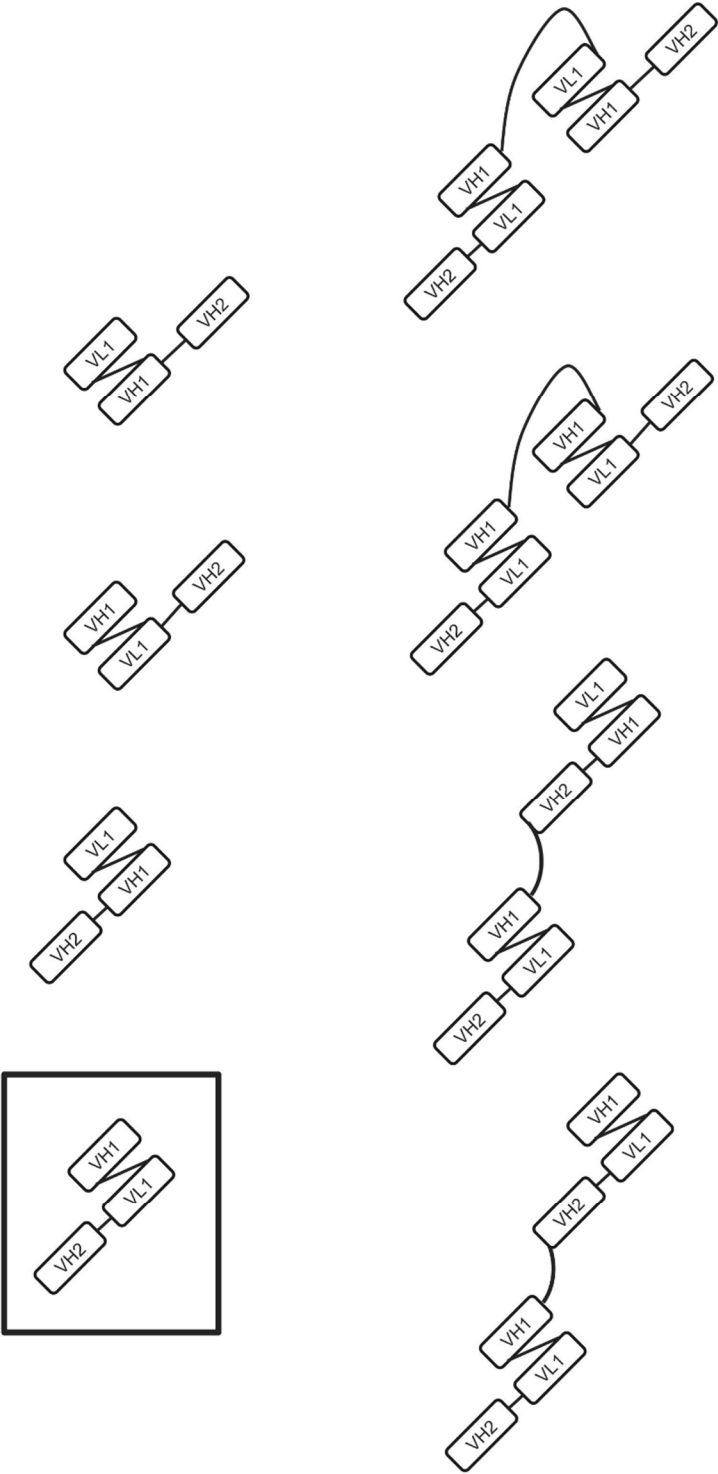


Figura 33

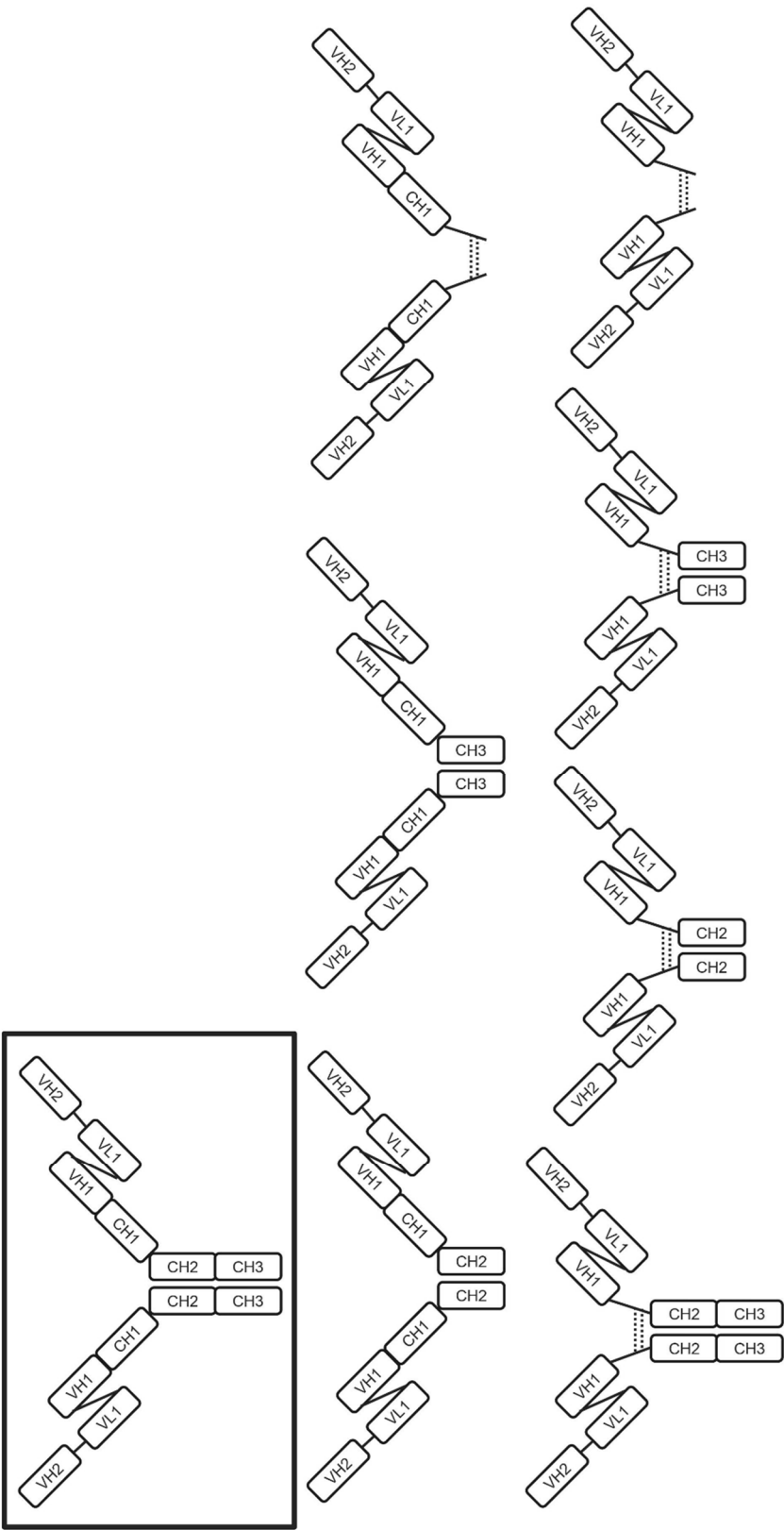


Figura 34