

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 736**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2008** **E 08867163 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015** **EP 2235063**

54 Título: **Anticuerpos anti-hedgehog**

30 Prioridad:

28.12.2007 US 17232 P
24.09.2008 US 99864 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
23.11.2015

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:

SCALES, SUZANNA J.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 551 736 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-hedgehog

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere de forma general a métodos para el diagnóstico del cáncer y para la detección de la expresión de proteínas en tumores. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos que se unen a la hedgehog de mamífero, y a su uso en el diagnóstico y el tratamiento de afecciones caracterizadas por la expresión hedgehog, incluyendo el cáncer.

Antecedentes de la invención

Los miembros de la familia *hedgehog* de moléculas de señalización median en muchos procesos importantes de diseño de corto y de largo alcance durante el desarrollo embrionario, fetal y del adulto en invertebrados y en vertebrados. En *Drosophila melanogaster*, un único gen hedgehog regula el diseño del disco segmental e imaginal. Por el contrario, en los vertebrados, una familia de genes hedgehog (por ejemplo, en los mamíferos, *Shh*, *Dhh*, *Ihh*, en conjunto "*Hh*") está implicada en el control de la proliferación, de la diferenciación, de la migración y de la supervivencia de las células y de los tejidos derivados de las tres capas germinales, incluyendo, por ejemplo, la asimetría izquierda-derecha, el desarrollo del SNC, el diseño de las somitas y de las extremidades, la condrogénesis, la esqueletogénesis y la espermatogénesis.

La señalización hedgehog se produce a través de la interacción de la proteína hedgehog con el receptor hedgehog, Patched (*Ptch*) y el co-receptor Smoothened (*Smo*). Existen dos homólogos mamíferos de *Ptch*, *Ptch-1* y *Ptch-2* (en conjunto "*Ptch*"), siendo ambos 12 proteínas transmembranales que contienen un dominio de sensibilización a esterol (Motoyama *et al.*, Nature Genetics 18: 104 - 106 (1998), Carpenter *et al.*, P.N.A.S. (EE.UU.) 95 (23): 13630 - 40 (1998). La interacción de *Hh* con *Ptch* desencadena una cascada de señalización que da como resultado la regulación de la transcripción por factores de transcripción de dedo de cinc de la familia *Gli*.

Los tumores malignos (cánceres) son la segunda causa de muerte en los Estados Unidos, después de la enfermedad cardíaca (Boring *et al.*, CA Cancer. J. Clin. 43: 7 (1993)). El cáncer presenta una o más de las siguientes características: (1) un aumento en el número de células anormales o neoplásicas derivadas de un tejido normal que proliferan para formar una masa tumoral, (2) la invasión de los tejidos adyacentes por parte de estas células tumorales neoplásicas, y (3) la generación de células malignas, que finalmente se diseminan a través de la sangre o del sistema linfático hasta los nódulos linfáticos regionales y a sitios distantes a través de un proceso denominado metástasis. En un estado canceroso, una célula prolifera en unas condiciones en las que las células normales no crecerían. El propio cáncer se manifiesta en una gran diversidad de formas, caracterizadas por diferentes grados de invasividad y agresividad.

Como a menudo es el caso cuando las rutas que son activas durante el desarrollo embrionario, y prácticamente inactivas en los adultos, la reactivación de la señalización hedgehog se ha implicado en una gran diversidad de cánceres y carcinogénesis. Los ejemplos más tempranos de señalización Hh en cánceres proceden del descubrimiento del síndrome de Gorlin, en el que los pacientes sufren frecuentemente carcinomas de células basales y también están predispuestos a la aparición de meduloblastomas y de rabdomiosarcomas, que es debido a una mutación inactivante en *Ptch*, que da como resultado la activación de la ruta Hh (Hahn *et al* 1998 Cell 85 pág. 841; Johnson *et al* 1996, Science 272 pág. 1668). Posteriormente se averiguó que las mutaciones inactivantes en *Ptch* (~ 90 %) y o las mutaciones activantes en *Smo* (~ 10 %) eran responsables de los carcinomas de células basales esporádicos (Xie *et al* 1998, Nature 391 pág. 90).

Recientemente ha quedado claro que existe otra clase de cánceres asociados con la Hh, que dependen de la secreción de un ligando de la Hh a partir del tumor, en lugar de la activación mutacional, para la activación de la ruta. Dichos cánceres incluyen cánceres de próstata, de páncreas y de pulmón microcítico (Watkins *et al* 2003, Nature 422 pág. 313; Thayer *et al* 2003 Nature 425 pág. 851; Berman *et al* 2003 Nature 425 pág. 846). Un subconjunto de dichos cánceres puede ser tratado con antagonistas de la Hh tales como antagonistas de molécula pequeña de *Smo* o el anticuerpo anti-Hh 5E1 (Chen *et al* 2002, PNAS 99 pág. 14071; Williams *et al* 2003 PNAS 100 pág. 4616; Rubin y de Sauvage 2006 Nature Reviews Drug Discovery 5 pág.1026). Aunque no todos los tumores que expresan la Hh responden a dichos antagonistas, es muy probable que aquellos que no expresan la Hh no respondan; de hecho, el modelo de xenoinjerto colorrectal negativo para Hh DLD-1 no es inhibido por dicho tratamiento en las condiciones en las que los modelos tumorales positivos para Hh LS180, HT29 y HT55 sí lo son (Yauch / de Sauvage *et al.*, enero de 2008). Como resultado, existe una necesidad de una técnica eficaz para la determinación de la expresión hedgehog antes de la aplicación de antagonistas hedgehog, de forma que se identifiquen los tumores secretores de hedgehog, con objeto de maximizar la tasa de respuesta global.

Los anticuerpos disponibles actualmente que se unen a la hedgehog de mamífero (por ejemplo, H160, Santa Cruz Biotech) son reactivos ineficaces para detectar la presencia de la señalización hedgehog debido a que no muestran una sensibilidad suficiente en ausencia de una tinción de fondo. Esto es particularmente cierto para muestras de

tejido FFPE (incluido en parafina y fijado con formalina).

Como resultado, existe una necesidad de anticuerpos que se unan a la hedgehog de mamífero (por ejemplo, sonic hedgehog, Indian hedgehog y desert hedgehog), particularmente en muestras en FFPE, para su uso en la detección de la expresión hedgehog tanto en ensayos diagnósticos como en regímenes de tratamiento.

Sumario de la invención

La invención proporciona anticuerpos anti-hedgehog y su uso en la detección de la expresión hedgehog y en el tratamiento del cáncer, incluyendo el que responde a hedgehog. La presente invención es según se establece en las reivindicaciones.

En una forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-hedgehog que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende: HCFR1-HCHVR1-HCFR2-HCHVR2-HCFR3-HCHVR3-HCFR4-CR y la cadena ligera comprende: LCFR1-LCCDR1-LCFR2-LCCDR2-LCFR3-LCCDR3-LCFR4. En un aspecto específico, el anticuerpo anti-Hh comprende las secuencias de la cadena pesada y ligera de 95,9.

En otra forma de realización, la invención se refiere a un método para la detección de la expresión hedgehog en un tejido que comprende poner en contacto dicho tejido con un anticuerpo anti-hedgehog y medir el grado de unión, según se define en las reivindicaciones. El anticuerpo anti-hedgehog puede unirse a un polipéptido hedgehog en un epítipo dentro de la región de los residuos de aminoácidos 70 - 96. En un aspecto específico, el tejido es un tumor o un cáncer. En otro aspecto específico más, el tejido se extrae del hospedador antes de la determinación. En un aspecto específico adicional, la muestra de tejido está FFPE antes de entrar en contacto con el anticuerpo anti-Hh. En un aspecto específico adicional, el método de determinación se selecciona entre el grupo que consiste en: una IHC y una inmunotransferencia Western. En un aspecto específico, la sensibilidad de unión es mayor que la del anticuerpo anti-Hh H160. En un aspecto específico adicional, el anticuerpo anti-Hh no compite con ptch por la unión al Shh. En un aspecto específico adicional, el anti-Hh se selecciona entre el grupo que consiste en 95,3, 95,7 y 95,9.

En otra forma de realización más, la invención se refiere a un método para la identificación de tumores sensibles a los antagonistas hedgehog, que comprende poner en contacto el tejido tumoral o el tejido próximo al tumor, con un anticuerpo anti-hedgehog según se define en las reivindicaciones. El anticuerpo anti-hedgehog puede unirse al polipéptido hedgehog en un epítipo dentro de la región de los residuos de aminoácidos 70 - 96 y determinar si la hedgehog está sobreexpresada en dicho tejido en comparación con el tejido normal. En un aspecto específico, el tejido se extrae del hospedador antes de la determinación. En otro aspecto específico más, la muestra de tejido está FFPE antes de entrar en contacto con el anticuerpo anti-Hh. En un aspecto específico adicional, el método de determinación se selecciona entre el grupo que consiste en: una IHC y una inmunotransferencia Western. En un aspecto específico, la sensibilidad de unión es mayor que la del anticuerpo anti-Hh H160. En un aspecto específico adicional, el anticuerpo anti-Hh no compite con ptch por la unión al Shh. En un aspecto específico adicional, el anti-Hh se selecciona entre el grupo que consiste en 95,3, 95,7 y 95,9.

En una forma de realización adicional, la invención se refiere a un régimen para el tratamiento del cáncer en un paciente que comprende:

- (a) poner en contacto un tumor y/o tejido próximo al tumor extraído de un paciente, con un anticuerpo anti-hedgehog según se define en las reivindicaciones,
- (b) detectar la presencia de la expresión hedgehog,
- (c) comparar la expresión hedgehog con la normal o con un tejido del mismo tipo u origen que no esté asociado al tumor, y si dicha hedgehog está sobreexpresada;
- (d) tratar al paciente con un antagonista hedgehog.

En un aspecto específico, el tejido se extrae del hospedador antes de la determinación. En otro aspecto específico, la muestra de tejido está FFPE antes de entrar en contacto con el anticuerpo anti-Hh. En otro aspecto específico más, el método de determinación se selecciona entre el grupo que consiste en: una IHC y una inmunotransferencia Western. En un aspecto específico adicional, la sensibilidad de unión es mayor que la del anticuerpo anti-Hh H160. En un aspecto específico adicional, el anticuerpo anti-Hh no compite con ptch por la unión al Shh. En un aspecto específico adicional, el anticuerpo anti-Hh se selecciona entre el grupo que consiste en 95,3, 95,7 y 95,9.

En una forma de realización adicional, la invención se refiere a un método para el cribado de pacientes con un crecimiento tisular anormal para comprobar el riesgo de desarrollar un cáncer, que comprende determinar si dicho tejido sobreexpresa la señalización hedgehog con un anticuerpo hedgehog según se define en las reivindicaciones, que comprende poner en contacto dicho tejido con dicho anticuerpo anti-hedgehog y medir el grado de unión. En un aspecto específico, el tejido es un tumor o un cáncer. En otro aspecto específico más, el tejido se extrae del hospedador antes de la determinación. En un aspecto específico adicional, la muestra de tejido está FFPE antes de entrar en contacto con el anticuerpo anti-Hh. En un aspecto específico, la sensibilidad de unión es mayor que la del anticuerpo anti-Hh H160. En un aspecto específico adicional, el anticuerpo anti-Hh no compite con ptch por la unión al Shh. En un aspecto específico adicional, el anticuerpo anti-Hh se selecciona entre el grupo que consiste en 95,3,

95,7 y 95,9. En un aspecto específico adicional, el método de determinación se selecciona entre el grupo que consiste en una IHC y una inmunotransferencia Western.

En una forma de realización adicional, la invención se refiere a un método para el tratamiento del cáncer que comprende (a) poner en contacto un tejido sospechoso de ser canceroso o un tejido próximo a dicho tejido, con un anticuerpo anti-hedgehog, en el que dicho anticuerpo anti-hedgehog se une a un polipéptido hedgehog en un epítipo dentro de la región de los residuos de aminoácidos 70 - 96; (b) determinar si está sobreexpresada la hedgehog; y (c) tratar con un antagonista hedgehog. En otro aspecto específico más, el tejido se extrae del hospedador antes de la determinación. En un aspecto específico adicional, la muestra de tejido está FFPE antes de entrar en contacto con el anticuerpo anti-Hh. En un aspecto específico, el método de determinación se selecciona entre el grupo que consiste en una IHC y una inmunotransferencia Western. En un aspecto específico, la sensibilidad de unión del anticuerpo anti-hedgehog es mayor que la del anticuerpo anti-Hh H160. En un aspecto específico adicional, el anticuerpo anti-Hh no compite con ptch por la unión al Shh. En un aspecto específico adicional, el anticuerpo anti-Hh se selecciona entre el grupo que consiste en 95,3, 95,7 y 95,9.

Descripción de las figuras

Las Figuras 1 A - F son micrografías que muestran que la unión del anticuerpo policlonal parental anti-Shh ("59 pAb") y de su derivado monoclonal rMab reconoce específicamente las células transfectadas COS con Shh mediante inmunofluorescencia (IF). Las células Cos-7 con o sin Shh humano transfectadas de forma estable se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con anticuerpos de conejo, se detectaron con conjugado de Cy3 anti-humano y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. 59 policlonales A + B en células Shh-COS (A) o no transfectadas (B); C) H-160 en células Shh-COS; D) rMab irrelevante en células Shh-COS; rMab 95,9 purificado en células Shh-COS (E) y no transfectadas (F). La barra de escala es de 30 μ m.

Las Figuras 2 A - F son micrografías que demuestran que el anticuerpo policlonal anti-Shh ("59 pAb") y su derivado rMab reconocen específicamente las células Shh-293 transfectadas mediante una IHC. Las secciones FFPE de los sedimentos de células 293 no transfectadas (B, F) o de Shh humanas transfectadas temporalmente (A, C, E) fueron procesadas para la recuperación de TARGET y teñidas con los anticuerpos de conejo indicados, seguido de HRP-anticonejo y detectadas con ABC-peroxidasa Elite. A) anticuerpo de conejo irrelevante (R&D Systems) en células Shh-293; B) H-160 (Santa Cruz) en células Shh-293; en células Shh-293; policlonal 59 A + B purificado por afinidad en Shh-293 (C) o no transfectadas (D) rMab 95,9 purificado en células Shh 293 (E) y no transfectadas (F). Las muestras A, B y D se sometieron a una amplificación con TSA-HRP, dando como resultado una cierta tinción de fondo, por lo que esta etapa fue omitida del resto de las muestras. La barra de escala es de 50 μ m.

Figura 3: Panel A, A - L son micrografías que muestran que todos los anticuerpos monoclonales 95,9, 95,7 y 95,3 también presentaban reacción cruzada con Ihh y Dhh. Las células COS transfectadas con Shh humano completo (fila superior), Ihh (fila intermedia) y Dhh (fila inferior) fueron procesadas por inmunofluorescencia como en la Figura 1, mediante el uso de afinidad se purificaron los anticuerpos 95,3 (1 - 3) 95,7 (4 - 6), 95,9 (7 - 9) o H - 160 (10 - 12). Barra de escala = 30 μ m. **Panel B**, inmunotransferencia Western de células 293 no transfectadas (WT) o transfectadas con proteínas completas humanas Dhh, Ihh o Shh según se indica, e inmunomarcadas con 5 mg/ml de rMab 95,9 purificado (porción superior del panel) o de H-160 (porción inferior del panel). Ambos anticuerpos reconocen las tres proteínas completas (FL) Hh ($\ll$ 50 kDa), así como los terminales Hh-N secretados ($\ll$ 22 kDa), aunque 95,9 no reconoció la « banda de fondo de 98 kDa que marcaba H-160 en las células no transfectadas. Los marcadores de los pesos moleculares en kDa se muestran a la izquierda.

Las Figuras 4 A - B muestran las secuencias N-terminales de 95,9, de 95,7 y de 95,3. Esto sugiere fuertemente que probablemente son subclones idénticos. A) Las secuencias N-terminales de las cadenas ligeras de los tres subclones supuestamente idénticos de 95 son de hecho idénticas en las posiciones en las que la secuencia era inequívoca. Los residuos de aminoácidos entre paréntesis indican aminoácidos ambiguos, los guiones indican las posiciones para las que no era determinable una secuencia de aminoácidos, las letras en cursiva indican discrepancias entre la secuencia N-terminal obtenida y la secuencia real clonada de 95,9 determinada mediante la secuenciación del ADN y una traducción conceptual (2ª fila). Los números de posición de los aminoácidos (numerados con la secuencia de señalización ausente partiendo en 1) están indicados en la fila superior de la tabla. B) Las secuencias N-terminales de las cadenas pesadas del subclon 95 estaban complicadas por la presencia de la cadena pesada de la célula de mieloma endógena, por lo que se muestran dos secuencias (parcialmente mezcladas) para cada subclon. La presencia de glutamina en la posición 20 ha sido inferida.

La Figura 5 muestra que el epítipo 95,9 cartografía para los aminoácidos 76 - 90 de la sonic hedgehog humana (ID. SEC. N°: 16). El 95,9, acoplado a microesferas de agarosa, se incubó con Shh recombinante y después se sometió a una digestión con tripsina. El péptido fue protegido de la tripsina por la unión del 95,9 eluido, identificado mediante una espectrometría de masas y confirmado mediante la secuenciación de los aminoácidos como los aminoácidos 76 - 90, una región de Shh que es idéntica a la de Ihh (ID. SEC. N°: 17) y que contiene 3 residuos de aminoácidos diferentes a la de Dhh (ID. SEC. N°: 18) (la región en la caja en la alineación de los ligandos 3 Hh-N-terminales, numerados con el primer residuo de aminoácido de la secuencia de señalización (no mostrado) indicado como 1.

Las Figuras 6 A - F son micrografías que muestran, mediante una tinción de IHC, que 95,9 reconoce la Hh endógena en las regiones esperadas de los embriones de ratón en desarrollo. A) el 95,9 tiñe la Hh en la placa basal del tubo neural ventral (FP) y la notocorda (NC) de una sección transversal de un embrión de ratón E10,5

mucho más fuertemente que el anticuerpo H-160 en las mismas condiciones (ambos sin una amplificación con TSA) (B). C) sección sagital de E11,5 de la placa basal del tubo neural (FP) y la notocorda (NC) teñidas por 95,9. D) El embrión E11,5 muestra un posible gradiente de difusión de Hh desde la placa basal ventral a lo largo del tubo neural (flechas). E) El 95,9 tiñe el neuroepitelio del cerebro en desarrollo de un ratón E11,5 mostrado con un aumento menor. TV, vesícula telecefálica; 4º ventrículo. F) Sección transversal de E11,5 a través del intestino medio en desarrollo, mostrando la esperada expresión en las células epiteliales que rodean a la luz (flecha) y la ausencia de señal en el mesénquima circundante.

Las Figuras 7 A - E muestran que la tinción de IHC por el Ab 95,9 anti-Hh se correlaciona bien con los niveles del transcrito de Shh. Se sometieron 36 líneas celulares de cáncer de colon humano a un análisis mediante una Q-PCR del ARNm de Shh e IHC (FFPE) mediante el uso del rMab 95,9 anti-Hh purificado en paralelo. El panel superior muestra las imágenes de los sedimentos celulares representativos que entran en cada una de las cuatro categorías de puntuación de la IHC como sigue: A) línea celular negativa para Hh, puntuación de IHC de 0+, aunque se aprecia una cierta tinción nuclear no específica; B) puntuación de IHC de 1+ (tinción débil), C) células que ilustran una puntuación de IHC de 2+ (tinción moderada), D) células que muestran una tinción fuerte (puntuación de IHC de 3+). La barra de escala es de 50 µm. La Figura 6 E muestra que los niveles relativos del ARNm de Shh (valores de Delta Ct del análisis mediante Q-PCR) en cada grupo de puntuación de la IHC, ilustran la tendencia hacia una tinción más fuerte de 95,9 con unos menores valores de Ct (mayores niveles de ARNm). El coeficiente de Spearman de esta correlación es de -0,160, que es estadísticamente significativo ($p = 0,0001$).

Las Figuras 8 A - D muestran que 95,9 tiñe muestras de cáncer de ovario Shh+, pero no Shh-. La hibridación *in situ* de muestras de cáncer de ovario humano con una sonda antisentido contra Shh muestra que una muestra expresa el ARNm de Shh (puntos negros) en el epitelio tumoral de A) y la otra B) no muestra ninguna señal más que el fondo de la sonda sentido (no mostrado). La tinción de 95,9 de los mismos tumores muestra una señal positiva citoplásmica y membranosa (marrón) únicamente en el epitelio tumoral Shh+ de C), y no en la muestra negativa para Shh D). La barra de escala es de 25 µm.

Las Figuras 9 A - B muestran que la tinción de IHC del tumor TMA por el Ab 95,9 anti-Hh detecta diferentes niveles de expresión de Hh en tumores de colon, de ovario y de páncreas, respectivamente. Más del 80 % de los CRC, OvCa y PancCa expresan ligandos de Hh. A) Se muestran imágenes representativas negativas para Hh negativa (0+), baja (1+), media (2+) y alta (3+) para tumores de colon (fila superior), de ovario (fila intermedia) y de páncreas (fila inferior) procedentes de matrices de muestras normales y tumorales teñidas con el anticuerpo 95,9. B) Se indica el número total de muestras teñidas (n) para cada tipo de tumor, y el número y los porcentajes de todos los analizados están indicados para la tinción de 95,9 que entran en cada categoría de nivel de expresión.

Las Figuras 10 A - F muestran mediante una tinción de IHC que el Ab 95,9 anti-Hh es lo suficientemente sensible como para detectar unos bajos niveles de Hh en los folículos pilosos. A) La piel de ratones C57BL/6 de 4 semanas de edad marcada por 95,9 revela la señal de Shh en los folículos pilosos a las 4 semanas de edad cuando el pelo está en fase anágena. B) Hibridación *in situ* de una sección longitudinal de piel fetal humana (cuero cabelludo) mediante el uso de una sonda antisentido Shh, que muestra señal en la vaina externa de la raíz. Sección transversal del cuero cabelludo fetal humano teñida con 95,9 (C) o con H160 (D). Secciones longitudinales de cuero cabelludo humano fetal teñidas con 95,9 (E) o con H160 (F), que muestran tinción en el epitelio proximal por encima de la papila dérmica, coherente con la señal de ISH de (B). La barra de escala es de 50 µm en C, D, y de 25 µm en todos los demás paneles.

Las Figuras 11 A - B muestran las secuencias de aminoácidos de 95,9. Los ADN clonados que codifican para la región madura de la cadena pesada (A) (ID. SEC. Nº: 19) o de la cadena ligera (B) (ID. SEC. Nº: 20) de 95,9 (incluyendo el dominio Fc) fueron condensados en marco con una secuencia de señalización genérica de un anticuerpo (enmarcados) y traducidos.

La Figura 12 muestra la inmunohistoquímica mediante el uso del mAb 95,5 y del mAb H-160 en tejido ovárico normal (ISH-) y de cáncer de ovario (ISH+).

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

"FFPE" significa incluido en parafina y fijado con formalina, tejido resultante de una disección o de una biopsia, que a continuación se fija con objeto de impedir su degradación y para permitir estudios histológicos, patológicos o citológicos. Este tejido fijado se incluye a continuación en la cera para cortarlo en secciones finas y después, para teñirlo con una tinción de Hematoxilina y Eosina, tras lo cual se lleva a cabo una microtomía cortándolo en secciones finas. La fijación es el proceso mediante el cual el tejido es inmovilizado, inactivado y conservado para un estudio adicional. La fijación hace al tejido permeable frente a los reactivos de tinción y reticula sus macromoléculas, de forma que son estabilizadas y bloqueadas en posición. Con este fin puede usarse cualquier fijador adecuado, e incluyen, por ejemplo, una solución de bouina, formalina o nitrógeno líquido.

Un "cáncer sensible a hedgehog" es un cáncer o un tumor que está mediado por, o asociado con, una señalización por hedgehog, de forma que la presencia de hedgehog (es decir, sonic hedgehog, indian hedgehog y/o desert hedgehog) es necesaria o esencial para la supervivencia y/o la progresión del cáncer o del tumor. Dicha hedgehog puede ser autocrina (es decir, producida por el propio tumor) o paracrina, en la que la hedgehog es producida por los

tejidos en las proximidades del tumor o del cáncer. En un aspecto específico, un "cáncer sensible a hedgehog" es aquel que se trata tras la aplicación de un antagonista hedgehog.

La "sobreexpresión" de hedgehog en un tejido o en un tumor en particular se refiere a un hedgehog, tal como un polipéptido y/o un ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido, que es expresado a un nivel mayor del que está presente en un tejido no enfermo del mismo tipo u origen tisular, o que está en la proximidad de un tumor o de un cáncer que es un cáncer sensible a hedgehog, y que está expresando hedgehog a un nivel mayor en comparación con el que se expresa cuando no está presente un cáncer sensible a hedgehog, tal como en un estado sano o no patológico. Dicha sobreexpresión puede estar causada por una amplificación génica o por un aumento en la transcripción o en la traducción. La sobreexpresión de hedgehog puede ser determinada en un ensayo diagnóstico o pronóstico mediante la evaluación de los niveles aumentados de la proteína hedgehog presente en la superficie de una célula o secretada por la célula (por ejemplo, a través de un ensayo de inmunohistoquímica mediante el uso de los anticuerpos anti-hedgehog de la invención. Alternativamente, o adicionalmente, se pueden medir los niveles del ácido nucleico o del ARNm que codifica para el polipéptido hedgehog en la célula, por ejemplo, a través de técnicas de hibridación *in situ* fluorescente mediante el uso de una sonda basada en el ácido nucleico correspondiente al ácido nucleico que codifica para el hedgehog o el complementario del mismo; (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), de una inmunotransferencia Southern, de una inmunotransferencia Northern o de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como una PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión del polipéptido hedgehog mediante la medición del antígeno desprendido en un fluido biológico tal como suero, por ejemplo, mediante el uso de ensayos basados en anticuerpos (véase también, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 4.933.294 concedida el 12 de junio de 1990; el documento WO91/05264 publicado el 18 de abril de 1991; la Patente de EE.UU. 5.401.638 concedida el 28 de marzo de 1995; y Sias *et al.*, J. Immunol. Methods 132: 73 - 80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores hay disponibles diversos ensayos *in vivo* para el artesano experto. Por ejemplo, se pueden exponer las células dentro del cuerpo de un paciente a un anticuerpo que opcionalmente está marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radioactivo, y puede evaluarse la unión del anticuerpo a las células del paciente, por ejemplo, mediante un escaneado externo de la radioactividad o mediante el análisis de una biopsia tomada a partir del paciente previamente expuesto al anticuerpo.

Un "antagonista hedgehog" es un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno del mismo, otra molécula biológica o una molécula pequeña, que antagoniza o bloquea la señalización hedgehog, ya sea mediante su unión directa a un componente de la ruta de señalización hedgehog y bloqueando así la transcripción de señales a través de dicho componente un componente, o bien impidiendo la unión de un componente de la ruta de señalización hedgehog a su compañero de unión natural, de forma que se impida la transcripción de una señal hedgehog.

Los términos "ruta de señalización hedgehog", "ruta hedgehog" y "ruta de transducción de señales hedgehog", según se usan en el presente documento, de forma intercambiable, se refieren a la cascada de señalización mediada por hedgehog y sus receptores (por ejemplo, *patched*, *patched-2*) y que da como resultado cambios en la expresión génica y otros cambios fenotípicos típicos de la actividad hedgehog. La ruta hedgehog puede ser activada en ausencia de hedgehog a través de la activación de un componente cascada abajo (por ejemplo, la sobreexpresión de *Smoothed* o transfecciones con mutantes *Smoothed* o *Patched*, para dar como resultado la activación constitutiva con una señalización hedgehog activada en ausencia de hedgehog). A menudo se usan factores de transcripción de la familia *Gli* como marcadores o indicadores de la activación de la ruta hedgehog.

El término "componente de señalización Hh" se refiere a los productos génicos que participan en la ruta de señalización Hh. Un componente de señalización Hh afecta frecuentemente considerablemente o sustancialmente a la transmisión de la señal Hh en células o en tejidos, afectando así a los niveles de expresión génica cascada abajo y/o a otros cambios fenotípicos asociados con la activación de la ruta hedgehog.

Cada componente de señalización Hh, dependiendo de su función y de los efectos biológicos sobre el resultado final de la activación o de la expresión génica cascada abajo, puede ser clasificado como regulador positivo o negativo. Un regulador positivo es un componente de señalización Hh que afecta positivamente a la transmisión de la señal Hh, es decir, que estimula acontecimientos biológicos cascada abajo cuando Hh está presente. Un regulador negativo es un componente de señalización Hh que afecta negativamente a la transmisión de la señal, es decir, que inhibe los acontecimientos biológicos cascada abajo cuando Hh está presente.

La unión de *Hh* a *Ptch* libera *Smoothed* (Smo), una proteína acoplada a G de 7 transmembranales, para activar después una intrincada ruta intracelular de transducción de señales. La activación de Smo conduce entonces a una señalización a través de un complejo multimolecular que incluye Costal2 (Cos2), Fused (Fu) y el supresor de Fused (Su(Fu)), dando como resultado el transporte nuclear del factor de transcripción Gli. Ho *et al.*, Curr. Opin. Neurobiol. 12: 57 - 63 (2002); Nybakken *et al.*, Curr. Opin. Genet. Dev. 12: 503 - 511 (2002); y Altaba *et al.*, Nat. Rev. Neurosci. 3: 24 - 33 (2002). Existen tres factores de transcripción Gli conocidos en vertebrados: Gli1, Gli2 y Gli3. Mientras que *Gli1* es un factor activador de la transcripción que es inducido universalmente en células sensibles a Hh, Gli2 y Gli3 pueden actuar como activadores o como represores de la transcripción dependiendo del contexto celular. Estando ausente la señalización *Hh*, el *Gli3* es procesado en un represor de la transcripción nuclear más pequeño que carece del dominio carboxi-terminal del *Gli3* completo. Tras la activación de *Smo*, se impide la escisión de la proteína *Gli3*, y

se genera la forma completa con función de activación de la transcripción. La *Gli2* también codifica para una función represora en su forma truncada carboxi-terminalmente, pero esta formación parece no estar regulada por la señalización *Hh*. Stecca *et al.*, J. Biol. 1 (2): 9 (2002).

5 Definiciones comunes:

El término "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador en particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder de secreción está unido operativamente al ADN para un polipéptido si está expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está ubicado de forma que facilite la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se van a unir son contiguas, y en el caso de un líder de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se consigue mediante una ligación en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen se usan adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica habitual.

El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o totalmente la actividad biológica de una señalización hedgehog o del componente de una ruta de señalización hedgehog. Algunas moléculas antagonistas hedgehog adecuadas incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos agonistas o antagonistas, fragmentos o variantes de la secuencia de aminoácidos de polipéptidos hedgehog nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, pequeñas moléculas orgánicas, etc. Algunos métodos para la identificación de los antagonistas hedgehog pueden comprender poner en contacto una célula en la que la señalización hedgehog está activa con una molécula antagonista candidato y la medición de un cambio detectable en una o más de las actividades biológicas relacionadas normalmente con la señalización hedgehog (por ejemplo, la expresión del *Gli* nuclear).

"Tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refiere tanto al tratamiento terapéutico o profiláctico como a las medidas preventivas, en las que el objeto es evitar o ralentizar (reducir) la afección o el trastorno patológico objetivo. Un sujeto o un mamífero es "tratado" con éxito de un cáncer sensible a hedgehog si, después de recibir una cantidad terapéutica de un antagonista hedgehog, el paciente muestra una reducción observable y/o medible en, o una ausencia de, uno o más de los siguientes: reducción en el número de células cancerosas o ausencia de células cancerosas; reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentización hasta cierto punto y preferentemente detención) de la infiltración de las células del cáncer en los órganos periféricos, incluyendo la diseminación del cáncer en los tejidos blandos y el hueso; inhibición (es decir, ralentización hasta cierto punto y preferentemente detención) de la metástasis del tumor; inhibición, hasta cierto punto, del crecimiento del tumor; y/o alivio hasta cierto punto de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; reducción en la morbilidad y en la mortalidad y mejora en los aspectos de la calidad de vida. La reducción de estos signos o síntomas también puede ser percibida por el paciente.

Los parámetros anteriores para la evaluación del éxito del tratamiento y de la mejora en la enfermedad son fácilmente medibles mediante procedimientos rutinarios familiares para el médico. En el tratamiento del cáncer, la eficacia puede medirse, por ejemplo, mediante la evaluación del tiempo de progresión de la enfermedad (TTP) y/o mediante la determinación del índice de respuesta (RR). Las metástasis pueden ser determinadas mediante pruebas de estadificación y mediante escáneres y ensayos óseos para comprobar los niveles de calcio y de otras enzimas para determinar la diseminación en el hueso. También pueden llevarse a cabo escáneres de CT para buscar diseminación en la pelvis y en los nódulos linfáticos del área. Las radiografías de tórax y la medición de los niveles de las enzimas hepáticas mediante los métodos conocidos se usan para buscar metástasis en los pulmones y en el hígado, respectivamente. Otros métodos rutinarios para la monitorización de la enfermedad incluyen la ultrasonografía transrectal (TRUS) y la biopsia por punción transrectal (TRNB).

Administración "crónica" se refiere a la administración del (los) agente(s) de una forma continua por oposición a una forma aguda, de forma que se mantenga el efecto terapéutico (actividad) inicial durante un periodo prolongado de tiempo. La administración "intermitente" es un tratamiento que no se realiza de forma continua sin interrupciones, sino que más bien es de naturaleza cíclica.

"Mamífero", para los fines del tratamiento o, el alivio de los síntomas o el diagnóstico de un cáncer, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja y de zoo, deportivos o mascotas, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluyen la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

Una "cantidad eficaz" de un antagonista hedgehog del mismo según se divulga en el presente documento es una cantidad suficiente para llevar a cabo un fin específicamente establecido. Una "cantidad eficaz" puede ser determinada empíricamente y de una forma rutinaria, en relación con el fin establecido.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un antagonista hedgehog eficaz para "tratar" una enfermedad o un trastorno en un sujeto o en un mamífero. En el caso del cáncer, especialmente de un cáncer sensible a hedgehog, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de las células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis del tumor; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento del tumor; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Véase la definición del presente documento de "tratar". Hasta el grado en que el fármaco puede impedir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico.

El término "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones que habitualmente se incluyen en los envases comerciales de los productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosis, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos

Definiciones de anticuerpos:

El término "*anticuerpo*" incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos completos que tienen una región Fc de una inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con una especificidad poliepitópica, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y moléculas de cadena única, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, y Fv). El término "*inmunoglobulina*" (Ig) se usa de forma intercambiable con "*anticuerpo*" en el presente documento.

La unidad básica de un anticuerpo de 4 cadenas es una glucoproteína heterotetramérica formada por dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades básicas heterotetraméricas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y que contiene 10 sitios de unión al antígeno, mientras que los anticuerpos IgA comprenden entre 2 - 5 de las unidades básicas de 4 cadenas que pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes junto con la cadena J. En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L está unida a una cadena H mediante un puente de disulfuro covalente, mientras que dos cadenas H están unidas entre sí mediante uno o más puentes de disulfuro, dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes de disulfuro intracatenarios separados regularmente. Cada cadena H tiene en el N-terminal un dominio variable (V_H), seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ, y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ε. Cada cadena L tiene en el N-terminal un dominio variable (V_L), seguido de un dominio constante en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se cree que unos residuos de aminoácidos en particular forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. El apareamiento de un V_H y de un V_L forma conjuntamente un único sitio de unión al antígeno. Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8ª Edición, Daniel P. Sties, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede ser asignada a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, denominándose sus cadenas pesadas α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases sobre la base de diferencias relativamente menores en la secuencia y en la función de la CH, por ejemplo, las humanas expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

Un anticuerpo "*aislado*" es aquel que ha sido identificado, separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno de producción (por ejemplo, natural o recombinantemente). Preferentemente, el polipéptido aislado está libre de asociación con todos los demás componentes de su entorno de producción. Los componentes contaminantes de su entorno de producción, tales como los resultantes de células transfectadas recombinantes, son materiales que normalmente interferirían con los usos de investigación, diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En las formas de realización preferidas, el polipéptido está purificado: (1) hasta más del 95 % en peso del anticuerpo determinado mediante, por ejemplo, el método de Lowry, y en algunas formas de realización, hasta más del 99 % en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de vaso rotatorio, o (3) para homogeneizar mediante una SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras mediante el uso de azul de Coomassie o, preferentemente, una tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in*

situ dentro de las células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, habitualmente, un polipéptido o un anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

- 5 La "región variable" o el "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino-terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera pueden denominarse "VH" y "VL", respectivamente. Estos dominios son generalmente las partes más variables del anticuerpo (con respecto a otros anticuerpos de la misma clase) y contienen los sitios de unión al antígeno.
- 10 El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en su secuencia entre los anticuerpos. El dominio V media en la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo en particular por su antígeno en particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo de la totalidad de la envergadura de los dominios variables. Más bien, se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR) en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones en marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración en lámina beta, conectadas por tres HVR, que forman bucles conectores, y en algunos casos forman parte de la estructura en lámina beta. Las HVR de cada cadena se mantienen juntas en una cercanía estrecha mediante las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.
- 25 El término "anticuerpo monoclonal", según se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales y/o modificaciones post-traduccionales (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pudieran estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Al contrario que las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque son sintetizados mediante el cultivo de un hibridoma, no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo, por ser obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que se requiera la producción del anticuerpo mediante cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención pueden ser elaborados mediante diversas técnicas que incluyen, por ejemplo, el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein., *Nature*, 256: 495 - 97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253 - 260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 - 681 (Elsevier, N. Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 4.816,567), tecnologías de expresión en fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624 - 628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581 - 597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338 (2): 299 - 310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340 (5): 1073 - 1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 101 (34): 12467 - 12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284 (1 - 2): 119 - 132 (2004), y tecnologías para la producción de anticuerpos humanos o humanizados en animales que tienen parte o todos los *loci* o los genes de la inmunoglobulina humana que codifica para las secuencias de la inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento WO 1998/24893; el documento WO 1996/34096; el documento WO 1996/33735; el documento WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255 - 258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7: 33 (1993); las Patentes de EE.UU. N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779 - 783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856 - 859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812 - 813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845 - 851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65 - 93 (1995).
- 55 Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo, preferentemente la unión al antígeno y/o la región variable del anticuerpo intacto. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; anticuerpos lineales (véase la Patente de EE.UU. 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8 (10): 1057 - 1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena única y anticuerpos multispecíficos anticuerpos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.
- 60 La digestión con papaína de los anticuerpos produjo dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, denominados fragmentos "Fab", y un fragmento residual "Fc", una denominación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena completa L junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión al antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión al antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento grande F(ab')₂ que se corresponde aproximadamente con dos fragmentos Fab unidos
- 65

por disulfuro que tienen una diferente actividad de unión al antígeno y que aún son capaces de reticular el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener unos pocos residuos adicionales en el carboxi terminal del dominio C_H1, incluyendo una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación del presente documento para un Fab' en el que el (los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxi-terminales de ambas cadenas H que se mantienen juntas mediante disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos están determinadas por las secuencias de la región Fc, región que también es reconocida por los receptores Fc (FcR) encontrados en ciertos tipos de células.

"Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y de unión al antígeno. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de la región variable de la cadena pesada y ligera en estrecha asociación no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles de cada cadena H y L) que contribuyen a los residuos de aminoácidos para la unión al antígeno y para conferir especificidad de antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende únicamente tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y de unirse a un antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

Los "Fv de cadena única", también abreviados como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpos V_H y V_L conectados en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende adicionalmente un polipéptido conector entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de los sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269 - 315 (1994).

El término "región hipervariable", "HVR" o "HV," cuando se usa en el presente documento se refiere a las regiones de un dominio variable de un anticuerpo que son hipervariables en su secuencia y/o que forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la V_H (H1, H2, H3) y tres en la V_L (L1, L2, L3). En los anticuerpos naturales, H3 y L3 muestran la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3 en particular juega un papel único confiriendo una especificidad fina a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu *et al.* *Immunity* 13: 37 - 45 (2000); Johnson y Wu en *Methods in Molecular Biology* 248: 1 - 25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)). De hecho, los anticuerpos naturales de camélidos que consisten en una cadena pesada únicamente son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véase, por ejemplo, Hamers - Casterman *et al.*, *Nature* 363: 446 - 448 (1993) y Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3: 733 - 736 (1996).

Varias delineaciones de las HVR están en uso y englobadas en el presente documento. Las HVR, que son regiones determinantes de la complementariedad de Kabat (CDR), se basan en la variabilidad de la secuencia y son las que se usan más habitualmente (Kabat *et al.*, *supra*). Chotia se refiere más bien a la ubicación de los bucles estructurales (Chotia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196: 901 - 917 (1987)). Las HVR de los AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chotia, y son usadas por el programa informático de modelado de anticuerpos AbM Oxford Molecular. Las HVR "de contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chotia	Contacto
L1	L24 - L34	L24 - L34	L26 - L32	L30 - L36
L2	L50 - L56	L50 - L56	L50 - L52	L46 - L55
L3	L89 - L97	L89 - L97	L91 - L96	L89 - L96
H1	H31 - H35B	H26 - H35B	H26 - H32	H30 - H35B (numeración de Kabat)
H1	H31 - H35	H26 - H35	H26 - H32	H30 - H35 (numeración de Chotia)
H2	H50 - H65	H50 - H58	H53 - H55	H47 - H58
H3	H95 - H102	H95 - H102	H96 - H101	H93 - H101

Las HVR pueden comprender "HVR ampliadas" como sigue: 24 - 36 o 24 - 34 (L1), 46 - 56 o 50 - 56 (L2), y 89 - 97 o 89 - 96 (L3) en la V_L, y 26 - 35 (H1), 50 - 65 o 49 - 65 (una forma de realización preferida) (H2), y 93 - 102, 94 - 102 o 95 - 102 (H3) en la V_H. Los residuos del dominio variable están numerados de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*, para cada una de estas definiciones de HVR ampliadas.

Los residuos "estructurales" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable y distintos a los residuos HVR según se han definido en el presente documento.

La expresión "numeración de los residuos del dominio variable como en Kabat" o "numeración de la posición de los

aminoácidos como en Kabat" y variaciones de las mismas, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de la cadena pesada o los dominios variables de la cadena ligera de la recopilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, *supra*. Mediante el uso de este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal o real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o a una inserción en, un FR o una HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de una cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácido (el residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2, y residuos insertados (por ejemplo, los residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos puede ser determinada para un anticuerpo dado mediante una alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar".

Una "estructura aceptora humana" para los fines del presente documento es una estructura que comprende la secuencia de aminoácidos de una estructura de una VL o una VH derivada de una estructura de una inmunoglobulina humana o de una estructura consenso humana. Una estructura humana aceptora "derivada de" una estructura de una inmunoglobulina humana o de una estructura consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios preexistentes en la secuencia de aminoácidos. En algunas formas de realización, el número de cambios preexistentes de aminoácidos es de 10 o menos, de 9 o menos, de 8 o menos, de 7 o menos, de 6 o menos, de 5 o menos, de 4 o menos, de 3 o menos o de 2 o menos.

Alternativamente, las definiciones de estructura y de HVR del anticuerpo anti-Hh de las invenciones pueden definirse como sigue: (a) la cadena pesada puede comprender:

HCFR1-HCHVR1-HCFR2-HCHVR2-HCFR3-HCHVR3-HCFR4-CR; en la que

HCFR1 = QSVKESGGGLVQPEGSLTLTCTVS (ID. SEC. Nº: 1),

HCHVR1 = GFSLSYDMS (ID. SEC. Nº: 2),

HCFR2 = WVRQAPGSGLEWI (ID. SEC. Nº: 3),

HCHVR2 = GGILSGGSAYYASWAKS (ID. SEC. Nº: 4),

HCFR3 = RSTITKNTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFC (ID. SEC. Nº: 5),

HCHVR3 = ARGIPVGTNYNI (ID. SEC. Nº: 6),

HCFR4 = WGPGLTVTVSSG (ID. SEC. Nº: 7),

CR = QPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTVNSGTLTNGVRTFSPV

RQSSGLYSLSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLG

GPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPPLR

EQQFNSTIRVVSITLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAIEKTISKARGQPLEPKV

YTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTPAVLDSGDS

YFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (ID. SEC. Nº: 8).

(b) la cadena ligera puede comprender:

LCFR1-LCCDR1-LCFR2-LCCDR2-LCFR3-LCCDR3-LCFR4; en la que

LCFR1 = DIAVLTQTPSPVSAAVGGTVTINC (ID. SEC. Nº: 9),

LCHVR1 = QSSPSVYSNYLA (ID. SEC. Nº: 10),

LCFR2 = WYQKPGQPPKLLI (ID. SEC. Nº: 11),

LCHVR2 = YYASTLAS (ID. SEC. Nº: 12),

LCFR3 = GVPSRFKSGSGTEFTLTISDLECAATYYC (ID. SEC. Nº: 13),

LCHVR3 = AGGYIDTSDTA (ID. SEC. Nº: 14),

LCFR4 = FGGGTEVVVKGDPVAPTFLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDG

TTQTGTIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFN RGDC (ID. SEC. Nº: 15).

Una "modificación de aminoácido" en una posición especificada, por ejemplo, de la región Fc, se refiere a la sustitución o la delección del residuo especificado, o la de al menos un residuo de aminoácido adyacente al residuo especificado. Una inserción "adyacente" a un residuo especificado significa una inserción en uno o dos residuos del mismo. La inserción puede ser N-terminal o C-terminal al residuo especificado. La modificación preferida de aminoácidos en el presente documento es una sustitución.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es aquel con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esa(s) alteración(es). En una forma de realización, un anticuerpo madurado por afinidad tiene unas afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno objetivo. Los anticuerpos madurados por afinidad son producidos mediante procedimientos conocidos en la materia. Por ejemplo, Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779 - 783 (1992) describen la maduración por afinidad mediante transposiciones de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los residuos HVR y/o estructurales es descrita, por ejemplo, por: Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 91: 3809 - 3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169: 147 - 155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155: 1994 - 2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7): 3310 - 9 (1995); y Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226: 889 - 896 (1992).

Un anticuerpo que "se une específicamente a" o que es "específico para" un polipéptido o un epítipo en particular de un polipéptido en particular es aquel que se une a ese polipéptido o epítipo en particular en un polipéptido en particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo de polipéptido. Por ejemplo, los anticuerpos

anti-Hh de la presente invención se unen específicamente a Hh (por ejemplo, sonic hedgehog humano (shh), indian hedgehog humano (ihh) o desert hedgehog humano (dhh) y no a ningún otro polipéptido.

Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce una actividad biológica del antígeno al que se une. En algunas formas de realización, los anticuerpos bloqueantes o los anticuerpos antagonistas inhiben sustancialmente o completamente la actividad biológica del antígeno. Los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención no son bloqueantes en el sentido de que una vez unidos al hedgehog, no impiden la unión del hedgehog así unido a patched.

El término "*fase sólida*" describe una matriz no acuosa a la que puede adherirse el anticuerpo de la presente invención. Algunos ejemplos de fases sólidas englobadas en el presente documento incluyen aquellas formadas parcialmente o completamente por vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas formas de realización, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otros es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de una cromatografía por afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas individuales, tales como las descritas en la Patente de EE.UU. N° 4.275.149.

El término "*región Fc*" en el presente documento se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de una inmunoglobulina, que incluye las regiones Fc de la secuencia natural y regiones Fc variantes. Algunas regiones Fc de la secuencia natural adecuadas para su uso en los anticuerpos de la invención incluyen la IgG 1, la IgG2, la IgG3 y la IgG4 humanas.

II. Métodos antagonistas de hedgehog

Debido a que la expresión hedgehog se ha asociado con múltiples afecciones fisiológicas y estados patológicos, incluyendo cánceres que serían sensibles a los antagonistas hedgehog, los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención son útiles para la detección de dichos acontecimientos y estados patológicos, así como para la identificación de dichos cánceres sensibles.

A. Angiogénesis

Dado que se sabe que hedgehog estimula la angiogénesis, se espera que los antagonistas hedgehog, que inhiben la actividad hedgehog, podría esperarse que inhibieran la angiogénesis, particularmente cuando un cierto nivel de señalización hedgehog es un prerrequisito necesario para la angiogénesis. Los anticuerpos anti-hedgehog de la invención pueden usarse para identificar específicamente tejidos o estados en los que se asocia la expresión hedgehog con la angiogénesis. La angiogénesis es fundamental en muchos trastornos. Se produce una angiogénesis persistente no regulada en diversos estados patológicos, metástasis tumorales y crecimientos anormales de las células endoteliales. La vasculatura creada como resultado de los procesos angiogénicos explica el daño patológico observado en estas enfermedades.

Algunas enfermedades asociadas con, o resultantes de, una angiogénesis incluyen: crecimiento tumoral, metástasis tumoral o crecimientos anormales de células endoteliales, incluyendo enfermedad neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, rechazo del injerto de córnea, glaucoma neovascular, fibroplasias retrolenticulares, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia en Vitamina A, exceso de uso de lentes de contacto, queratoconjuntivitis atópica, queratoconjuntivitis de los miembros superiores, queratoconjuntivitis seca del pterigio, síndrome de Sjogren, acné rosacea, flictenulosis, sífilis, infecciones por mycobacterias, degeneración lipídica, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por Herpes simplex, infecciones por Herpes zoster, infecciones por protozoos, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis marginal, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliarteritis, traumatismo, granulomatosis de Wegener, sacroidosis, escleritis, síndrome de Stevens-Johnson, queratotomía penfigoide radial, rechazo de injerto de córnea, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliarteritis, trauma, granulomatosis de Wegener, sarcoidosis, escleritis, síndrome de Stevens-Johnson, queratotomía penfigoide radial, rechazo de injerto de córnea, artritis reumatoide, inflamación artrósica crónica (por ejemplo, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn), hemangioma, enfermedad de Osler-Weber Rendu y telangiectasia hemorrágica hereditaria.

La angiogénesis juega un papel crítico en el cáncer. Un tumor no puede expandirse sin un suministro sanguíneo que proporcione nutrientes y elimine los desechos celulares. Los tumores en los que es importante la angiogénesis incluyen tumores sólidos tales como rhabdomyosarcomas, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, osteosarcoma, y tumores benignos tales como neuroma acústico, neurofibroma, tracoma y granulomas piogénicos. Se han encontrado factores angiogénicos asociados con diversos tumores sólidos, y al impedir la angiogénesis se podría detener el crecimiento de estos tumores y el daño resultante al animal debido a la presencia del tumor. La angiogénesis también está relacionada con los tumores de origen sanguíneo tales como las leucemias, cualquiera de las diversas enfermedades neoplásicas agudas o crónicas de la médula ósea en las que se produce una proliferación descontrolada de los glóbulos blancos, habitualmente acompañada por una anemia, anomalías en la coagulación y una hipertrofia de los nódulos linfáticos, el hígado y el bazo. Se cree que la angiogénesis juega un papel en las anomalías de la médula ósea que dan lugar a los tumores de tipo leucémico.

Además de en el crecimiento tumoral, la angiogénesis es importante en la metástasis. Inicialmente, la angiogénesis es importante en la vascularización del tumor, que permite a las células cancerosas entrar en el torrente sanguíneo y circular por todo el cuerpo. Una vez que las células han abandonado el sitio primario y se han asentado en un sitio metastásico secundario, debe producirse una angiogénesis antes de que el nuevo tumor pueda crecer y expandirse.

- 5 Por lo tanto, al impedir la angiogénesis se podría impedir la metástasis de los tumores, y posiblemente contener el crecimiento neoplásico en el sitio primario.

- 10 La angiogénesis también está implicada en procesos fisiológicos normales tales como la reproducción y la curación de heridas. La angiogénesis es una etapa importante en la ovulación, y también en la implantación de la blástula después de la fertilización. La supresión de la angiogénesis podría usarse para inducir una amenorrea, para bloquear la ovulación o para impedir la implantación de la blástula.

B. Trastornos resultantes de la señalización hedgehog hiperactiva

- 15 Los anticuerpos anti-hedgehog de la invención pueden usarse para determinar si un tejido y/o unas células específicas muestran una sobreexpresión hedgehog. Esto puede producirse junto con otras mediciones de la activación de la ruta hedgehog, tales como a través de la medición de la expresión de los genes *gli* activados por la ruta de señalización hedgehog. Los *gli-1*, *gli-2* y *gli-3* se correlacionan muy coherentemente con la señalización hedgehog a lo largo de un amplio abanico de tejidos y trastornos, mientras que *gli-3* un poco menos. Los genes *gli*
- 20 codifican para factores de transcripción que activan la expresión de muchos genes necesarios para desencadenar los efectos completos de la señalización hedgehog. Sin embargo, los factores de transcripción *Gli-3* también pueden actuar como un represor de los genes efectores hedgehog, y por lo tanto, la expresión de *gli-3* puede provocar un efecto disminuido de la ruta de señalización hedgehog. El hecho de que *gli-3* actúe como activador o como represor de la transcripción depende de acontecimientos post-traduccionales, y por lo tanto se espera que los métodos para
- 25 la detección de la forma activante (con respecto a la forma represora) de la proteína *Gli-3* también serían una medida fiable de la activación de la ruta hedgehog. El gen *gli-1* es fuertemente expresado en un amplio abanico de cánceres, hiperplasias y pulmones inmaduros, y sirve como marcador de la activación relativa de la ruta hedgehog. Además, algunos tejidos tales como el pulmón inmaduro, que tienen una elevada expresión del gen *gli*, se verán fuertemente afectados por los inhibidores hedgehog. Por consiguiente, se contempla que la detección de la expresión del gen *gli* pueda usarse como una potente herramienta predictiva para identificar los tejidos y los
- 30 trastornos que se beneficiarán particularmente del tratamiento con un antagonista hedgehog.

- Los niveles de expresión de *gli-1* son detectados bien mediante una detección directa del transcrito o bien mediante la detección de los niveles o de la actividad de la proteína. Los transcritos pueden ser detectados mediante el uso de
- 35 cualquiera de una amplia variedad de técnicas que dependen principalmente de una hibridación o de sondas para los transcritos de *gli-1* o para los ADNc sintetizados a partir de los mismos. Algunas técnicas bien conocidas incluyen inmunotransferencia Northern, PCR con transcriptasa inversa y análisis en micromatriz de los niveles de transcrito. Algunos métodos para la detección del nivel de la proteína *Gli* incluyen inmunotransferencia Western, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D SDS-PAGE - preferentemente en
- 40 comparación con un patrón en el que se ha determinado la posición de las proteínas *Gli*) y espectroscopía de masas. La espectroscopía de masas puede acoplarse con una serie de etapas de purificación para permitir una identificación de alto rendimiento de muchos niveles diferentes de proteína en una muestra en particular. La espectroscopía de masas y la 2D SDS-PAGE también pueden usarse para identificar modificaciones post-transcripcionales en las proteínas que incluyen acontecimientos proteolíticos, ubiquitinación, fosforilación,
- 45 modificación de lípidos, etc. La actividad de *gli* también puede evaluarse mediante el análisis de la unión a un sustrato de ADN o una activación de la transcripción *in vitro* de los promotores objetivo. Un ensayo de intercambio en gel, a un análisis de la huella de ADN y un análisis de reticulación de ADN-proteína son, todos, métodos que pueden usarse para la evaluación de la presencia de una proteína capaz de unirse a los sitios de unión de *Gli* en el ADN. J Mol. Med 77 (6): 459 - 68 (1999); Cell 100(4): 423 - 34 (2000); Development 127 (19): 4923 - 4301 (2000).

- 50 Pueden medirse los niveles del transcrito de *gli*, y los tejidos enfermos o alterados que muestran unos niveles anormalmente altos de *gli* se tratan con un antagonista hedgehog. Puede conocerse que la afección que se va a tratar tiene una correlación significativa con una activación aberrante de la ruta hedgehog, a pesar de que no se realiza una medición de los niveles de expresión de *gli* en el tejido que se va a tratar. El tejido pulmonar prematuro,
- 55 los cánceres de pulmón (por ejemplo, adenocarcinomas, adenocarcinoma broncoalveolares, carcinomas microcíticos), los cánceres de mama (por ejemplo, carcinomas ductales inferiores, carcinomas lobulares inferiores, carcinomas tubulares), los cánceres de próstata (por ejemplo, adenocarcinomas) y las hiperplasias prostáticas benignas, muestran, todos, unos niveles fuertemente elevados de expresión de *gli-1* en ciertos casos. Por consiguiente, los niveles de expresión de *gli-1* son un potente dispositivo diagnóstico para determinar si estos tejidos deberían ser tratados con un antagonista hedgehog. Además, existen sustanciales pruebas correlacionadas de que
- 60 los cánceres de las células uroteliales (por ejemplo, cáncer de vejiga, otros cánceres urogenitales) también tendrán unos niveles elevados de *gli-1* en ciertos casos. Por ejemplo, se sabe que una pérdida de heterocigotismo en el cromosoma 9q22 es común en los cánceres de vejiga. El gen *ptch-1* está ubicado en esta posición, y la pérdida de la función *ptch-1* es probablemente una causa parcial de la hiperproliferación, como en muchos otros tipos de
- 65 cáncer. Por consiguiente, dichos cánceres también mostrarían una elevada expresión de *gli* y serían particularmente adecuados para su tratamiento con un antagonista hedgehog.

La expresión de *ptch-1* y de *ptch-2* también es activada por la ruta de señalización hedgehog, pero normalmente no en el mismo grado que los genes *gli*, y como resultado son inferiores a los genes *gli* como marcadores de la activación de la ruta hedgehog. En ciertos tejidos, únicamente se expresa uno de *ptch-1* o de *ptch-2* aunque la ruta hedgehog sea muy activa. Por ejemplo, en el desarrollo testicular, la desert hedgehog juega un importante papel y la

5 ruta hedgehog está activada, pero únicamente se expresa *ptc-2*. Por consiguiente, estos genes pueden ser individualmente poco fiables como marcadores de la activación de la ruta hedgehog, aunque se contempla la medición simultánea de ambos genes como un indicador más útil en los tejidos que se van a tratar con un antagonista hedgehog.

10 Debido a que *gli* es expresado tan ubicuamente durante la activación de hedgehog, cualquier grado de sobreexpresión de *gli* también puede ser útil, junto con la detección del propio hedgehog, en la determinación de si un antagonista hedgehog será un agente terapéutico eficaz. En dichas formas de realización, *gli* puede estar expresado a un nivel de al menos dos veces mayor de lo normal. En algunas formas de realización en particular, la expresión es cuatro, seis, ocho o diez veces mayor de lo normal.

15 A la luz de la amplia implicación de la señalización hedgehog en la formación de las disposiciones espaciales ordenadas de los tejidos diferenciados en los vertebrados, los antagonistas hedgehog podrían usarse en un proceso para la generación y/o el mantenimiento de un conjunto de diferentes tejidos de vertebrados tanto *in vitro* como *in vivo*. Los anticuerpos anti-hedgehog pueden usarse para identificar cuándo la aplicación de un antagonista

20 hedgehog, tanto inductor como anti-inductor con respecto a la proliferación o la diferenciación de un tipo tisular dado, puede ser, según sea apropiado, cualquiera de las preparaciones descritas anteriormente.

C. Cultivo de células neuronales

25 Los anticuerpos hedgehog son adicionalmente aplicables en la identificación de técnicas de cultivo celular en las que es deseable una reducción en la señalización hedgehog, y por lo tanto, la aplicación de los antagonistas hedgehog. Los sistemas de cultivos neuronales *in vitro* han demostrado ser unas herramientas fundamentales e indispensables para el estudio del desarrollo neural, así como para la identificación de factores neurotróficos tales como el factor de crecimiento nervioso (NGF), los factores tróficos filiales (CNTF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

30 Un uso del presente método puede ser en el cultivo de células madre neuronales, tal como en el uso de dichos cultivos para la generación de nuevas neuronas y de glía. Estos cultivos pueden ponerse en contacto con antagonistas hedgehog con objeto de alterar la tasa de proliferación de las células madre neuronales en el cultivo y/o de alterar la tasa de diferenciación, o para mantener la integridad de un cultivo de ciertas células neuronales diferenciadas terminalmente. El actual método puede usarse para cultivar ciertos tipos de neuronas (por ejemplo,

35 neuronas sensoriales, neuronas motoras). Dichos cultivos neuronales pueden usarse como sistemas de ensayo convenientes, así como fuentes de células implantables para tratamientos terapéuticos.

Los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención puede ser aplicables en un método de injerto intracerebral, un tratamiento incipiente para los trastornos del sistema nervioso central. Por ejemplo, una metodología para la

40 reparación de los tejidos cerebrales dañados implica el trasplante de células de animales fetales o neonatales en el cerebro adulto. Dunnett *et al.*, J. Exp. Biol. 123: 265 - 289 (1987). Las neuronas fetales de diversas regiones cerebrales pueden incorporarse con éxito en el cerebro adulto, y dichos injertos pueden aliviar los defectos de comportamiento. Por ejemplo, el trastorno en el movimiento inducido por lesiones en las proyecciones dopaminérgicas en los ganglios basales puede impedirse mediante injertos de neuronas dopaminérgicas

45 embrionarias. Las complejas funciones cognitivas que están deterioradas después de lesiones en el neocórtex también pueden ser parcialmente restauradas mediante injertos de células corticales embrionarias. El método en cuestión puede usarse para la monitorización de la regulación mediante hedgehog y/o antagonistas hedgehog del estado de crecimiento de un cultivo, o cuando se usa tejido fetal, especialmente en células madre neuronales, puede usarse para monitorizar la tasa de diferenciación de las células madre inducidas por hedgehog y/o por los

50 antagonistas hedgehog.

Las células madre útiles en los métodos descritos en el presente documento son generalmente conocidas. Por ejemplo, se han identificado diversas células de la cresta neural, algunas de las cuales son multipotentes y probablemente representan células de la cresta neural no diferenciadas, y otras de las cuales pueden generar

55 únicamente un tipo de célula, tal como neuronas sensoriales, y probablemente representan células progenitoras diferenciadas. Los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención pueden monitorizar la eficacia de los antagonistas hedgehog aplicados a células madre cultivadas, de forma que se monitoriza la regulación de la diferenciación de la progenitora no diferenciada, o para monitorizar la regulación de la tasa de desarrollo de una progenitora diferenciada, o para monitorizar la regulación de la tasa de desarrollo de una célula progenitora

60 diferenciada con vistas a transformarse en una célula neuronal diferenciada terminalmente. Por ejemplo, el presente método puede usarse para monitorizar *in vitro* la regulación de la diferenciación de las células de la cresta neural en células gliales, en células de schwann, en células cromafines, colinérgicas, en neuronas simpáticas o parasimpáticas, así como en neuronas peptidérgicas y serotoninérgicas. El antagonista hedgehog puede usarse individualmente o junto con otro factor neurotrófico que actúe para mejorar más particularmente una tasa de

65 diferenciación en particular de la célula progenitora neuronal.

D. Regulación del crecimiento y la diferenciación neuronal

Además del uso de los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención junto con antagonistas hedgehog en el contexto de la implantación de cultivos celulares, en el presente documento también se describe la monitorización de la aplicación terapéutica de los antagonistas hedgehog para regular el estado de crecimiento de las neuronas y de otras células neuronales tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico. La capacidad de un componente de la ruta hedgehog (por ejemplo, ptch, hedgehog y smoothened) para regular la diferenciación neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso central, y posiblemente también en el estado adulto, indica que en ciertos casos, puede esperarse que los antagonistas hedgehog en cuestión faciliten el control de las neuronas adultas con respecto al mantenimiento, el rendimiento funcional y el envejecimiento de las células normales; los procesos de reparación y de regeneración en células lesionadas químicamente o mecánicamente; y el tratamiento de la degeneración en ciertas afecciones patológicas. A la luz de esta comprensión, existen aplicaciones del método en cuestión en el tratamiento (por ejemplo, en la prevención, en la reducción de la gravedad, etc.) de afecciones neurológicas derivadas de: (i) lesiones agudas, subagudas o crónicas del sistema nervioso, incluyendo lesiones traumáticas, lesiones químicas, lesiones vasculares y déficits (tales como la isquemia resultante de una apoplejía), junto con lesiones infecciosas / inflamatorias e inducidas por tumores; (ii) el envejecimiento del sistema nervioso, incluyendo la enfermedad de Parkinson, el corea de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y similares, así como la degeneración espinocerebelosa; y (iv) enfermedades inmunológicas crónicas del sistema nervioso o que afectan al sistema nervioso, incluyendo la esclerosis múltiple.

Según sea apropiado, el método en cuestión también puede usarse en la generación de prótesis nerviosas para la reparación de los daños en nervios centrales y periféricos. En particular, cuando un axón aplastado o dañado es intubado mediante el uso de un dispositivo protésico, pueden añadirse los antagonistas hedgehog al dispositivo protésico para regular el índice de crecimiento y de regeneración de los procesos dendríticos. Algunos ejemplos de canales de guía nerviosos se describen en las Patentes de EE.UU. 5.092.871 y 4.955.892.

Alternativamente, el método en cuestión puede usarse en el tratamiento de una transformación neoplásica o hiperplásica, tal como la que puede producirse en el sistema nervioso central. Por ejemplo, los antagonistas hedgehog pueden utilizarse para provocar que las células transformadas se vuelvan post-mitóticas o apoptóticas. El presente método puede usarse por tanto como parte de un tratamiento de, por ejemplo, gliomas malignos, meningiomas, meduloblastomas, tumores neuroectodérmicos y ependimomas.

E. Cáncer neuronal

Los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención que pueden usarse junto con los antagonistas hedgehog pueden usarse como parte de un régimen de tratamiento de meduloblastomas malignos y de otros tumores malignos neuroectodérmicos del SNC. El meduloblastoma, un tumor cerebral primario, es el tumor cerebral más habitual en niños. Un meduloblastoma es un tumor neuroectodérmico primitivo (PNET) que aparece en la fosa posterior. Suponen aproximadamente el 25 % de todos los tumores cerebrales pediátricos. Histológicamente son tumores de células pequeñas redondeadas habitualmente dispuestas en una roseta verdadera, pero que pueden mostrar alguna diferenciación en astrocitos, células ependimales o neuronas. Los PNET pueden aparecer en otras áreas del cerebro, incluyendo la glándula pineal (pineoblastoma) y la corteza cerebral. Aquellos que aparecen en la región supratentorial tienen generalmente un peor pronóstico.

Los meduloblastomas / PNET son conocidos por reaparecer en cualquier parte del SNC tras su resección, e incluso pueden metastatizar al hueso. La evaluación del pretratamiento debería incluir por tanto un análisis de la médula espinal para excluir la posibilidad de "metástasis diseminadas". Para este fin, la RM mejorada con gadolinio ha reemplazado ampliamente a la mielografía, y se obtiene una citología del LCR postoperatoria como procedimiento rutinario. Los anticuerpos anti-hedgehog de la invención pueden usarse para detectar los niveles de expresión hedgehog en tumores primarios y/o metastásicos, como parte del régimen de tratamiento, para determinar la eficacia de un antagonista hedgehog.

El método en cuestión puede usarse como parte de un programa de tratamiento de ependimomas. Los ependimomas suponen aproximadamente el 10 % de los tumores cerebrales pediátricos en niños. Macroscópicamente son tumores que surgen a partir del revestimiento ependimal de los ventrículos, y microscópicamente forman rosetas, canales y rosetas perivasculares. En las series del CHOP de 51 niños diagnosticados con ependimomas, 3/4 eran histológicamente benignos. Aproximadamente 2/3 surgían a partir de la región del cuarto ventrículo. Un tercio estaba presente en la región supratentorial. La edad de aparición tiene un pico entre el nacimiento y los 4 años, según se demuestra mediante los datos del SEER así como con los datos del CHOP. La edad media es de aproximadamente 5 años. Debido a que muchos niños con esta enfermedad son bebés, a menudo requieren una terapia multimodal.

F. Cultivo celular no neuronal

Los anticuerpos anti-hedgehog pueden usarse junto con los antagonistas hedgehog en métodos de cultivo celular y terapéuticos relativos a la regeneración y el mantenimiento de tejido no neuronal. Dichos usos están contemplados

como resultado de la implicación de los componentes de la señalización hedgehog (por ejemplo, *ptch*, *hedgehog*, *smo*, etc.) en señales morfogénicas de otras rutas organogénicas en vertebrados, tales como el diseño endodérmico y la diferenciación mesodérmica y endodérmica.

5 La señalización hedgehog, especialmente *ptc*, *hedgehog* y *smoothened*, está implicada en el control del desarrollo de las células madre responsables de la formación del tracto digestivo, el hígado, los pulmones y otros órganos derivados del intestino primitivo. *Shh* es la señal inductora del endodermo al mesodermo, que es crítica para la morfogénesis del intestino. Por lo tanto, por ejemplo, los anticuerpos anti-hedgehog del método en cuestión pueden emplearse junto con antagonistas hedgehog para la regulación del desarrollo y el mantenimiento de un hígado artificial que puede tener múltiples funciones metabólicas de un hígado normal. En una forma de realización ejemplar, el método en cuestión puede usarse para monitorizar la regulación por parte del antagonista hedgehog de las funciones de un hígado normal. Por ejemplo, el método en cuestión puede usarse para regular la proliferación y la diferenciación de las células madre del tubo digestivo para formar cultivos de hepatocitos, que pueden usarse para poblar matrices extracelulares, o que pueden ser encapsulados en polímeros biocompatibles para formar hígados artificiales tanto implantables como extracorpóreos.

Alternativamente, el método en cuestión puede emplearse terapéuticamente para la monitorización de la regulación de dichos órganos por parte del antagonista hedgehog después de una agresión física, química o patológica. Por ejemplo, puede usarse un producto terapéutico que comprende antagonistas hedgehog en la reparación del hígado después de una hepatectomía parcial.

Alternativamente, el método en cuestión puede usarse para la monitorización de la proliferación y/o de la diferenciación del tejido pancreático mediante los antagonistas hedgehog tanto *in vivo* como *in vitro*. La generación del páncreas y del intestino delgado a partir del intestino embrionario depende de la señalización intercelular entre las células del endodermo y del mesodermo del intestino. En particular, se ha sugerido que la diferenciación del mesodermo intestinal en músculo liso depende de las señales de las células endodérmicas adyacentes. Un mediador candidato de las señales derivadas del endodermo en el intestino embrionario posterior es sonic hedgehog (*Shh*). Apelqvist *et al.*, Curr. Biol. 7: 801 - 4 (1997). El gen *Shh* es expresado en todo el endodermo embrionario germinal, con la excepción del endodermo germinal pancreático, que en su lugar expresa unos altos niveles de la proteína de homeodominio *Ip1* / *Pdx1* (factor promotor de la insulina 1 / homeosecuencia pancreática y duodenal 1), un regulador esencial del desarrollo pancreático temprano. El *Ip1* / *Pdx1* se usó para expresar selectivamente el *Shh* en el epitelio pancreático en desarrollo. El mesodermo pancreático de ratones transgénicos *Ip1* / *Pdx1*-*Shh* se desarrolló en el músculo liso y en las células intersticiales de las células de Cajal, que son características del intestino, en lugar de en el mesénquima pancreático y en el bazo. Apelqvist *et al.*, *supra*. También, los explantes pancreáticos expuestos a *Shh* experimentaron una expresión similar del *Shh* derivado del endodermo que controla el destino del mesodermo adyacente en diferentes regiones del tubo intestinal.

Alternativamente, los anticuerpos anti-hedgehog antagonistas hedgehog se usan para monitorizar la generación de tejido endodérmico a partir de células madre no endodérmicas, incluyendo células mesenquimatosas y células madre derivadas de tejidos mesodérmicos resultantes de la aplicación del antagonista hedgehog. Algunos ejemplos de tejidos mesodérmicos a partir de los cuales pueden aislarse células madre incluyen el músculo esquelético, el músculo cardíaco, el riñón, el cartílago y la grasa.

G. Afecciones / trastornos pancreáticos

45 Existe una gran diversidad de afecciones pancreáticas patológicas de células proliferativas y diferenciadas para las que los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención, cuando se usan junto con antagonistas hedgehog, pueden proporcionar beneficios terapéuticos. Más específicamente, dichos beneficios terapéuticos están dirigidos a la corrección de la expresión aberrante de insulina, o a la modulación de la diferenciación de las células pancreáticas. Sin embargo, de forma más general, se divulga un método para inducir y/o mantener un estado diferenciado, mejorar la supervivencia y/o afectar a la proliferación de las células pancreáticas, poniendo en contacto las células con los antagonistas hedgehog en cuestión. Por ejemplo, a la luz de la aparente implicación de *ptc*, *hedgehog* y *smoothened* en la formación de las disposiciones especiales ordenadas de los tejidos pancreáticos, el método en cuestión podría usarse como parte de una técnica para monitorizar la generación y/o el mantenimiento de dicho tejido tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, puede emplearse la monitorización de la modulación de la señalización hedgehog tanto en cultivos celulares como en métodos terapéuticos que implican la generación y el mantenimiento de las células β de los islotes, y posiblemente también de tejido no pancreático, tal como en el control del desarrollo y el mantenimiento del tejido del tracto digestivo, del bazo, de los pulmones, de los órganos urogenitales (por ejemplo, de la vejiga), así como de otros órganos que derivan del intestino primitivo.

Los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención, cuando se usan junto con los antagonistas hedgehog, pueden usarse en el tratamiento de trastornos hiperplásicos y neoplásicos que afectan al tejido pancreático, especialmente aquellos caracterizados por una proliferación aberrante de las células pancreáticas. Por ejemplo, los cánceres de páncreas están marcados por una proliferación anormal de las células pancreáticas, que puede dar como resultado alteraciones en la capacidad secretora de insulina del páncreas. Por ejemplo, ciertas hiperplasias pancreáticas, tales como los carcinomas pancreáticos, pueden dar como resultado una hipoinsulinemia debido a una

disfunción de las células β o a una disminución en la masa de las células de los islotes. Además, la manipulación de las propiedades de señalización hedgehog en diferentes puntos puede ser útil como parte de una estrategia para el remodelado / la reparación del tejido pancreático tanto *in vivo* como *in vitro*. Los métodos pueden hacer uso de la aparente implicación de *ptc*, *hedgehog* y *smoothed* en la regulación del desarrollo del tejido pancreático.

Alternativamente, los anticuerpos anti-hedgehog en cuestión, cuando se usan junto con los antagonistas hedgehog, pueden emplearse terapéuticamente para regular el páncreas después de una agresión física, química o patológica. El método en cuestión puede aplicarse a técnicas de cultivo celular, y en particular, puede emplearse para mejorar la intervención inicial de los dispositivos de tejido pancreático protésico. La manipulación de la proliferación y de la diferenciación de tejido pancreático, tal como a través del uso de los antagonistas hedgehog, puede proporcionar un medio para controlar más cuidadosamente las características de un tejido cultivado. Por ejemplo, el método en cuestión puede usarse para aumentar la producción del legado protésico que requieren las células β de los islotes, tal como ser usado en los dispositivos de encapsulación descritos, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. 4.892.538, 5.106.627, 4.391.909 y 4.353.888. Las células progenitoras tempranas de los islotes pancreáticos son multipotenciales, y aparentemente activan conjuntamente todos los genes específicos de los islotes desde el momento en que aparecen por primera vez. Según se va produciendo el desarrollo, la expresión de las hormonas específicas de los islotes, tales como la insulina, queda restringida al patrón de expresión característico de las células de los islotes maduras. El fenotipo de las células de los islotes maduras no es, sin embargo, estable en cultivo, ya que puede observarse la reaparición de rasgos embrionarios en las células β maduras. Mediante la utilización de los anticuerpos anti-hedgehog en cuestión, los antagonistas, se puede monitorizar la ruta de diferenciación o el índice proliferativo de las células reguladas por los antagonistas hedgehog.

Adicionalmente, puede utilizarse la monitorización de la manipulación por parte de los antagonistas hedgehog del estado diferenciado del tejido pancreático, junto con el trasplante de un páncreas artificial. Por ejemplo, puede utilizarse la manipulación de la función de hedgehog para afectar a la diferenciación del tejido, como un medio para mantener la viabilidad del injerto.

H. Trastorno proliferativo celular, tumores y cánceres

Los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención también pueden usarse en combinación con los antagonistas hedgehog para el tratamiento del carcinoma de pulmón y del adenocarcinoma, y de otros trastornos proliferativos que implican al epitelio pulmonar. Se sabe que *Shh* es expresado en las células del carcinoma de células escamosas y del adenocarcinoma humanos. Fujita *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 238: 658 (1997). También se detectó la expresión de *Shh* en los tejidos de carcinoma escamoso de pulmón humano, pero no en el tejido pulmonar normal del mismo paciente. También se observó que *Shh* estimula la incorporación de BrdU en las células del carcinoma y estimula su crecimiento celular, mientras que anti-*Shh*-H inhibía dicho crecimiento. Estos resultados sugieren que uno de *ptc*, *hedgehog* y/o *smoothed* está implicado en el crecimiento celular de dicho tejido pulmonar transformado, y por lo tanto, indica que la detención de la presencia de hedgehog en dicho tejido puede ser determinante para identificar si pueden usarse los antagonistas hedgehog para el tratamiento de dichos carcinomas y adenocarcinomas de pulmón, y de otros trastornos proliferativos similares que implican al epitelio pulmonar.

Los anticuerpos anti-hedgehog antagonistas hedgehog también pueden usarse para identificar tumores cuya existencia o patogenia está asociada con una señalización hedgehog, y esto sería sensible a la aplicación de los antagonistas hedgehog. Dichos tumores incluyen, pero no se limitan a: tumores relacionados con el síndrome de Gorlin (por ejemplo, meduloblastoma, meningioma, etc.), signos tumorales en ratones con el gen *Ptch* desactivado (por ejemplo, hemangioma, rhabdomyosarcoma, etc.), tumores resultantes de una amplificación de *gli-1* (por ejemplo, glioblastoma, sarcoma, etc.), tumores resultantes de una disfunción de *Smo* (por ejemplo, carcinoma de células basales, etc.), tumores conectados con *TRC8*, un homólogo de *Ptch* (por ejemplo, carcinoma renal y carcinoma de tiroides, etc.), tumores relacionados con *Ext-1* (por ejemplo, cáncer de hueso, etc.), tumores inducidos por *Shh* (por ejemplo, cáncer de pulmón, condrosarcomas, etc.) y otros tumores (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer urogenital (por ejemplo, de riñón, de vejiga, de uréter, de próstata, etc.), cáncer adrenal, cáncer gastrointestinal (por ejemplo, de estómago, de intestino, etc.).

Los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención también podrían identificar el cáncer que sería sensible a la aplicación de los antagonistas hedgehog. Estos cánceres incluyen, pero no se limitan a: cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer biliar, cáncer de pulmón (incluyendo microcítico y no microcítico), cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de cuello de útero, de endometrio u otro cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer del pene, cáncer de la vagina, cáncer de la uretra, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de esófago o cáncer de páncreas. Algunos tipos de cáncer adicionales incluyen cáncer de esqueleto o del músculo liso, cáncer de estómago, cáncer del intestino delgado, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de ano, cáncer de recto, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer de pituitaria y cáncer nasofaríngeo. Algunas formas ejemplares adicionales de un cáncer que puede ser tratado con los antagonistas hedgehog incluyen cánceres que comprenden células que expresan hedgehog. Otras formas ejemplares adicionales más de un cáncer que puede ser tratado con los antagonistas hedgehog incluyen cánceres que comprenden células que expresan *gli*. En una forma de realización, el cáncer no está caracterizado por una mutación en *patched-1*.

I. Tejido epitelial

Los anticuerpos anti-hedgehog de la invención también pueden usarse para la identificación del tejido epitelial que sería susceptible al tratamiento terapéutico (incluyendo una profilaxis) de los trastornos por parte de los antagonistas hedgehog. En general, dicho tratamiento comprende la administración de una cantidad de un antagonista hedgehog eficaz para alterar el estado de crecimiento del tejido epitelial tratado que es sensible a la señalización hedgehog. El modo de administración y los regímenes de dosificación variarán dependiendo del (los) tejido(s) epitelial(es) que se va(n) a tratar (por ejemplo, dérmico, mucoso, glandular, etc.). El método puede usarse para regular la inducción de la diferenciación inducida por *Shh* y/o para inhibir la proliferación del tejido derivado del epitelio. Por lo tanto, los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención pueden usarse en un método para el tratamiento de afecciones hiperplásicas y/o neoplásicas que implican tejido epitelial que es sensible a los antagonistas hedgehog.

(1) Crecimiento del pelo

Los anticuerpos anti-hedgehog de la invención también pueden usarse junto con los antagonistas hedgehog para controlar el crecimiento del pelo. El pelo está formado básicamente por queratina, una proteína dura e insoluble. Cada pelo individual comprende un cuerpo cilíndrico y una raíz, y está contenido en un folículo, una depresión caliciforme de la piel. La base del folículo contiene una proyección digitiforme denominada papila, que consiste en tejido conectivo a partir del cual crece el pelo, y a través del cual los vasos sanguíneos suministran alimentos a las células. El cuerpo es la parte que se extiende hacia fuera desde la superficie de la piel, mientras que la raíz se ha descrito como la parte enterrada del pelo. La base de la raíz se expande en el bulbo del folículo; se extruye en forma de fibras según proliferan las células del folículo. El "crecimiento" del pelo se refiere a la formación y el alargamiento de la fibra capilar por parte de las células en división.

Como es bien conocido en la materia, el ciclo normal del pelo se divide en tres etapas: anágena, catágena y telógena. Durante la fase activa (anágena), las células madre epidérmicas de la papila térmica se dividen rápidamente. Las células hijas se mueven hacia arriba y se diferencian para formar las capas concéntricas del propio pelo. La etapa de transición, catágena, está marcada por el cese de la mitosis de las células madre del folículo. La fase de reposo se conoce como telógena, en la que el pelo es retenido en el cuero cabelludo durante varias semanas antes de que un nuevo pelo en desarrollo que emerge por debajo desaloje el cuerpo en fase telógena de su folículo. A partir de este modelo está claro que cuanto mayor sea el conjunto de células madre en división que se diferencian en células capilares, más crecimiento del pelo se produce. Por consiguiente, puede llevarse a cabo un método para aumentar o reducir el crecimiento del pelo mediante la potenciación o la inhibición, respectivamente, de la proliferación de estas células madre.

Los anticuerpos anti-hedgehog pueden usarse para la identificación de los tejidos que serían sensibles a la aplicación de los antagonistas hedgehog en un método para la reducción del crecimiento del pelo humano, ya sea como una sustitución, o junto con, su eliminación mediante corte, afeitado o depilación. Por ejemplo, el presente método puede usarse en el tratamiento de la tricosis, caracterizada por un crecimiento anormalmente rápido o importante del pelo, por ejemplo, hipertricosis. Por ejemplo, pueden usarse los antagonistas hedgehog para el tratamiento del hirsutismo, un trastorno marcado por una vellosidad anormal. El método en cuestión también puede proporcionar un proceso para prolongar la duración de la depilación.

Además, debido a que un antagonista hedgehog a menudo será citostático para las células epiteliales, en lugar de citotóxico, dichos agentes pueden usarse para proteger las células del folículo piloso frente a agentes citotóxicos que requieren para su eficacia la progresión de la célula en la fase S del ciclo celular, por ejemplo, la muerte inducida por radiación. El tratamiento con los antagonistas hedgehog puede proporcionar protección al provocar que las células del folículo piloso entren en quiescencia, por ejemplo, impidiendo que las células entren en la fase S, e impidiendo así que las células del folículo experimenten una catástrofe mitótica o una muerte celular programada. Por ejemplo, los antagonistas hedgehog pueden usarse en pacientes que están bajo quimioterapia o radioterapia, que habitualmente dan como resultado la pérdida del pelo. Al inhibir la progresión del ciclo celular durante dichas terapias, el tratamiento en cuestión puede proteger las células del folículo piloso de la muerte, que de otro modo podría ser el resultado de la activación de los programas de muerte celular en ausencia de quiescencia. Una vez concluida la terapia con los antagonistas hedgehog, podría retirarse el método en cuestión con el concomitante alivio de la inhibición de la proliferación de las células del folículo. Los anticuerpos anti-hedgehog de la invención pueden usarse para la identificación de los tejidos en los que está activa la señalización hedgehog, y que por lo tanto podrían beneficiarse de la aplicación de los antagonistas hedgehog.

Los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención también pueden usarse para la identificación de pacientes que padecen foliculitis, tal como foliculitis decalvante, foliculitis uleritematosa reticulada o foliculitis queloidea, que serían sensibles a los antagonistas hedgehog. Por ejemplo, puede aplicarse tópicamente una preparación cosmética de un antagonista hedgehog en el tratamiento de la pseudofoliculitis, un trastorno crónico que se produce muy a menudo en la región a submandibular del cuello y está asociado con el afeitado, cuyas expresiones características son pápulas eritematosas y pústulas que contienen pelos ocluidos.

Los antagonistas hedgehog de la invención también pueden usarse para la identificación de los tejidos que serían

sensibles a los antagonistas hedgehog en un método para modular el crecimiento del pelo humano. Sato *et al.*, J. Clin. Invest. 104: 855 - 864 (1999) informaron de la regulación por aumento de la actividad Shh en las funciones de la piel postnatal como un conmutador biológico que induce el reposo de los folículos pilosos para que entren en fase anágena, con el consecuente crecimiento del pelo. Sato *et al.*, usaron un vector adenovírico, AdShh, para transferir el ADNc del Shh murino a la piel de ratones C57BL/6 postnatales de 19 días. La piel tratada mostró un aumento en la expresión del ARNm de Shh, Patched y Gli-1. En los ratones que recibieron AdShh, pero no en los controles, era evidente una aceleración en anágena, dado que aumentaba el tamaño del folículo piloso y la melanogénesis y se acumulaban los ARNm específicos del pelo de la síntesis de queratina ghHb-1 y de la tirosinasa relacionada con la melanina. Finalmente, los ratones C57BL/6 mostraron una notable aceleración de la aparición de nuevo crecimiento de pelo en la región de administración del AdShh en la piel semanas después del tratamiento, pero no en las áreas de control tratadas con el vector o en las áreas no tratadas. Después de 6 meses, la piel tratada con AdShh mostraba un pelo normal y una morfología cutánea normal. Por lo tanto, los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención puede ser útiles para la identificación de cuándo la aplicación de los antagonistas hedgehog sería útil para regular o modular el crecimiento del pelo inducido por Shh.

(2) Excesiva proliferación epitelial

Los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención pueden usarse para la identificación de afecciones hiperplásicas (por ejemplo, queratosis) y de afecciones epidérmicas neoplásicas caracterizadas por una elevada tasa de proliferación (por ejemplo, carcinoma de células escamosas) que serían sensibles a los antagonistas hedgehog. Estas incluyen el tratamiento de enfermedades autoinmunes que afectan a la piel, en particular, o de enfermedades dermatológicas que implican una proliferación y/o una queratinización mórbida de la epidermis, como por ejemplo, causada por la psoriasis o la dermatosis atópica. Estos anticuerpos anti-hedgehog también podrían usarse para la identificación de trastornos cutáneos comunes que están caracterizados por una proliferación anormal localizada de la piel (por ejemplo, psoriasis, carcinoma de células escamosas, queratocantoma, queratosis actínica) que se esperaría que fueran tratables mediante la aplicación de los antagonistas hedgehog.

Los anticuerpos anti-hedgehog de la invención también pueden usarse para la identificación de otros diversos trastornos caracterizados por lesiones queratósicas que podrían ser adecuados para su tratamiento con los antagonistas hedgehog. Las queratosis actínicas, por ejemplo, son unos tumores premalignos inflamatorios superficiales que surgen en la piel expuesta al sol y a radiación. Por consiguiente, el tratamiento de las queratosis, tal como de las queratosis actínicas, incluye la aplicación de una composición de un antagonista hedgehog en unas cantidades suficientes para inhibir la hiperproliferación de las células epidérmicas / epidermoides de la lesión.

(3) Acné

El acné representa otra dolencia dermatológica más que puede ser tratada con los antagonistas hedgehog. El acné vulgar, una enfermedad multifactorial que se produce lo más habitualmente en adolescentes y en adultos jóvenes, está caracterizada por la aparición de lesiones inflamatorias y no inflamatorias en la cara y en la parte superior del tronco. El defecto básico que da lugar a la aparición del acné vulgar es una hipercornificación del conducto de una glándula sebácea hiperactiva. La hipercornificación bloquea la movilidad normal de los microorganismos de la piel y del folículo, y al hacerlo, estimula la liberación de lipasas por parte de las bacterias *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis*, y de la levadura *Pitrosporum ovale*. Los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención pueden usarse para la identificación de pacientes o de tejidos en los que sería eficaz un tratamiento con los antagonistas hedgehog. En particular, las preparaciones tópicas pueden ser útiles para la prevención de las características transicionales de los conductos, por ejemplo, la hipercornificación, que dan lugar a la formación de las lesiones. Dicho régimen terapéutico que comprende los antagonistas hedgehog puede incluir adicionalmente otros componentes adicionales, tales como, por ejemplo, antibióticos, retinoides y antiandrógenos.

(4) Dermatitis y otras dolencias cutáneas

Los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención también pueden usarse para la identificación de pacientes o de tejidos que padecen una dermatitis que sería sensible a los antagonistas hedgehog. Dermatitis es un término descriptivo que se refiere a lesiones mal delimitadas que son que pruriginosas, eritematosas, escamosas, con ampollas, supurantes, agrietadas o costrosas. Estas lesiones pueden derivar de cualquiera de una gran diversidad de causas. Los tipos más habituales de dermatitis son dermatitis atópica, de contacto y del pañal. Por ejemplo, la dermatitis seborreica es una dermatitis crónica, habitualmente pruriginosa, con eritema, una descamación seca, húmeda o grasa, y unas placas de costras amarillentas en diversas áreas, especialmente en el cuero cabelludo, con la exfoliación de una excesiva cantidad de escamas secas. Los antagonistas hedgehog también pueden usarse en el tratamiento de la dermatitis por estasis, una dermatitis a menudo crónica y habitualmente eccematosa. La dermatitis actínica es una dermatitis que es debida a la exposición a una radiación actínica tal como la procedente del sol, de los rayos ultravioletas o de una radiación X o gamma. El método en cuestión puede usarse en el tratamiento y/o en la prevención de algunos síntomas de la dermatitis provocada por una proliferación indeseada de las células epiteliales. Dichas terapias para estas diversas formas de dermatitis también pueden incluir corticosteroides, antipruriginosos y antibióticos, tópicos y sistémicos.

Algunas dolencias adicionales que pueden ser tratadas mediante el método en cuestión son trastornos específicos no humanos, tales como la sarna.

J. Señalización hedgehog no canónica

Los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención pueden usarse para la identificación de situaciones o de afecciones en los que pueden usarse los antagonistas hedgehog para regular la actividad en una ruta Shh no canónica que es independiente del complejo del receptor Patched-Smoothed y de los factores de transcripción Gli. En un informe reciente, Jarov *et al.*, Dev. Biol. 261 (2): 520 - 536 (2003), describe que cuando se inmovilizó Shh en el sustrato (matriz extracelular) o fue producido por las propias células neuroepiteliales después de una transfección, los explantes de la placa neural no consiguieron dispersarse y en su lugar formaron estructuras compactas. Los cambios en las capacidades adhesivas de las células neuroepiteliales provocados por Shh podrían ser explicados por la inactivación de las integrinas $\beta 1$ de la superficie, combinada con un aumento en la adhesión celular mediada por la N-cadherina. Esta adhesión mediada por la Shh inmovilizada no contradice ni interfiere con las previamente conocidas funciones mediadas por la Shh (soluble) inductoras, mitógenas y tróficas, dado que la Shh inmovilizada promovió la diferenciación de las células neuroepiteliales en neuronas motoras y en las células de la placa basal con la misma potencia que la Shh soluble. También se ha demostrado que la regulación por parte de la Shh de las propiedades de adhesión durante la morfogénesis del tubo neural es rápida y reversible, y que no implica la ruta de señalización clásica Patched-Smoothed-Gli, y que es independiente y distinguible de la diferenciación celular mediada por la Shh. Por lo tanto, las modificaciones en las propiedades adhesivas de las células epiteliales neurales inducidas por la Shh no pueden ser atribuidas a su efecto promotor de la diferenciación, sino que revelan una nueva función de la Shh en su tejido que no había sido descrita previamente. Por lo tanto, los anticuerpos anti-hedgehog de la presente invención pueden identificar afecciones en las que pueden usarse los antagonistas hedgehog para regular esa ruta hedgehog no canónica que es independiente de Ptch, Smo, Fu, Su (Fu) y/o Gli. Más específicamente, dichos antagonistas hedgehog pueden usarse en un método para disrumpir esta función en tejidos neuronales o en otros tejidos aplicables, preferentemente en unas etapas de desarrollo específicas.

III. Composiciones y métodos

A. Anticuerpos anti-Hedgehog

Algunos anticuerpos ejemplares que pueden usarse para dichos fines incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales. El término "anticuerpos" también incluye a veces fragmentos de unión al antígeno.

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se crean preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un coadyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente (especialmente cuando se usan péptidos sintéticos) con una proteína que es inmunógena en la especie que va a ser inmunizada. Por ejemplo, el antígeno puede conjugarse con hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de la tripsina de soja, mediante el uso de un agente bifuncional o de una derivatización, por ejemplo, éster de maleimidobenzóil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOC12 o R1 N=C=NR, en la que R y R1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales son inmunizados frente al antígeno, los conjugados inmunógenos o los derivados mediante la combinación de, por ejemplo, 100 μ g o 5 μ g de la proteína o del conjugado (para conejos o para ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de coadyuvante completo de Freund e inyectando intradérmicamente la solución en múltiples zonas. Un mes después, los animales son revacunados con entre 1/5 y 1/10 de la cantidad original de péptido o de conjugado en coadyuvante completo de Freund mediante una inyección subcutánea en múltiples zonas. Entre siete y 14 días después, se extrae sangre de los animales y se ensaya el suero para comprobar los títulos de anticuerpos. Los animales son revacunados hasta que el título alcanza una meseta. Los conjugados también pueden elaborarse en un cultivo celular recombinante en forma de proteínas de fusión. También, se usan adecuadamente agentes de agregación tales como alum para potenciar la respuesta inmunitaria.

2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales pueden ser elaborados mediante el uso del método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975) o pueden ser elaborados mediante métodos de ADN recombinante (Patente de EE.UU. Nº 4.816.567).

En el método del hibridoma se inmuniza un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, como se ha descrito anteriormente, para provocar que los linfocitos produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos son aislados y después condensados con una línea celular de mieloma mediante el uso de un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una

célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59 - 103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado, medio que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células del mieloma parental no condensadas (denominadas también compañeras de fusión). Por ejemplo, si las células del mieloma parental carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma compañeras de fusión preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan una producción estable a un nivel elevado de anticuerpos por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio selectivo que seleccione frente a las células parentales no condensadas. Las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murinas, tales como las obtenidas a partir de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EE.UU., y SP-2 y derivados, por ejemplo, las células X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, EE.UU. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); y Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51 - 63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se ensaya para comprobar la producción de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante una inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA).

3. Fragmentos de anticuerpos

En ciertas circunstancias hay ventajas en el uso de los fragmentos de anticuerpos en lugar de los anticuerpos completos.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos derivaban de la digestión proteolítica de los anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107 - 117 (1992); y Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ser producidos ahora directamente por las células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y scFv pueden ser, todos, expresados y secretados en *E. coli*, permitiendo así la fácil producción de grandes cantidades de estos anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos pueden ser aislados a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente a partir de *E. coli* y acoplarse directamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163 - 167 (1992)). De acuerdo con otra metodología, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente a partir de un cultivo de células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ con una semivida *in vivo* aumentada que comprenden residuos de un epítipo de unión al receptor natural se describen en la Patente de EE.UU. Nº 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán apreciables por el profesional experto. En otras formas de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Véase el documento WO 93/16185; la Patente de EE.UU. Nº 5.571.894; y la Patente de EE.UU. Nº 5.587.458. Los Fv y sFv son la única especie con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; por lo tanto, son adecuados para una unión no específica reducida durante su uso *in vivo*. También pueden construirse proteínas de fusión sFv para producir la fusión con una proteína efectora en el amino o el carboxi terminal de un sFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, *supra*. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, según se describe en la Patente de EE.UU. 5.641.870 por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

B. Variantes de los anticuerpos anti-Hedgehog

Además de los anticuerpos anti-hedgehog descritos en el presente documento, se contempla que puedan prepararse variantes de dichas moléculas para su uso con la invención del presente documento. Dichas variantes pueden prepararse mediante la introducción de los cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante, y/o mediante la síntesis del anticuerpo o del polipéptido deseado. Los expertos en la materia apreciarán que los cambios en los aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales de estas moléculas, tales como la modificación en el número o en la posición de los sitios de glucosilación, de forma que se mejoran las propiedades de unión a hedgehog. Las variaciones en la secuencia de aminoácidos pueden realizarse, por ejemplo, mediante el uso de cualquiera de las técnicas y directrices de mutaciones conservativas y no conservativas establecidas, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. Nº 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una delección o una inserción de uno o más codones que codifican para la secuencia de aminoácidos, que dan como resultado un cambio en la

secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia natural. Opcionalmente, la variación es mediante la sustitución de al menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios de la secuencia de aminoácidos de interés. Una orientación para la determinación de qué residuo de aminoácido puede insertarse, sustituirse o delecionarse sin que se afecte negativamente la actividad deseada, puede encontrarse mediante la comparación de la secuencia de la secuencia de aminoácidos de interés con moléculas proteicas homólogas conocidas, y minimizando el número de cambios realizados en la secuencia de aminoácidos en las regiones de alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido por otro aminoácido con unas propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativas. Las inserciones o las delecciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de entre aproximadamente 1 y 5 aminoácidos. La variación permitida puede ser determinada mediante la realización sistemática de inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia, y ensayando las variantes resultantes para comprobar la actividad mostrada por la secuencia completa o natural madura.

En el presente documento se proporcionan fragmentos de los diversos anticuerpos anti-hedgehog. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el N-terminal o en el C-terminal, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se comparan con un anticuerpo o una proteína natural completa. Dichos fragmentos que carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada también son útiles en los métodos divulgados.

Los anteriores fragmentos de polipéptidos pueden prepararse mediante cualquiera de las diversas técnicas convencionales. Los fragmentos peptídicos deseados pueden ser sintetizados químicamente. Una metodología alternativa implica la generación de dichos fragmentos mediante una digestión enzimática, por ejemplo, mediante el tratamiento de la proteína con una enzima que se sabe que escinde las proteínas en unos sitios definidos por unos residuos de aminoácidos en particular, o mediante la digestión del ADN con unas enzimas de restricción adecuadas, y el aislamiento del fragmento deseado. Otra técnica adecuada más implica el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifica para el fragmento deseado mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los terminales deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores 5' y 3' de la PCR. Preferentemente, dichos fragmentos comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con la correspondiente molécula completa.

En algunas formas de realización en particular, las sustituciones conservativas de interés se muestran en la 5 Tabla 1 bajo el encabezamiento de las sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen unos cambios más sustanciales, denominados sustituciones ejemplares en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, y los productos se criban con objeto de identificar la variante deseada.

Tabla 1

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn (N)	Gin; His; Asp; Lys; Arg	Gin
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gin (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gin	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gin; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Las modificaciones sustanciales en la función o en la identidad inmunológica de las variantes de los anticuerpos anti-hedgehog se consiguen mediante la selección de las sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, en forma una conformación de lámina o de hélice, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos según las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr; Asn; Gln
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán un intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos residuos sustituidos también pueden ser introducidos en los sitios de sustituciones conservativas, o más preferentemente, en el resto de sitios (no conservados).

Las variaciones pueden llevarse a cabo mediante el uso de métodos conocidos en la materia, tales como una mutagénesis mediada por oligonucleótido (dirigida), un cribado de alanina y una mutagénesis mediante PCR. La mutagénesis dirigida [Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zolleref *et al.*, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)], la mutagénesis de casete [Wells *et al.*, Gene, 34: 315 (1985)], la mutagénesis de selección por restricción [Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)] u otras técnicas conocidas pueden llevarse a cabo sobre el ADN clonado para producir la molécula de anticuerpo anti-hedgehog.

También puede emplearse un análisis de barrido de los aminoácidos para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de barrido preferidos están los aminoácidos neutros o relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es normalmente un aminoácido de barrido preferido en este grupo debido a que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que se altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, Science, 244: 1081 - 1085 (1989)]. La alanina también se prefiere normalmente porque es el aminoácido más común. Además, frecuentemente se une tanto a posiciones ocultas como expuestas [Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N. Y.); Chotia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce unas cantidades adecuadas de la variante, puede usarse un aminoácido isotérico.

También puede sustituirse cualquier residuo de cistina que no esté implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada de la variante del anticuerpo anti-hedgehog, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidante de la molécula e impedir una reticulación aberrante. Por el contrario, puede(n) añadirse puente(s) de cisteína a dicha molécula para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Una tipo particularmente preferido de variante por sustitución implica la sustitución de uno o más residuos de una región de unión del anticuerpo. Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo anti-hedgehog, los residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, de un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para un desarrollo adicional tendrá(n) unas propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental a partir del cual se han generado. Una forma conveniente de generar dichas variantes por sustitución implica la maduración por afinidad mediante el uso de una expresión en fago. En resumen, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6 - 7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes así generadas son expresadas de una forma monovalente en partículas de fagos filamentosos en forma de fusiones del producto del gen III de M 13 empaquetadas en cada partícula. Las variantes expresadas en fagos son cribadas a continuación para comprobar su actividad biológica (por ejemplo, su afinidad de unión) según se divulga en el presente documento. Con objeto de identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, puede llevarse a cabo una mutagénesis de barrido de alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el polipéptido objetivo. Dichos residuos de contacto y los residuos vecinos son candidatos para una sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez generadas dichas variantes, el conjunto de variantes se somete a un cribado según se describe en el presente documento, y los anticuerpos con unas propiedades superiores en uno o más de los ensayos pertinentes pueden ser seleccionados para un desarrollo adicional.

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican para las variantes de las secuencias de aminoácidos de las variantes de los anticuerpos anti-hedgehog se preparan mediante diversos métodos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes naturales de la secuencia de aminoácidos) o la preparación mediante una mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida), una mutagénesis mediante PCR y una mutagénesis de casete de una secuencia natural o de una

variante preparada previamente.

C. Preparación de los anticuerpos anti-Hedgehog

- 5 La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de anticuerpos anti-hedgehog mediante el cultivo de las células transformadas o transfectadas con un vector que contiene el ácido nucleico que codifica para dichos anticuerpos. Por supuesto, se contempla que puedan usarse métodos alternativos, que son bien conocidos en la materia, para la preparación de dichos anticuerpos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o porciones de la misma, puede ser producida mediante una síntesis peptídica directa mediante el uso de técnicas en fase sólida [véase, por ejemplo, Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 - 2154 (1963)]. Puede llevarse a cabo una síntesis proteica *in vitro* mediante el uso de técnicas manuales o mediante una automatización. La síntesis automatizada puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el uso de un Sintetizador Peptídico de Applied Biosystems (Foster City, CA) mediante el uso de las instrucciones del fabricante. Pueden sintetizarse químicamente varias porciones de dichos anticuerpos por separado y combinarse mediante el uso de métodos químicos o enzimáticos para producir el producto deseado.

1. Selección y transformación de las células hospedadoras

- 20 Las células hospedadoras son transfectadas o transformadas con los vectores de expresión o de clonación descritos en el presente documento para la producción de los anticuerpos anti-hedgehog, y cultivadas en un medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para la inducción de promotores, la selección de transformantes o la amplificación de los genes que codifican para las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, pueden ser seleccionadas por el artesano experto sin una excesiva experimentación. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares pueden encontrarse en Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y en Sambrook *et al.*, *supra*.

- 30 Los métodos para la transfección de células eucariotas y la transformación de células procariotas son conocidos por el artesano experto habitual, por ejemplo, CaCl_2 , CaPO_4 , mediada por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se lleva a cabo mediante el uso de las técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio emplea cloruro de calcio, según se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, o generalmente se usa una electroporación en procariotas. Se usa una infección con *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de ciertas células vegetales, según se describe Shaw *et al.*, Gene, 23: 315 (1983) y en el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para las células de mamífero sin dichas paredes celulares, puede emplearse el método de la precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, Virology, 52: 456 - 457 (1978). Los aspectos generales de las transfecciones de sistemas hospedadores de células de mamífero se han descrito en la Patente de EE.UU. Nº 4.399.216. Las transformaciones en levaduras se llevan a cabo normalmente de acuerdo con el método de Van Solingen *et al.*, J. Bact., 130: 946 (1977) y Hsiao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.), 76: 3829 (1979). Sin embargo, también pueden usarse otros métodos para la introducción de 5 ADN en células, tales como mediante una microinyección nuclear, una electroporación, una fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policondones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para las diversas técnicas de transformación de células de mamífero, véase Keown *et al.*, Methods in Enzymology, 185: 527 - 537 (1990) y Mansour *et al.*, Nature, 336: 348 - 352 (1988).

- 45 Algunas células hospedadoras adecuadas para la clonación o la expresión de ADN en los vectores del presente documento incluyen células procariotas, de levadura o de eucariotas superiores. Algunos procariotas incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *E. coli*. Hay disponibles públicamente varias cepas de *E. coli*, tales como la cepa MM294 de *E. coli* K12 (ATCC 31.446); *E. coli* 1776 (ATCC 31.537); las cepas de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células hospedadoras procariotas adecuadas incluyen Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, el *B. licheniformis* 41P divulgado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes.
- 55 La cepa W3110 es un hospedador u hospedador parental particularmente preferido porque es una cepa hospedadora habitual para las fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula hospedadora secreta unas cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, puede modificarse la cepa W3110 para que efectúe una mutación genética en los genes que codifican para las proteínas endógenas del hospedador, incluyendo algunos ejemplos de dichos hospedadores la cepa 1A2 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa 9E4 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; la cepa 27C7 de *E. coli* W3110 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degPompTkanr25*; la cepa 37D6 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kanr*; la cepa 40B4 de *E. coli* W3110, que es la cepa 37D6 con una mutación por delección *degP* no resistente a la kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene la proteasa periplásmica mutante divulgada en la Patente de EE.UU. Nº 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, los métodos de clonación *in vitro*, por ejemplo, la PCR u otras reacciones de la polimerasa con ácidos nucleicos, son adecuados.

Los anticuerpos completos y los fragmentos de anticuerpos pueden ser producidos en bacterias, en particular cuando no son necesarias la función de glucosilación y efectora del Fc. Los anticuerpos completos tienen una mayor semivida en circulación. La producción en *E. coli* puede ser más rápida y rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y de polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, el documento de EE.UU. 5.648.237 (Carter *et al.*), el documento de EE.UU. 5.789.199 (Joly *et al.*) y el documento de EE.UU. 5.840.523 (Simmons *et al.*) que describen la región de inicio de la traducción (TIR) y las secuencias de señalización para optimizar la expresión y la secreción. Después de la expresión, el anticuerpo se aísla a partir de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble, y puede ser purificado mediante, por ejemplo, una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final puede llevarse a cabo de una forma similar al proceso para la purificación de anticuerpos expresados en células adecuadas (por ejemplo, en células CHO).

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o las levaduras son adecuados como hospedadores de clonación o de expresión para los vectores que codifican para los polipéptidos hedgehog. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador eucariota inferior usado habitualmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; documento EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); hospedadores de *Kluyveromyces* (Patente de EE.UU. N° 4.943.529; Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9: 968 - 975(1991)) tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, J. Bacteriol., 154 (2): 737 - 742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906; Van den Berg *et al.*, Bio/Technology, 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna *et al.*, J. Basic Microbiol., 28: 265 - 278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 76: 5259 - 5263 [1979]); *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538, publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991) y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284 - 289 [1983]; Tilburn *et al.*, Gene, 26: 205 - 221 [1983]; Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 81: 1470 - 1474 [1984]) y de *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4: 475 - 479 [1985]). Las levaduras metilótropas son adecuadas en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, levaduras capaces de crecer en metanol, seleccionadas de entre los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Una lista de las especies específicas que son ejemplares de esta clase de levaduras puede encontrarse en C. Anthony, The Biochemistry of Metilotrophs, 269 (1982).

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de la producción del polipéptido de la cinasa hedgehog glucosilada derivan de organismos pluricelulares. Algunos ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insecto tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales, tales como cultivos celulares de algodón, de maíz, de patata, de soja, de petunia, de tomate y de tabaco. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas y las correspondientes células hospedadoras de insecto permisivas a partir de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Hay disponible públicamente diversas cepas víricas para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus pueden usarse como el virus del presente documento, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Sin embargo, ha habido un gran interés en las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha transformado en un procedimiento un rutinario. Algunos ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles son la línea de riñón de mono CV1 y transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para su crecimiento en un cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cachorro de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino / -DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243 - 251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de riñón de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44 - 68 (1982)); células MRC 5; células FS4 5; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras son transformadas con los anteriormente descritos vectores de expresión o de clonación para la producción de los anticuerpos antihedgehog, y cultivadas en un medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para la inducción de los promotores, la selección de los transformantes o la amplificación de los genes que codifican para las secuencias deseadas.

2. Selección y uso de un vector replicable

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica para el respectivo anticuerpo anti-hedgehog puede ser insertado en un vector replicable para su clonación (amplificación del ADN) o para su expresión. Hay

disponibles públicamente varios vectores. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, un cósmido, una partícula vírica o un fago. La secuencia apropiada de ácidos nucleicos puede ser insertada en el vector mediante diversos procedimientos. En general, el ADN es insertado en el (los) sitio(s) de endonucleasa(s) de restricción apropiado(s) mediante el uso de técnicas conocidas en la materia. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, una o más secuencias de señalización, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor o la secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de los vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligación estándar que son conocidas por el artesano experto.

Las cadenas ligera y pesada del anticuerpo anti-hedgehog puede ser expresadas no solo directamente, sino también en forma de un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia de señalización u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el N-terminal de la proteína o el polipéptido maduro. En general, la secuencia de señalización puede ser un componente del vector, o puede ser parte del ADN que codifica para la secuencia madura que está insertada en el vector. La secuencia de señalización puede ser una secuencia de señalización procariota seleccionada, por ejemplo, de entre el grupo de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o líderes de la enterotoxina termoestable II. Para la secreción en levaduras, la secuencia de señalización puede ser, por ejemplo, el líder de la invertasa de levadura, el líder del factor alfa (incluyendo los líderes del factor α de *Saccharomyces* y de *Kluyveromyces*, este último descrito en la Patente de EE.UU. N° 5.010.182), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179 publicado el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión en células de mamífero, pueden usarse las secuencias de señalización de mamífero para dirigir la secreción de la proteína, tales como las secuencias de señalización de los polipéptidos secretados de la misma especie o de especies relacionadas, así como líderes de secreción víricos.

Ambos vectores de expresión y de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más de las células hospedadora seleccionadas. Dichas secuencias son bien conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras, y varios orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para la clonación de vectores en células de mamífero.

Los vectores de expresión y de clonación contendrán normalmente un gen de selección, denominado también marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican para proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxótrofas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en el medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica para la racemasa de D-alanina para *Bacilli*.

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para las células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de las células competentes para captar el ácido nucleico que codifica para la proteína deseada, tales como el de la DHFR o el de la cinasa de timidina. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea la DHFR natural es la línea celular CHO deficiente en la actividad de DHFR, preparada y propagada según se describe en Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77: 4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levaduras YRp7 [Stinchcomb *et al.*, Nature, 282: 39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7: 141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10: 157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85: 12 (1977)].

Los vectores de expresión y de clonación contienen habitualmente un promotor unido operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la secuencia de aminoácidos deseada, con objeto de dirigir la síntesis del ARNm. Los promotores reconocidos por varias células hospedadoras potenciales son bien conocidos. Algunos promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen los sistemas promotores de la β -lactamasa y de la lactosa [Chang *et al.*, Nature, 275: 615 (1978); Goeddel *et al.*, Nature, 281: 544 (1979)], de la fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980); documento EP 36.776] y promotores híbridos tales como el promotor *tac* [deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 80: 21 - 25 (1983)]. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S. D.) unida operativamente al ADN que codifica para la secuencia de proteínas deseada.

Algunos ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores de la cinasa de 3-fosfoglicerato [Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem., 255: 2073 (1980)] o de otras enzimas glucolíticas [Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry, 17: 4900 (1978)], tales como enolasa, deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato, hexocinasa, descarboxilasa de piruvato, fosfofructocinasa, isomerasa de glucosa-6-fosfato, mutasa de 3-fosfoglicerato, cinasa de piruvato, isomerasa de triosafosfato, isomerasa de fosfoglucosa y glucocinasa.

Otros promotores de levaduras que son promotores inducibles con la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras de la deshidrogenasa de alcohol 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, las enzimas degradativas asociadas con el metabolismo de nitrógeno, la

metalotioneína, la dehidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato y las enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Algunos vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657.

- 5 La transcripción del ADN en las células hospedadoras de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de genomas de virus tales como el virus de polio, el virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el virus de simio 40 (SV40), a partir de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de la actina o el promotor de una
- 10 inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de la célula hospedadora.

- La transcripción de un ADN que codifica para el anticuerpo anti-hedgehog puede aumentarse mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en *cis* del ADN, habitualmente de entre aproximadamente 10 y 300 pb, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras procedentes de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador procedente de un virus de células eucariotas. Algunos ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100 - 270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en el
- 15 lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. El potenciador puede ser empalmado en el vector en una posición en 5' o en 3' con respecto a la secuencia codificante de las secuencias de aminoácidos precedentes, pero preferiblemente está ubicado en un sitio en 5' con respecto al promotor.
- 20

- Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levaduras, de hongos, de insecto, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos pluricelulares) también contendrán las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente a partir de las regiones no traducidas en 5' y, ocasionalmente en 3', de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos en forma de fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica para el respectivo anticuerpo, polipéptido u oligopéptido descrito en esta sección.
- 25
- 30

- Otros métodos, vectores y células hospedadoras adicionales adecuados para su adaptación a la síntesis del respectivo anticuerpo, polipéptido u oligopéptido en cultivos de células de vertebrados recombinantes se describen en Gething *et al.*, Nature, 293: 620 - 625 (1981); en Mantei *et al.*, Nature, 281: 40 - 46(1979); en el documento EP 117.060; y en el documento EP 117.058.
- 35

3. Cultivo de las células hospedadoras

- Las células hospedadoras usadas para la producción de los anticuerpos anti-hedgehog pueden ser cultivadas en diversos medios. Algunos medios disponibles comercialmente tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para el cultivo de las células hospedadoras. Además, puede usarse cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Met. Enz. 58: 44 (1979), en Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), en las Patentes de EE.UU. N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; en el documento WO 90/03430; en el documento WO 87/00195; o en la Patente de EE.UU. Re. 30.985 como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede estar complementado según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, de calcio, de magnesio y de fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente a unas concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o cualquier fuente de energía equivalente. También puede introducirse cualquier otro complemento necesario a unas concentraciones apropiadas que sería conocido por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH, y similares, son las usadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el artesano experto habitual.
- 40
- 45
- 50
- 55

4. Detección de la amplificación / expresión génica

- La amplificación y/o la expresión génica pueden medirse directamente en una muestra, por ejemplo, mediante una inmunotransferencia Southern convencional, una inmunotransferencia Northern para cuantificar la transcripción del ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77: 5201 - 5205 (1980)], una transferencia en mancha (análisis del ADN) o una hibridación *in situ*, mediante el uso de una sonda propiamente marcada, basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN - ARN o dúplex de ADN - proteína. Los anticuerpos a su vez pueden estar marcados, y el ensayo puede llevarse a cabo cuando el dúplex está unido a una superficie, de forma que tras la formación del dúplex, en la superficie pueda detectarse la presencia del anticuerpo unido al dúplex.
- 60
- 65

Como alternativa, la expresión génica puede medirse mediante métodos inmunológicos, tales como una tinción inmunohistoquímica de las células o de secciones de tejido y ensayar el cultivo celular o los líquidos corporales para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de las muestras de líquidos pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos adecuados para el presente método pueden prepararse contra una secuencia polipeptídica natural o contra una secuencia condensada exógena fusionada al ADN y que codifica para un epítipo específico de un anticuerpo de dicho polipéptido u oligopéptido.

5. Purificación

Los anticuerpos anti-hedgehog pueden recuperarse a partir del medio de cultivo o a partir de los lisados de las células hospedadoras. Si están unidos a la membrana, puede ser liberados de la membrana mediante el uso de una solución detergente adecuada (por ejemplo, Triton-X 100) o mediante una escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión del anterior pueden ser disrumpidas mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, aplicación de ultrasonidos, disrupción mecánica o agentes de lisado celular.

Puede ser deseable la purificación de lo anterior a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: mediante un fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; una precipitación con etanol; una HPLC en fase inversa; una cromatografía sobre sílice o en una resina de intercambio iónico tal como DEAE; un cromatoenfoque; una SDS-PAGE; una precipitación con sulfato de amonio; una filtración en gel mediante el uso de, por ejemplo, Sephadex G-75; en columnas de Sepharose de proteína A para eliminar contaminantes tales como la IgG; y en columnas quelantes de metales para unir las formas marcadas con el epítipo de las moléculas deseadas. Pueden emplearse varios métodos de purificación de proteínas, y dichos métodos son conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La(s) etapa(s) de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción usado y del anticuerpo, polipéptido u oligopéptido en particular producido para los métodos reivindicados.

Cuando se usan técnicas recombinantes, los anticuerpos anti-hedgehog pueden ser producidos intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretados directamente en el medio. Si dichas moléculas son producidas intracelularmente, como una primera etapa, los desechos particulados, tanto células hospedadoras como fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante una centrifugación o una ultrafiltración. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163 - 167 (1992) describen un procedimiento para el aislamiento de los anticuerpos que son secretados en el espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los desechos celulares pueden ser eliminados mediante una centrifugación. Cuando el anticuerpo es secretado en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran en primer lugar mediante el uso de un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de la proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis, y pueden incluirse antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes perjudiciales.

La purificación puede producirse mediante el uso de, por ejemplo, una cromatografía en hidroxilapatito, una electroforesis en gel, una diálisis y una cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar los anticuerpos que están basados en las cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Met.* 62: 1 - 13 (1983)). La proteína G está recomendada para todos los isotipos de ratón y para el $\gamma 3$ humano (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5: 15671575 (1986)). La matriz a la que está unida el ligando de afinidad es lo más a menudo de agarosa, pero hay disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como las de vidrio de poro controlado o las de poli(estirenodivinilo) benceno permiten unos caudales más rápidos y unos tiempos de procesamiento más cortos de los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. También hay disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas tales como un fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, una precipitación con etanol, una HPLC en fase inversa, una cromatografía sobre sílice, una cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, una cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), un cromatoenfoque, una SDS-PAGE y una precipitación con sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

Después de cualquier etapa de purificación primaria, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede ser sometida a una cromatografía de interacciones hidrófobas a bajo pH mediante el uso de un tampón de elución a un pH de entre aproximadamente 2,5 - 4,5, realizada preferentemente a unas concentraciones salinas bajas (por ejemplo, de aproximadamente 0 - 0,25 M de sal).

D. Productos y kits

Para aplicaciones terapéuticas, el producto comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente, que indica un uso para la detección de la expresión hedgehog, incluyendo en combinación con un antagonista hedgehog. Algunos recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene la composición que comprende el anticuerpo antihedgehog y puede tener un puerto de acceso estéril. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para la detección de la expresión hedgehog. La etiqueta o el prospecto comprenderán adicionalmente instrucciones para el uso del anticuerpo antihedgehog.

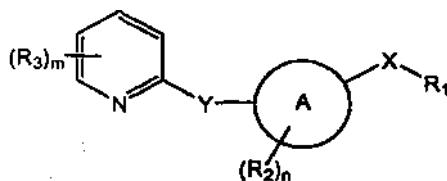
También pueden proporcionarse kits que son útiles para otros fines diversos, por ejemplo, para ensayos de destrucción de células con expresión hedgehog, para la purificación o la inmunoprecipitación hedgehog a partir de células. Para el aislamiento y la purificación del polipéptido de la cinasa hedgehog, el kit puede contener al respectivo reactivo de unión a la cinasa hedgehog acoplado a microesferas (por ejemplo, microesferas de sepharose). Pueden proporcionarse kits que contienen dichas moléculas para la detección y la cuantificación del polipéptido hedgehog *in vitro*, por ejemplo, en una IHC, una ICC, una ISH, un EIA, un ELISA o una inmunotransferencia Western. Al igual que con el producto, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. El recipiente contiene una composición que comprende al menos una de dichas moléculas de anticuerpo anti-hedgehog utilizable con la invención. Pueden incluirse recipientes adicionales que contengan, por ejemplo, diluyentes y tampones, anticuerpos de control. La etiqueta o el prospecto pueden proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones del uso previsto *in vitro* o diagnóstico.

E. Tratamiento con antagonistas

La invención proporciona métodos para el diagnóstico de trastornos marcados por una señalización hedgehog. Por lo tanto, tras la identificación de un paciente en necesidad de tratamiento (es decir, de la inhibición de la señalización hedgehog) puede administrarse un antagonista hedgehog a dicho paciente. Los antagonistas hedgehog pueden ser anticuerpos, ARNip, inhibidores de molécula pequeña, inmunoadhesinas, proteínas hedgehog mutantes o cualquier antagonista hedgehog conocido en la materia.

Los antagonistas de molécula pequeña que pueden usarse para el tratamiento de los pacientes identificados mediante el método diagnóstico de la invención incluyen XL139 (Exelixis), IPI-926 (Infinity), IPI-609 (Infinity), los compuestos divulgados en el documento WO 2006/050351 y cualquier otra molécula pequeña antagonista de la ruta hedgehog conocida en la materia.

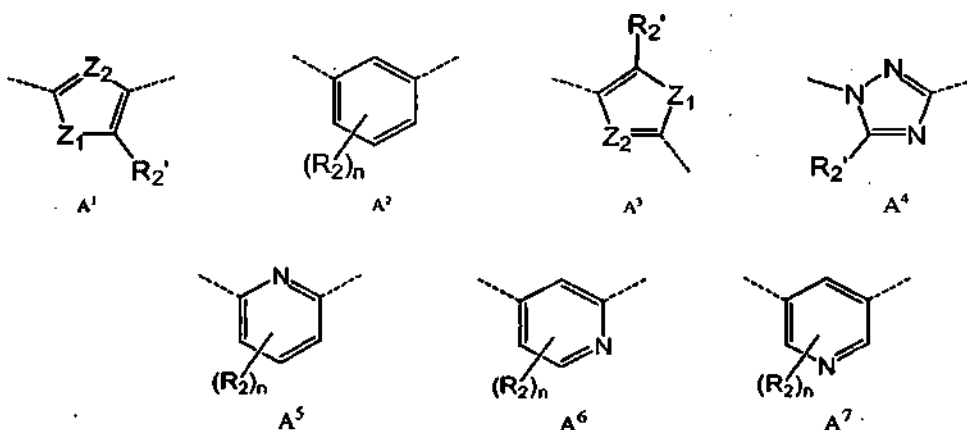
En particular, los antagonistas de molécula pequeña que pueden usarse para el tratamiento de los pacientes identificados mediante el método diagnóstico de la invención incluyen los compuestos que tienen la fórmula general I:



I

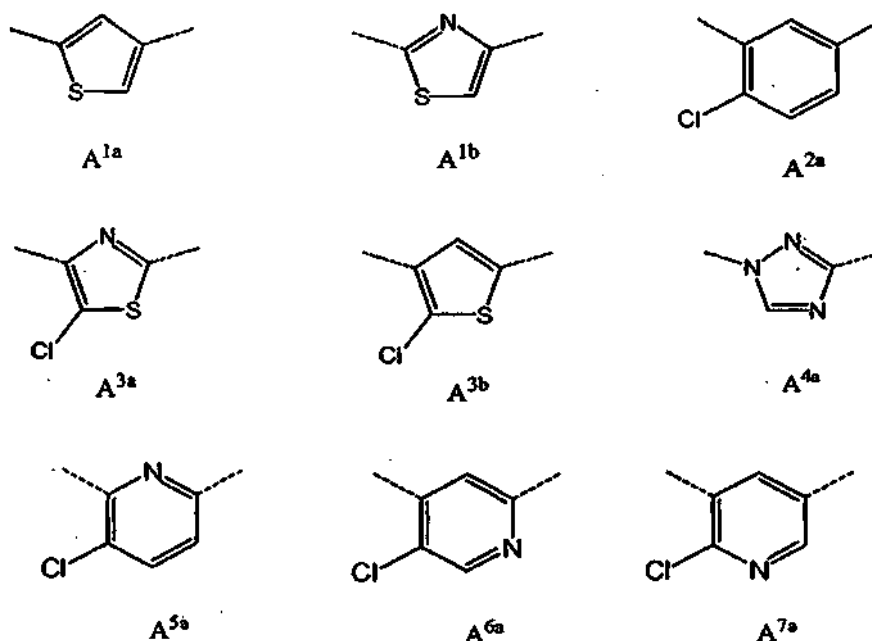
en la que A, X, Y, R_1 , R_2 y R_3 son según se han definido en el presente documento.

A es un anillo de carbociclo o de heterociclo sustituido con entre 0 y 3 (por ejemplo, n es 0 - 3) grupos R_2 seleccionados de entre el grupo que consiste en halógeno, hidroxilo, alquilo, acilo o alcoxi, cada uno opcionalmente sustituido con hidroxilo, halógeno, amino, nitro, alquilo, acilo, alquilsulfonilo o alcoxi. En una forma de realización en particular, A es arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido. En una forma de realización en particular, A es benceno, tiofeno, tiazol, imidazol, pirrol, N-alquil pirrol, piridina, pirazol o N-alquilo pirazol opcionalmente sustituido. En una forma de realización en particular, A es un anillo seleccionado de entre el grupo que consiste en A^1 , A^2 , A^3 , A^4 , A^5 , A^6 y A^7 :



- 5 en las que Z_1 es O, S o NR_5 en la que R_5 es H o alquilo; Z_2 es CH, CR_2 o N; R_2 es halógeno, hidroxilo, alquilo, acilo o alcoxi cada uno opcionalmente sustituido con hidroxilo, halógeno, amino, nitro, alquilo, acilo, alquilsulfonilo o alcoxi; R_2 es H, halógeno, hidroxilo, alquilo, acilo o alcoxi cada uno opcionalmente sustituido con hidroxilo, halógeno, amino, nitro, alquilo, acilo, alquilsulfonilo o alcoxi; y n es 0 - 3. En una forma de realización en particular, A es el anillo de la fórmula A^1 . En una forma de realización en particular, A es el anillo de la fórmula A^1 en la que Z_1 es S y Z_2 es CH o N. En otra forma de realización, A es el anillo de la fórmula A^1 en la que Z_1 es S y Z_2 es CH, es decir, tiofeno. En otra forma de realización, A es el anillo de la fórmula A^1 en la que R_2 es H. En una forma de realización, A es el anillo de la fórmula A^1 en la que R_2 es metilo. En otra forma de realización, A es el anillo A^1 en la que R_2 es metilo. En una forma de realización en particular, A es el anillo A^2 . En otra forma de realización, A es el anillo de la fórmula A^1 en la que R_2 puede estar ausente, es decir, n es 0. En otra forma de realización, n es 1 y R_2 es Cl. En otra forma de realización en particular, A es el anillo de la fórmula A^3 . En una forma de realización, A es un anillo de fórmula A^3 en la que Z_1 es S y Z_2 es N, es decir, un tiazol. En otra forma de realización, A es un anillo de fórmula A^3 en la que Z_1 es S, Z_2 es N y R_2' es Cl. En otra forma de realización, A es un anillo de fórmula A^3 en la que Z_1 es S, Z_2 es CH (es decir, tiofeno) y R_2' es Cl.

- 20 En una forma de realización en particular A es el anillo A^{1a} , A^{1b} , A^{2a} , A^{3a} , A^{3b} , A^{4a} , A^{5a} , A^{6a} , A^{7a} :



- 25 En una forma de realización en particular, A es el anillo de la fórmula A^{1a} . En otra forma de realización, A es el anillo de la fórmula A^{1b} . En otra forma de realización, A es el anillo de la fórmula A^{2a} . En otra forma de realización, A es el anillo de la fórmula A^{3a} . En otra forma de realización, A es el anillo de la fórmula A^{3b} . En otra forma de realización, A es el anillo de la fórmula A^{4a} .

- 30 X es alquilenos, $NR_4C(O)$, $NR_4C(S)$, $N(C(O)R_1)C(O)$, NR_4SO , NR_4SO_2 , $NR_4C(O)NH$, $NR_4C(S)NH$, $C(O)NR_4$, $C(S)NR_4$, NR_4PO o $NR_4PO(OH)$ en las que R_4 es H o alquilo. En una forma de realización en particular, X es $NR_4C(O)$ que forma un enlace amida entre el anillo A y R_1 . En otra forma de realización, X es $N_4C(S)$, que forma un enlace

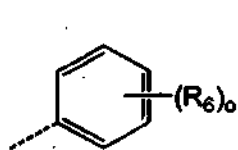
tioamida entre el anillo A y R₄. En otra forma de realización, X es NR₄C(O)NH que forma un enlace urea entre el anillo A y R₄. En otra forma de realización, X es NR₄C(S)NH que con NR₂ forma un enlace tiourea entre el anillo A y R₁. En otra forma de realización X es N(C(O)R₁)C(O) es decir, un nitrógeno con los grupos - C(O)R₁ pendientes del mismo.

5 Y está ausente, es CHR₄, O, S, SO, SO₂ o NR₄ en la que R₄ es según se ha definido en el presente documento. En una forma de realización en particular, Y es CHR₄. En una forma de realización en particular, Y es NR₄. En una forma de realización en particular Y es O. En una forma de realización en particular, Y es S. En una forma de realización en particular, Y es SO. En una forma de realización en particular, Y es SO₂. En otra forma de realización,
10 Y está ausente, es decir, el anillo A está unido directamente al anillo de piridilo en la posición 2.

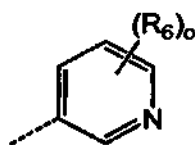
R₁ se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo, un carbociclo o un heterociclo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con hidroxilo, halógeno, amino, carboxilo, amidino, guanidino, carbonilo (es decir, =O), nitro, ciano, acilo, alquilo, haloalquilo, sulfonilo, sulfinilo, alcoxi, alquiltio, carbamoilo, acilamino, sulfamoilo, sulfonamida, un carbociclo o un heterociclo; en los que dichos sustituyentes amino, amidino, alquilo, acilo, sulfonilo, sulfinilo, alcoxi, alquiltio, carbamoilo, acilamino, sulfamoilo, sulfonamida, carbociclo y heterociclo están
15 opcionalmente sustituidos con halógeno, haloalquilo, hidroxilo, carboxilo, carbonilo, o un amino, alquilo, alcoxi, acilo, sulfonilo, sulfinilo, fosfinato, carbociclo o heterociclo que está opcionalmente sustituido con hidroxilo, carboxilo, carbonilo, amino, halógeno, haloalquilo, alquilo, alcoxi, alquiltio, sulfonilo, sulfinilo, acilo, un carbociclo o un heterociclo.
20

En otra forma de realización R₁ se selecciona de entre el grupo que consiste en alquilo, un carbociclo o un heterociclo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con hidroxilo, halógeno, amino, carbonilo, nitro, ciano, acilo, alquilo, haloalquilo, alquilsulfonilo, alquilsulfinilo, alcoxi, alquilcarbamoilo (es decir, -CONR-alquilo en el
25 que R es H o alquilo), alcanoilamina (es decir, -NRCO-alquilo en el que R es H o alquilo), alquilsulfamoilo (es decir, -SO₂NR-alquilo en el que R es H o alquilo), alquilsulfonamida (es decir, -NR-SO₂-alquilo en el que R es H o alquilo), un carbociclo o un heterociclo; en los que dichos sustituyentes amino, alquilo, acilo, alquilsulfonilo, alquilsulfinilo, alcoxi, alquilcarbamoilo, alcanoilamina, alquilsulfamoilo, alquilsulfonamida, carbociclo y heterociclo están
30 opcionalmente sustituidos con amino, halógeno, hidroxilo, carbonilo, o un carbociclo o un heterociclo que está opcionalmente sustituido con hidroxilo, amino, halógeno, haloalquilo, alquilo, alcoxi o acilo.

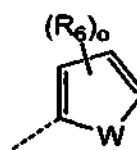
En una forma de realización en particular, R₁ es un arilo o un heteroarilo opcionalmente sustituido. En una forma de realización en particular, R₁ es un grupo fenilo opcionalmente sustituido. En forma de realización en particular, R₁ es un grupo piridina opcionalmente sustituido. En una forma de realización en particular R₁ es de la fórmula IIa, IIb, IIc,
35 II d, II e, II f, II g, II h, II i, II j, II k, III, II m, II n o II o:



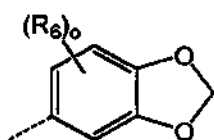
IIa



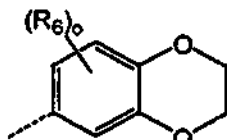
IIb



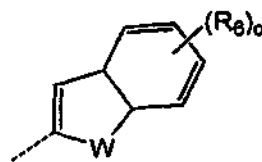
IIc



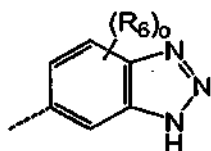
IIId



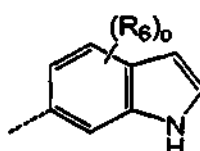
IIe



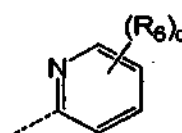
IIIf



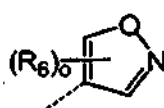
IIIG



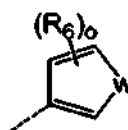
IIHg



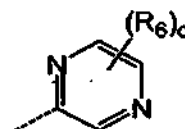
IIi



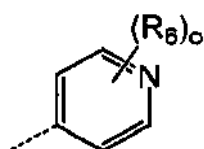
IIj



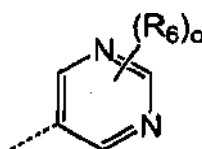
IIk



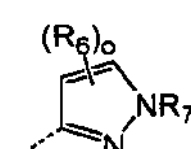
IIl



IIIm



IIIn



IIo

en las que W es O, S o NR₇ en la que R₇ es H, alquilo, acilo, un carbociclo o un heterociclo en el que dicho alquilo, acilo, carbociclo y heterociclo están cada uno opcionalmente sustituido con 1 - 3 amino, halógeno, hidroxilo y haloalquilo; o es 0 - 3. En una forma de realización en particular, W es S.

R₆ en cada caso es independientemente hidroxilo, halógeno, amino, carboxilo, amidino, guanidino, carbonilo, nitro, ciano, acilo, alquilo, haloalquilo, sulfonilo, sulfinilo, alcoxi, alquiltio, carbamoilo, acilamino, sulfamoilo, sulfonamida, un carbociclo o un heterociclo; en los que dicho sustituyente amino, amidino, alquilo, acilo, sulfonilo, sulfinilo, alcoxi, alquiltio, carbamoilo, acilamino, sulfamoilo, sulfonamida, carbociclo y heterociclo está opcionalmente sustituido con halógeno, haloalquilo, hidroxilo, carboxilo, carbonilo, o un amino, alquilo, alcoxi, acilo, sulfonilo, sulfinilo, fosfinato, carbociclo o heterociclo que está opcionalmente sustituido con hidroxilo, carboxilo, carbonilo, amino, halógeno, haloalquilo, alquilo, alcoxi, alquiltio, sulfonilo, sulfinilo, acilo, un carbociclo o un heterociclo.

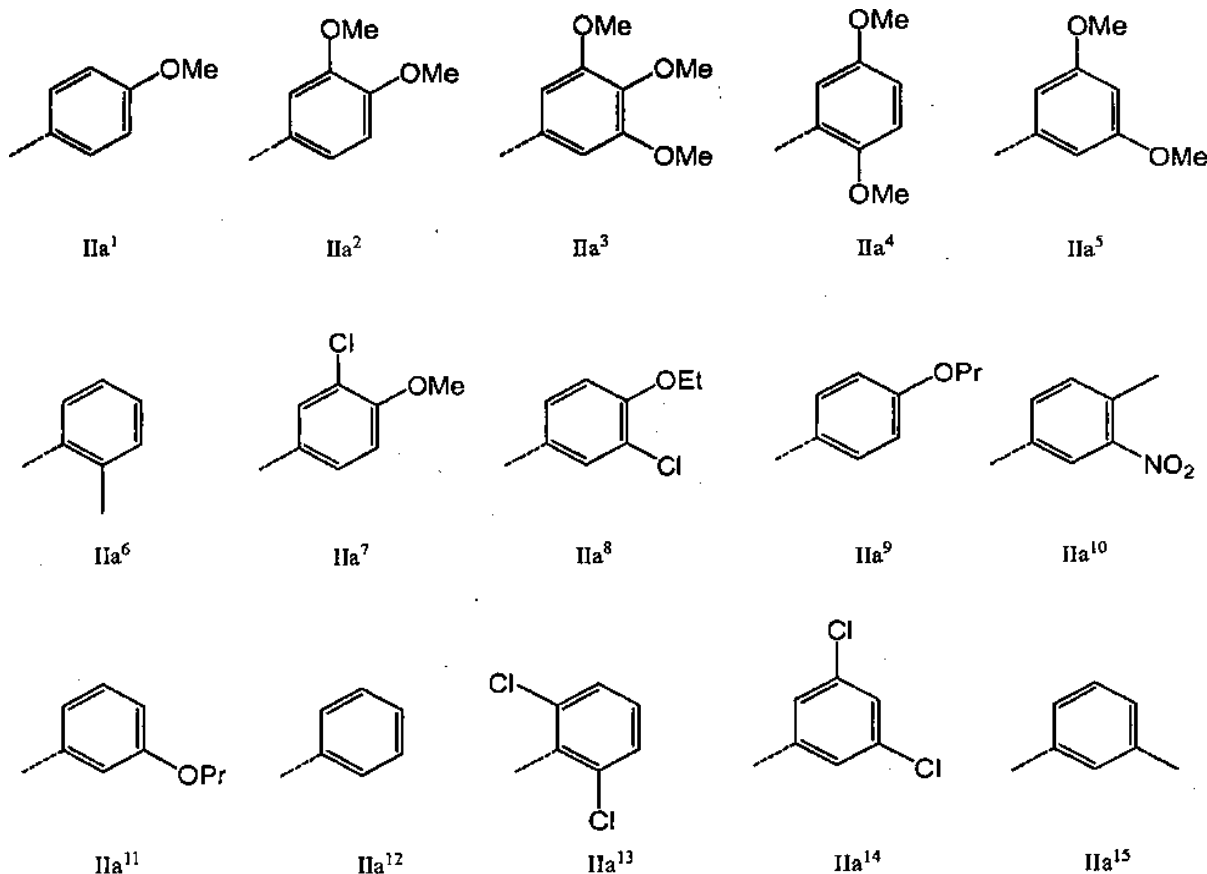
En una forma de realización en particular, R₆ en cada caso es independientemente hidroxilo, halógeno, amino, carbonilo, nitro, ciano, acilo, alquilo, sulfonilo, alquilsulfonilo, alquilsulfinilo, alcoxi, alquilcarbamoilo, alcanoilamina, alquilsulfamoilo, alquilsulfonamida, un carbociclo o un heterociclo; en los que dicho sustituyente amino, alquilo, carbonilo, acilo, sulfonilo, alquilsulfonilo, alquilsulfinilo, alcoxi, alquilcarbamoilo, alcanoilamina, alquilsulfamoilo, alquilsulfonamida, carbociclo y heterociclo está opcionalmente sustituido con amino, halógeno, hidroxilo, carbonilo, o un carbociclo o un heterociclo que está opcionalmente sustituido con hidroxilo, amino, halógeno, haloalquilo, alquilo, alcoxi o acilo.

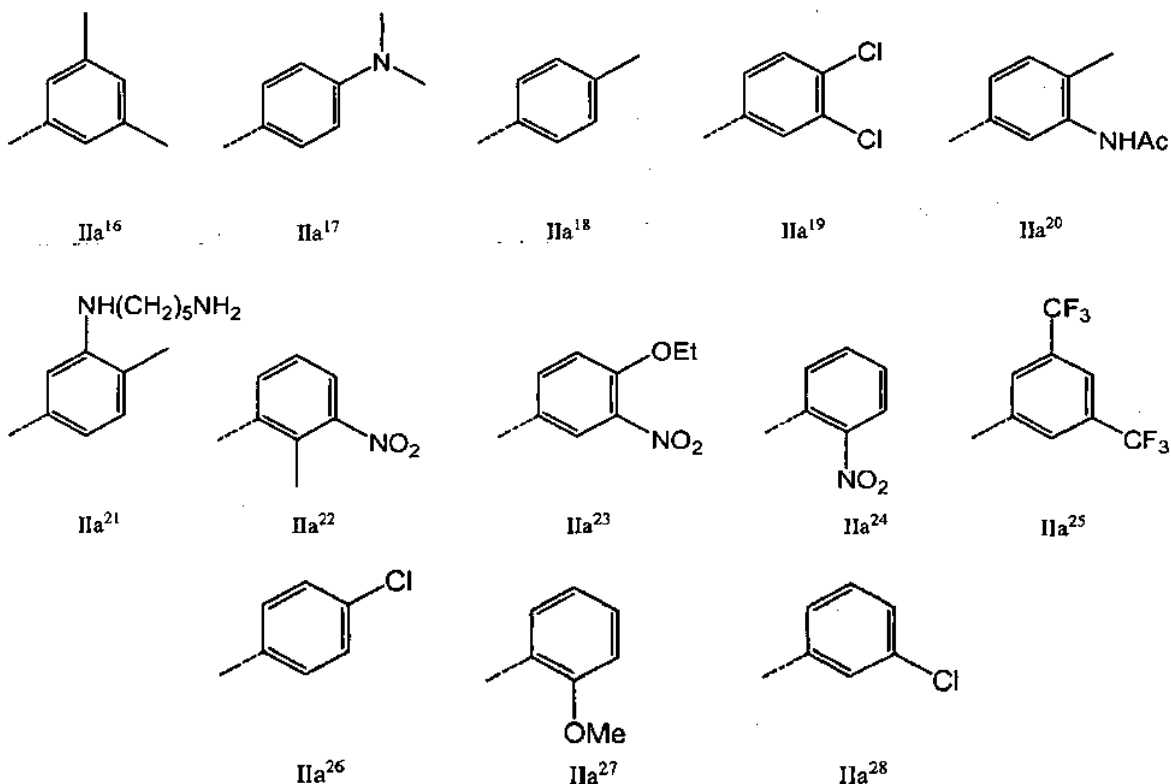
En una forma de realización en particular, R₆ es independientemente en cada caso alquilo opcionalmente sustituido

(por ejemplo, metilo, trifluorometilo, dimetilaminometilo, piperidinilmetilo, morfolinometilo, tiomorfolinometilo); halógeno (por ejemplo, cloro); alcoxi (por ejemplo, metoxi); carbonilo (por ejemplo, morfolinocarbonilo, acetilo); un heterociclo (por ejemplo, morfolino, N-metil-piperazin-4-ilo, N-acetil-piperazin-4-ilo, 1H-1,2,4-triazol); alquilamino (por ejemplo, i-butilamino, bencilamino, hidroxietilamino, metoxietilamino, dimetilaminoetilamino, morfolinoetilamino, morfolinopropilamino, propilamino sustituido con pirrolidin-2-ona, imidazol-etilamino, imidazol-propilamino); arilamino (por ejemplo, fenilamino); alquilcarbamoilo (por ejemplo, dimetilcarbamoilo, i-butilaminocarbonilo); alquilsulfamoilo (por ejemplo, propilaminosulfonilo, i-butilaminosulfonilo, dimetilaminosulfonilo, dimetilaminoetilo hidroxietilaminosulfonilo, metoxietilaminosulfonilo, metoxipropilaminosulfonilo, metilsulfonietilaminosulfonilo, propilaminosulfonilo sustituido con imidazol, hidroxipropilaminosulfonilo, 2-hidroxipropilaminosulfonilo); o sulfonilo (por ejemplo, metilsulfonilo, etilsulfonilo, aminosulfonilo, dimetilaminopropilsulfonilo, N-metil-piperazin-4-il-sulfonilo, morfolino-4-il-sulfonilo, trifluorometilsulfonilo).

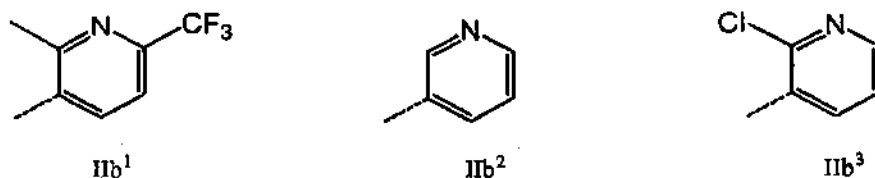
En una forma de realización en particular, R_7 es H. En otra forma de realización en particular, R_7 es acilo opcionalmente sustituido. En otra forma de realización en particular, R_7 es alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, metilo). En otra forma de realización en particular, R_7 es acilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, acetilo, benzoilo). En otra forma de realización en particular, R_7 es un grupo arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, fenilo, bencilo).

En una forma de realización en particular, R_1 es el grupo de fórmula I la. En dicha forma de realización R_6 puede ser alcoxi y o es 1, 2 o 3. Algunos grupos IIa en particular son IIa¹ - IIa²⁸:



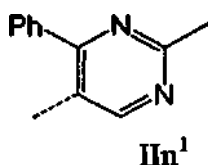


- 5 En otra forma de realización en particular, R₁ es el grupo de fórmula IIb. En dicha forma de realización R₆ puede ser alquilo o haloalquilo (por ejemplo, CF₃). Algunos grupos IIb en particular son IIb¹ - IIb³:

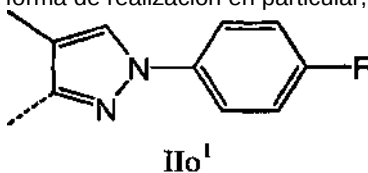


- 10 En una forma de realización en particular R₁ es el grupo de fórmula IIe. En dicha forma de realización, W puede ser S y o es O. En otra forma de realización en particular, R₁ es el grupo de fórmula IIc. En dicha forma de realización o puede ser O. En otra forma de realización en particular, R₁ es el grupo de fórmula IIe. En dicha forma de realización o puede ser O. En otra forma de realización en particular, R₁ es el grupo de fórmula IIc. En dicha forma de realización o puede ser O.

- 15 En otra forma de realización en particular, R₁ es el grupo de fórmula IIn. En dicha forma de realización, o puede ser O o 2 y R₆ puede ser alquilo o arilo. En una forma de realización en particular, el grupo IIn tiene la fórmula IIn¹:



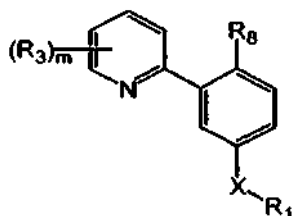
- 20 En otra forma de realización en particular, R₁ es el grupo de fórmula IIo. En dicha forma de realización, o puede ser O o 2 y R₆ puede ser alquilo o arilo. En una forma de realización en particular, el grupo IIo tiene la fórmula IIo¹:



R₂ es halógeno, hidroxilo, alquilo, acilo o alcoxi cada uno opcionalmente sustituido con hidroxilo, halógeno, amino, nitro, alquilo, acilo, alquilsulfonilo o alcoxi. n es 0 - 3, por ejemplo, 0 o 1. En una forma de realización en particular, R₂ es hidroxilo. En una forma de realización en particular, R₂ es alquilo o alquilo sustituido con halógeno, metilo o trifluorometilo. En una forma de realización en particular, R₂ es acilo, por ejemplo, alcanoílo, por ejemplo, acetilo. En una forma de realización en particular, R₂ es halógeno, por ejemplo, Cl o F. En otra forma de realización en particular, R₂ es alcoxi, por ejemplo, metoxi o etoxi.

R₃ es halógeno, hidroxilo, carboxilo, alquilo, acilo, alcoxi, alcoxycarbonilo, carbamoílo, alquilsulfuro, sulfinilo, sulfonilo, un carbociclo o un heterociclo en los que cada alquilo, acilo, alcoxi, alcoxycarbonilo, carbamoílo, alquilsulfuro, sulfinilo, sulfonilo, carbociclo y heterociclo está opcionalmente sustituido con hidroxilo, halógeno, amino, nitro, alquilo, acilo, sulfonilo o alcoxi. En una forma de realización en particular, R₃ es halógeno, hidroxilo, carboxilo, alquilo, acilo, alcoxi, alcoxycarbonilo, carbamoílo, alquilsulfuro, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, un carbociclo o un heterociclo en los que cada alquilo, acilo, alcoxi, alcoxycarbonilo, carbamoílo, alquilsulfuro, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, carbociclo y heterociclo está opcionalmente sustituido con hidroxilo, halógeno, amino, nitro, alquilo, acilo, alquilsulfonilo o alcoxi; mientras que m es entre 0 y 3. En una forma de realización en particular, R₃ es halógeno (por ejemplo, F), carboxilo, alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, metilo, hidroximetilo, dimetilaminometilo), alcoxycarbonilo (por ejemplo, metoxycarbonilo) o carbamoílo (por ejemplo, dimetilaminocarbonilo). En una forma de realización en particular m es 0, es decir, R₃ está ausente. En otra forma de realización en particular, m es 1 - 3.

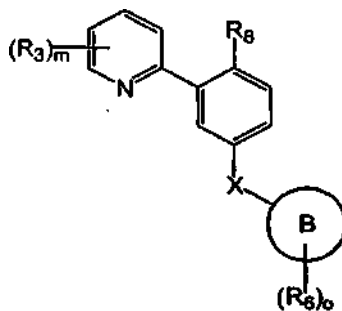
En una forma de realización en particular, los compuestos de la invención están representados por la siguiente fórmula general Ib:



Ib

en la que X, R₁, R₃ y m son como se han definido en el presente documento y R₈ es halógeno. En una forma de realización, los compuestos de la invención tienen la fórmula general Ib y X es NR₄CO. En una forma de realización adicional, los compuestos son de la fórmula Ib y R₃ es H o metilo.

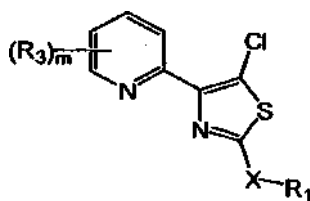
En otra forma de realización particular, los antagonistas que pueden ser usados para el tratamiento de los pacientes identificados mediante el método diagnóstico de la invención están representados por la fórmula general Ib':



Ib'

en la que X, R₃, R₆, m y o son como se han definido en el presente documento; R₈ es un halógeno; y el anillo B es un carbociclo o un heterociclo. En una forma de realización en particular, R₈ es Cl. En una forma de realización en particular, el anillo B es fenilo o piridilo. En una forma de realización en particular, X es NR₄C(O) y R₄ es como se ha definido en el presente documento.

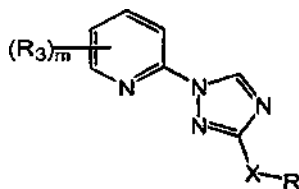
En otra forma de realización particular, los antagonistas que pueden ser usados para el tratamiento de los pacientes identificados mediante el método diagnóstico de la invención tienen la fórmula general Ic:



Ic

en la que X, R₁, R₃ y m son como se han definido en el presente documento. En una forma de realización, los antagonistas que pueden ser usados para el tratamiento de los pacientes identificados mediante el método diagnóstico de la invención tienen la fórmula general Ib y X es NR₄CO. En una forma de realización adicional, los antagonistas que pueden ser usados para el tratamiento de los pacientes identificados mediante el método diagnóstico son de la fórmula Ic y R₃ es H o metilo y m es 0 o 1.

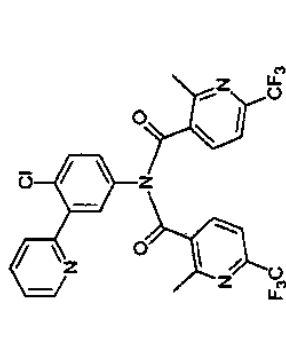
En otra forma de realización particular, los antagonistas que pueden ser usados para el tratamiento de los pacientes identificados mediante el método diagnóstico de la invención tienen la fórmula general Id:



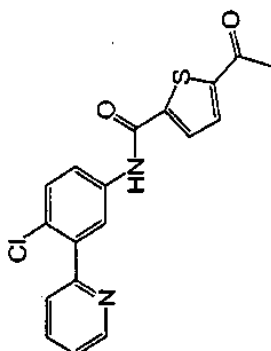
Id

en la que X, R₁, R₃ y m son como se han definido en el presente documento. En una forma de realización, los antagonistas que pueden ser usados para el tratamiento de los pacientes identificados mediante el método diagnóstico de la invención tienen la fórmula general Ib y X es NR₄CO. En una forma de realización adicional, los antagonistas que pueden ser usados para el tratamiento de los pacientes identificados mediante el método diagnóstico son de la fórmula Id y R₃ es H, Cl o trifluorometilo y m es 0 o 1.

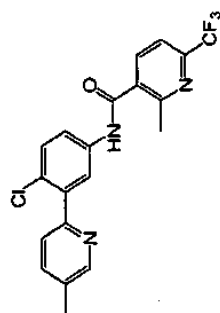
En particular, los antagonistas que pueden ser usados para el tratamiento de los pacientes identificados mediante el método diagnóstico de la invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:



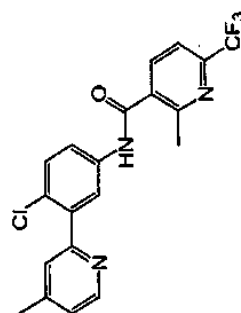
2



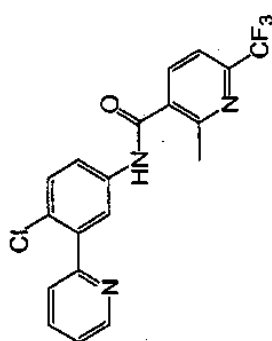
4



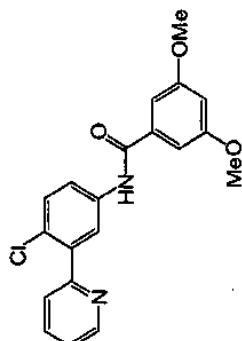
6



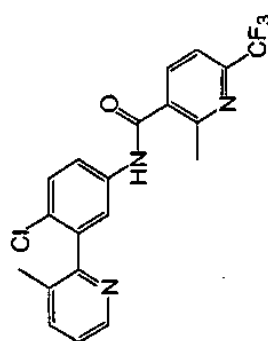
8



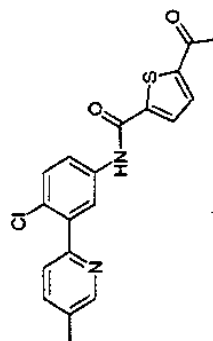
1



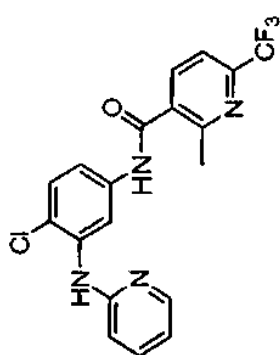
3



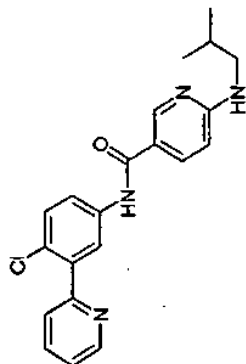
5



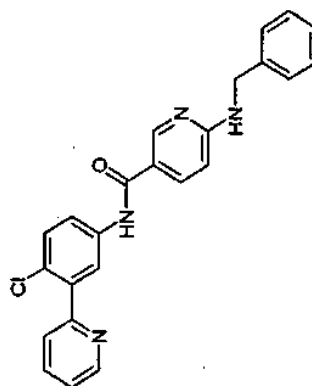
7



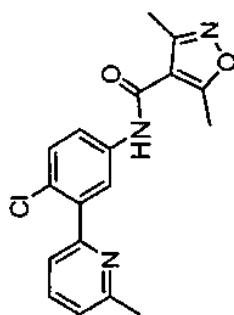
10



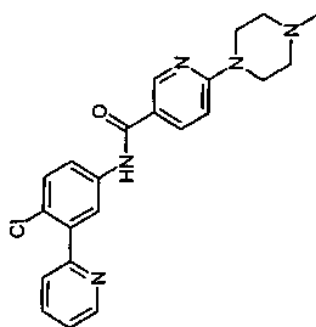
12



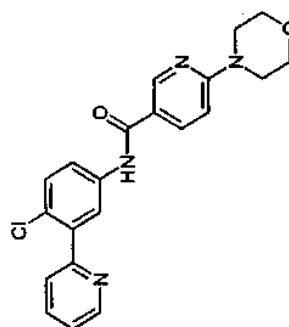
14



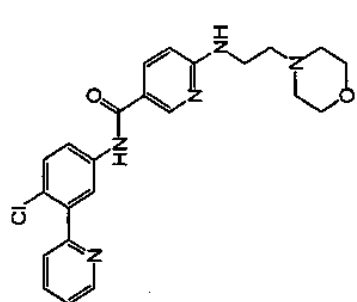
9



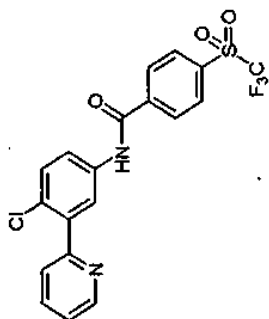
11



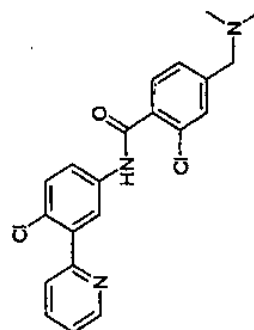
13



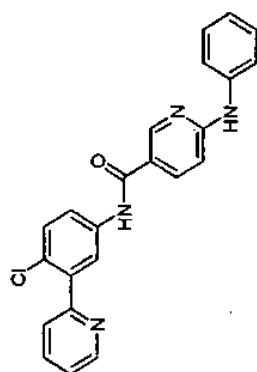
16



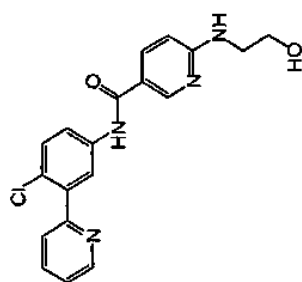
18



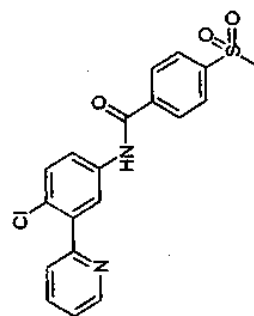
20



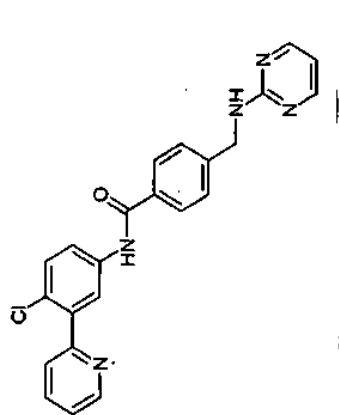
15



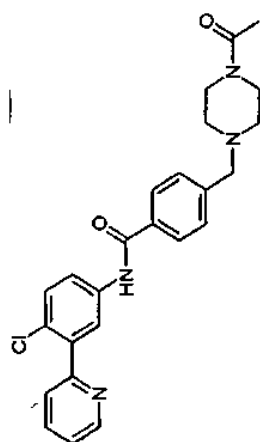
17



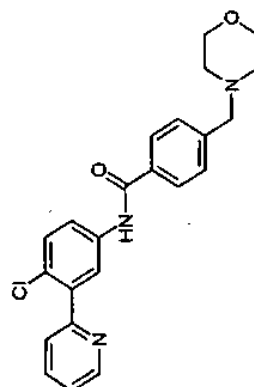
19



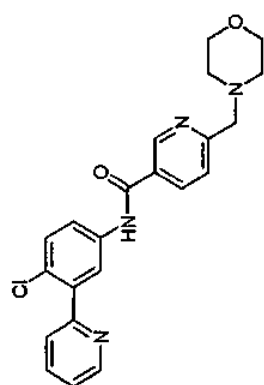
22



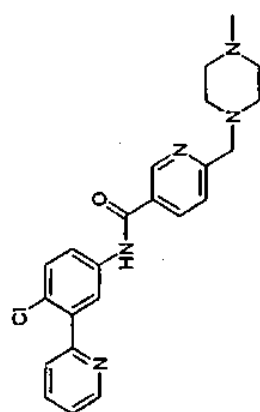
24



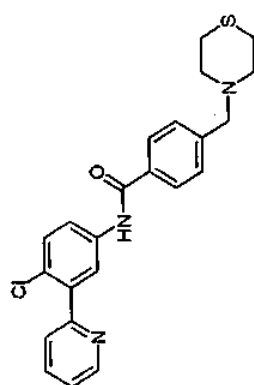
26



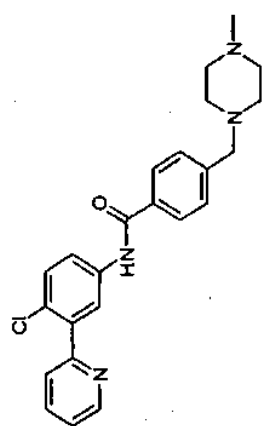
21



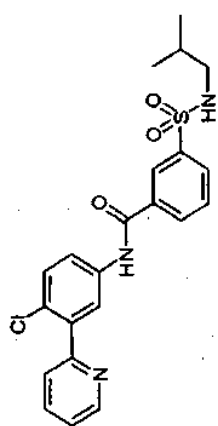
23



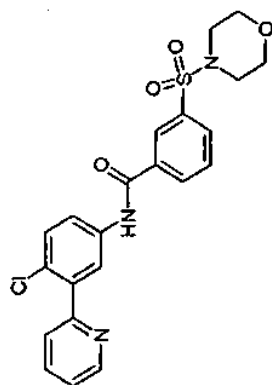
25



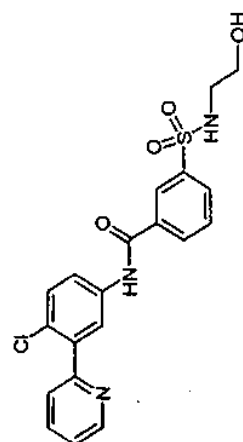
28



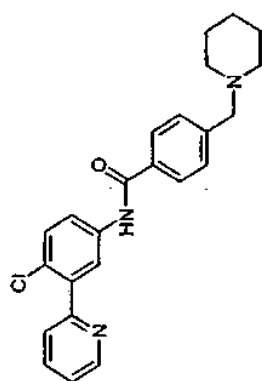
30



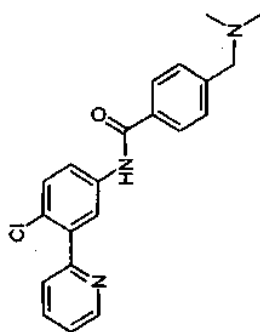
32



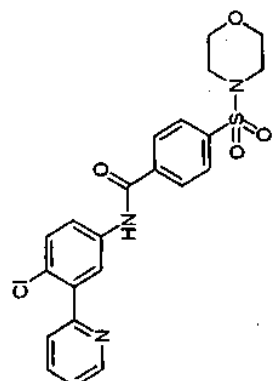
34



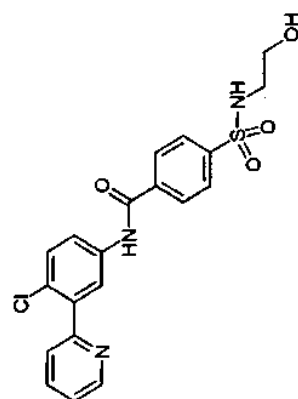
27



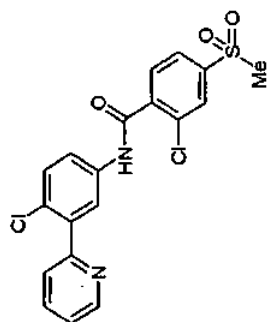
29



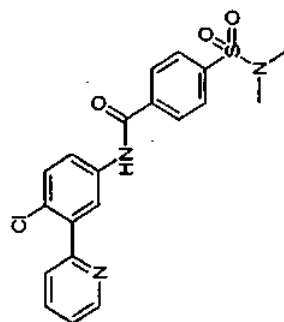
31



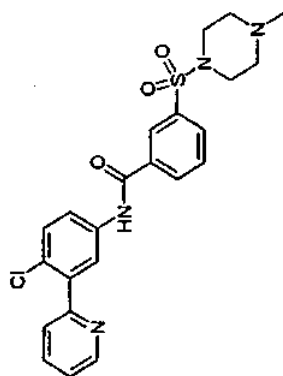
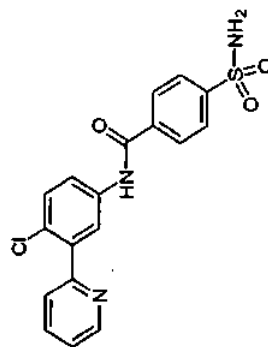
33



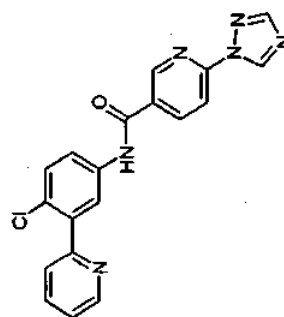
36



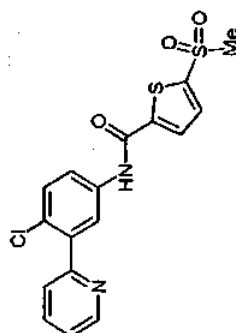
38 40

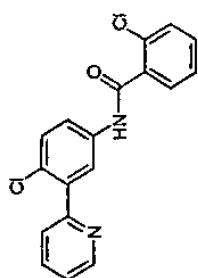


35

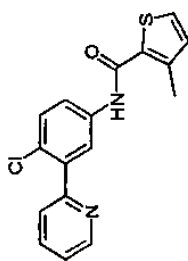


37 39

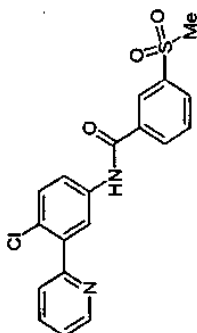




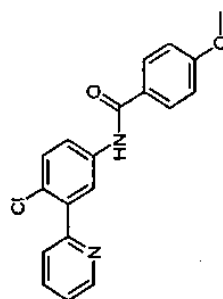
42



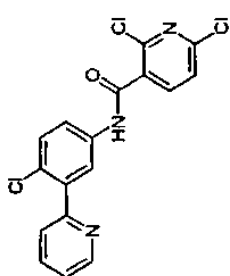
44



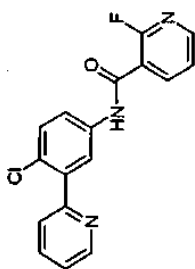
46



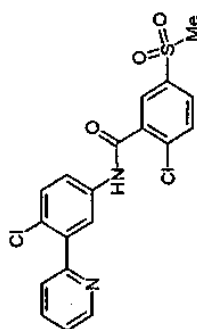
48



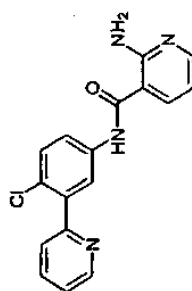
41



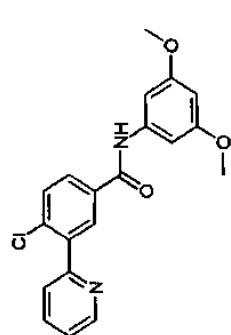
43



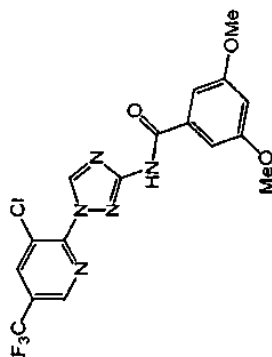
45



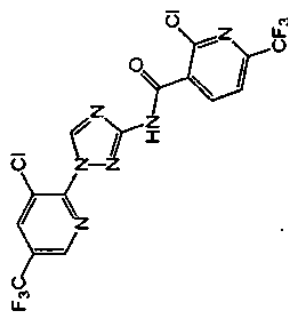
47



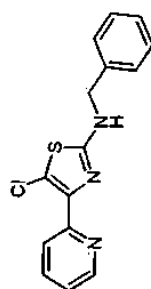
50



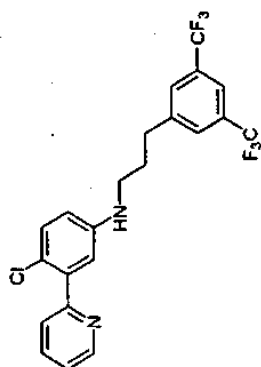
52



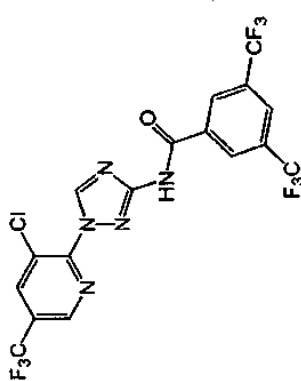
54



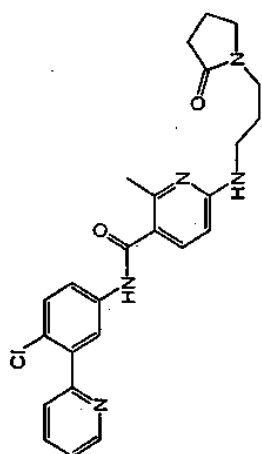
49



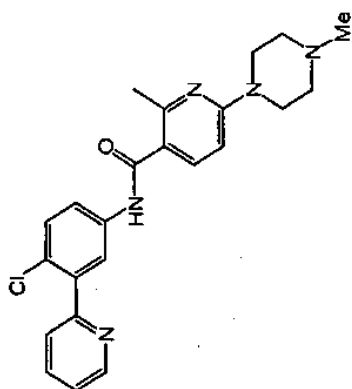
51



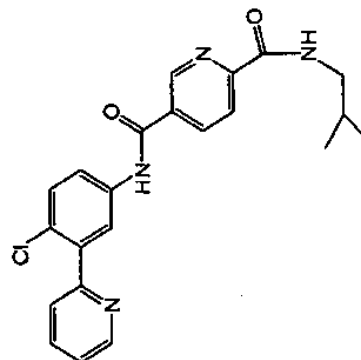
53



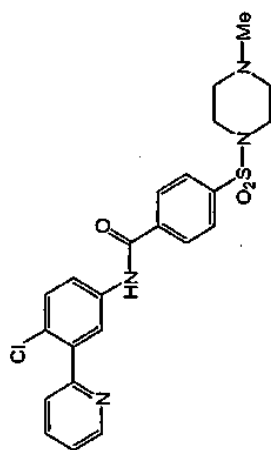
56



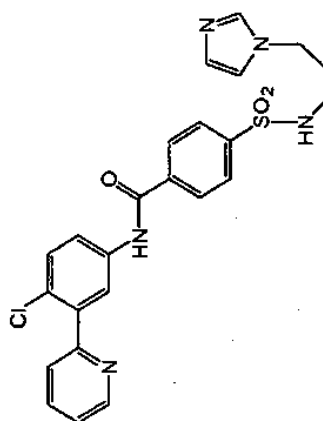
58



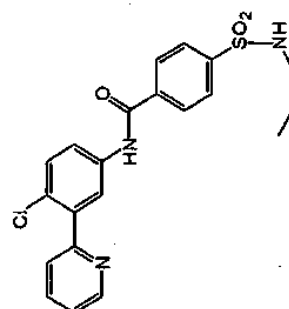
60



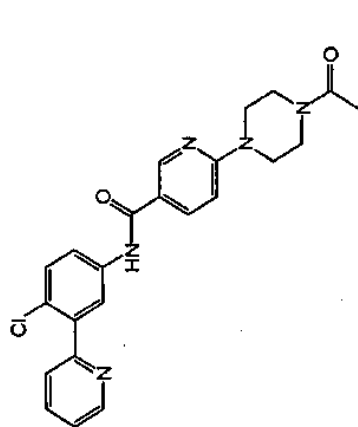
55



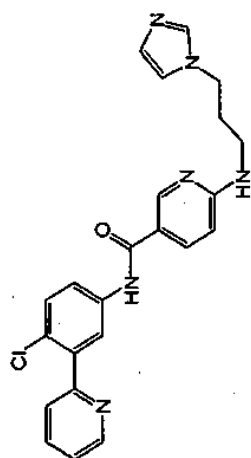
57



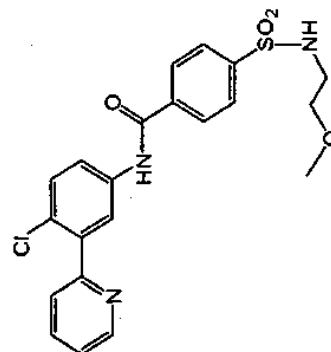
59



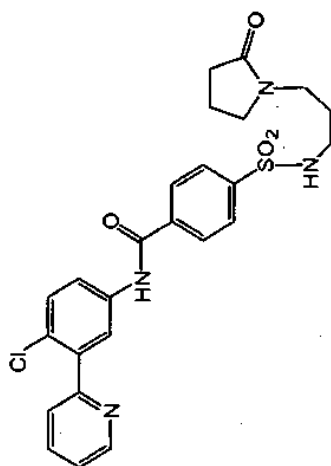
62



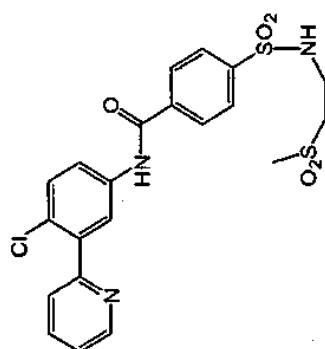
64



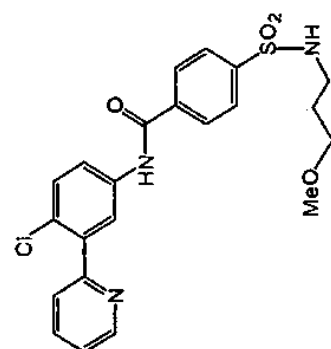
66



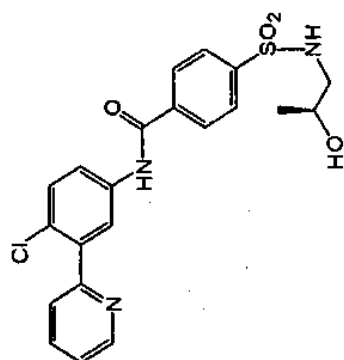
61



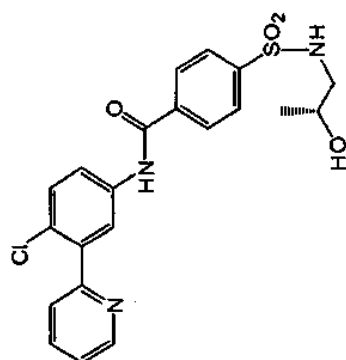
63



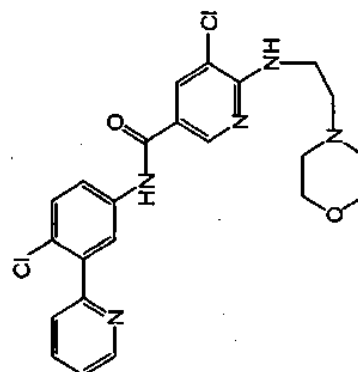
65



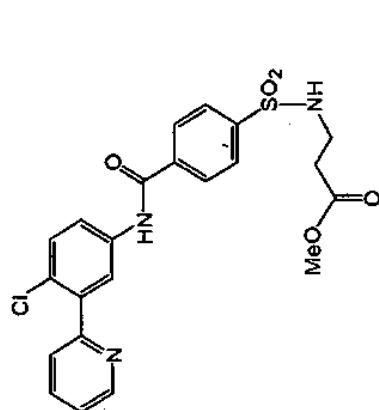
68,



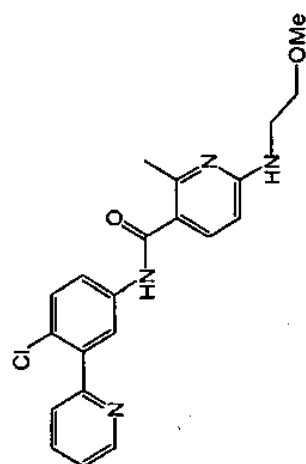
70



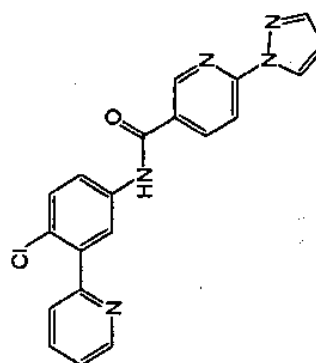
72



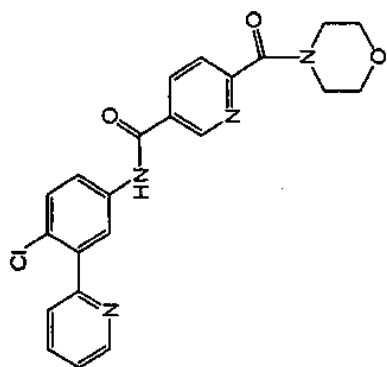
67



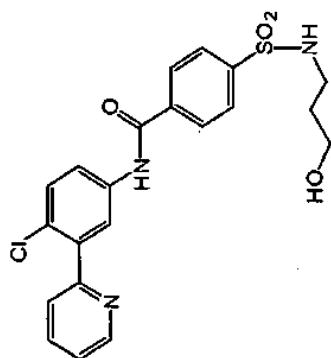
69



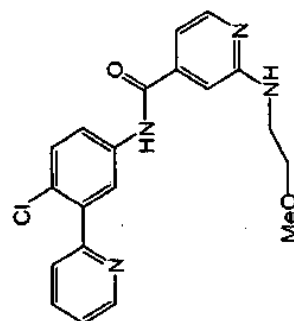
71



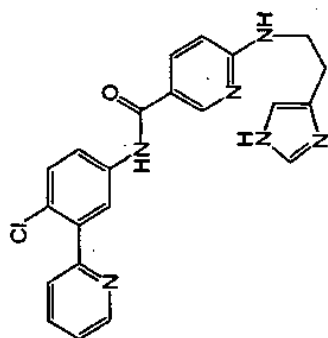
74



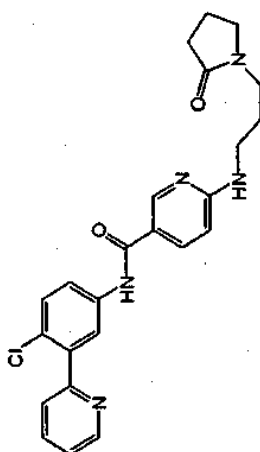
76



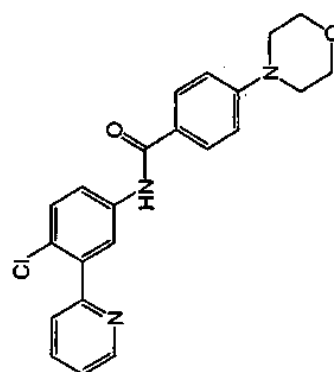
78



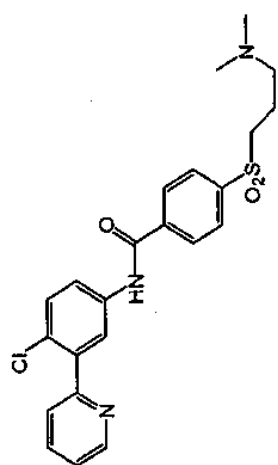
73



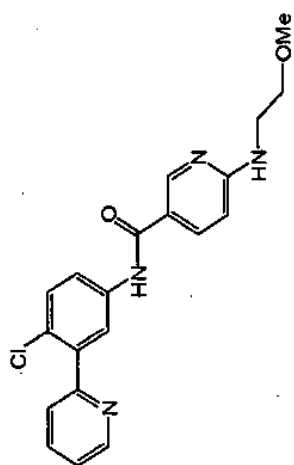
75



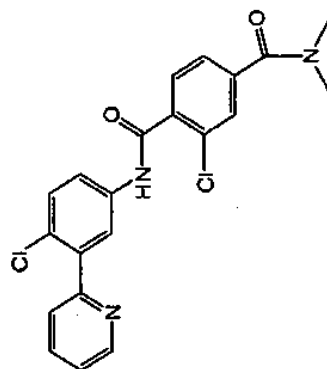
77



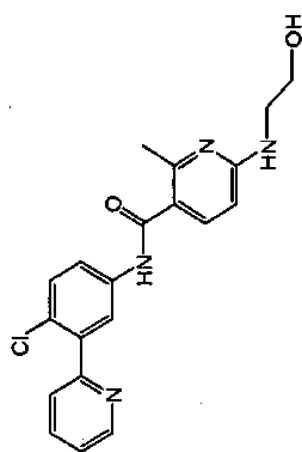
80



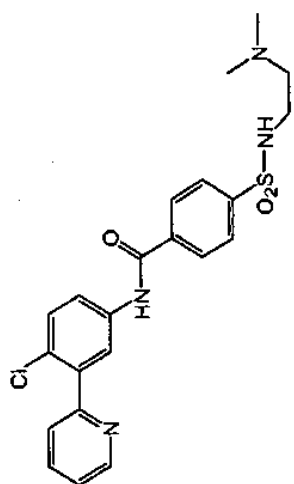
82



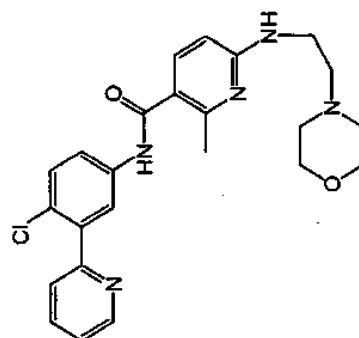
84



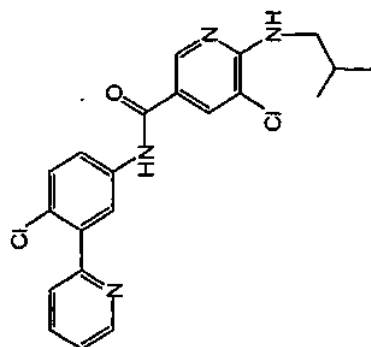
79



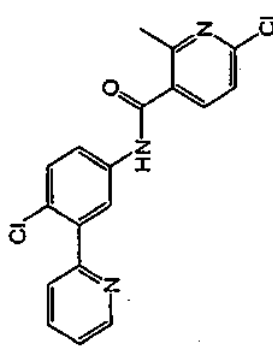
81



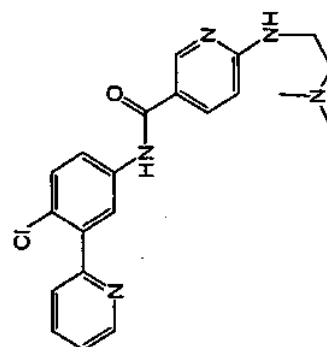
83



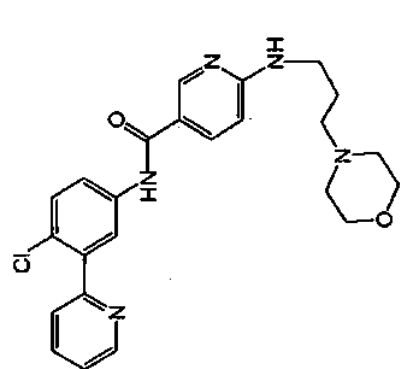
86



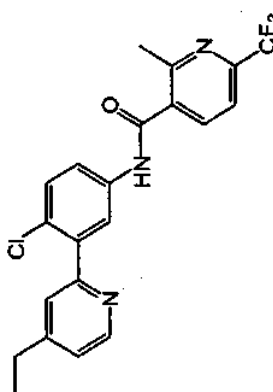
88



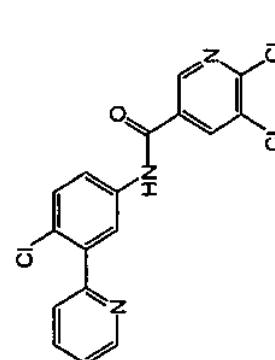
90



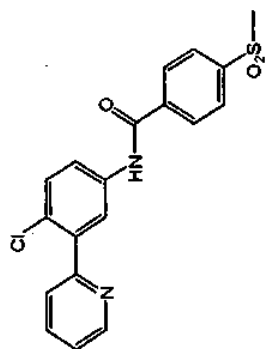
85



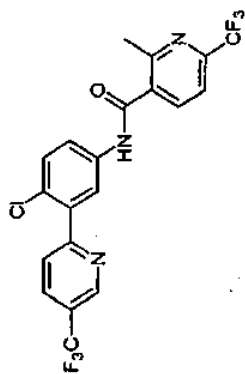
87



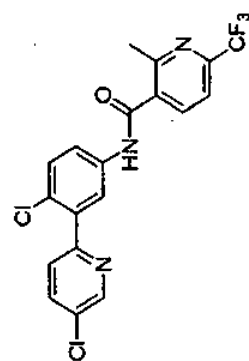
89



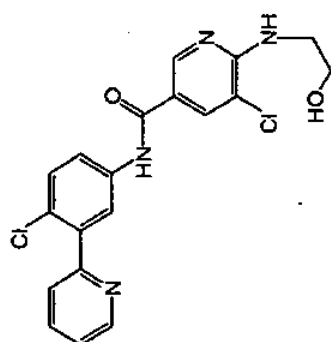
92



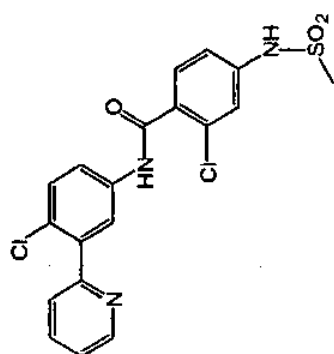
94



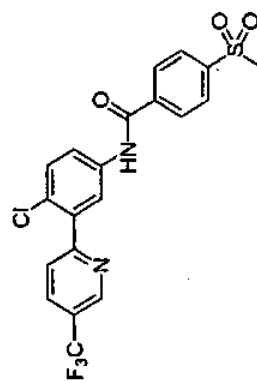
96



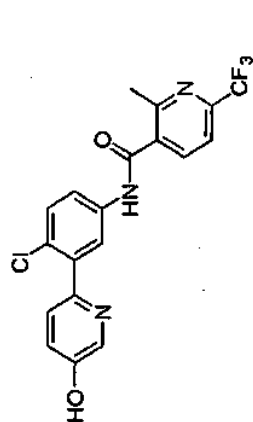
91



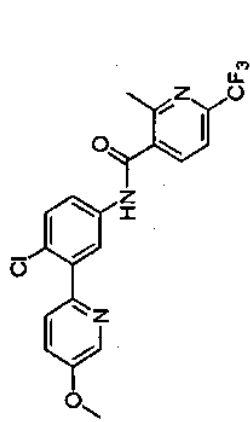
93



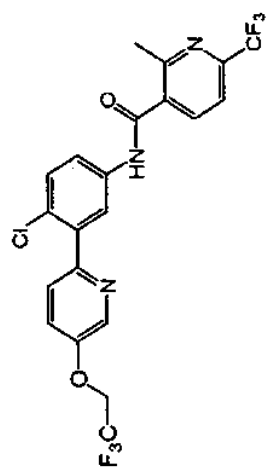
95



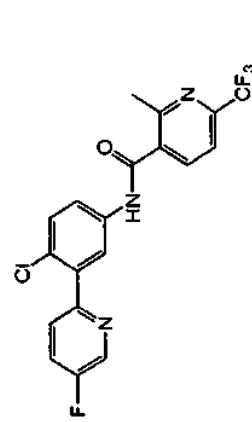
98



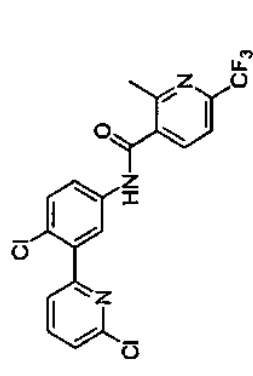
100



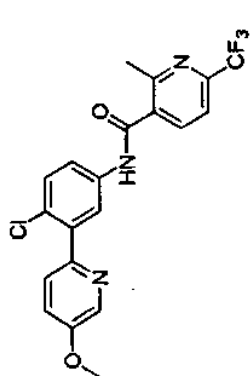
102



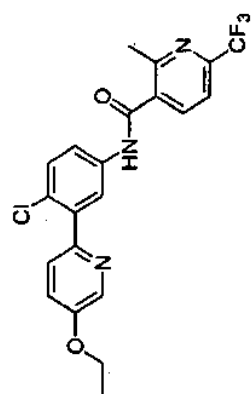
104



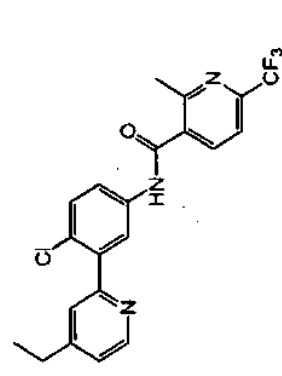
97



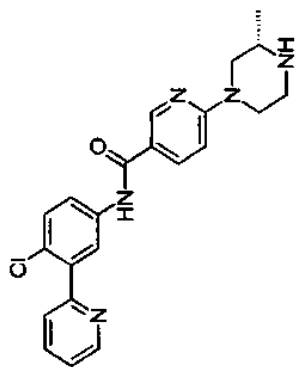
99



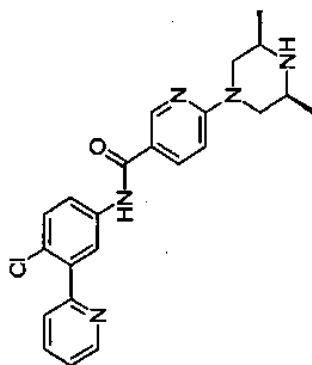
101



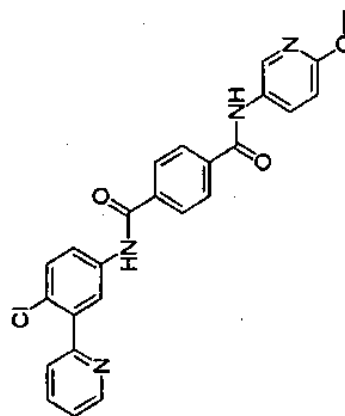
103



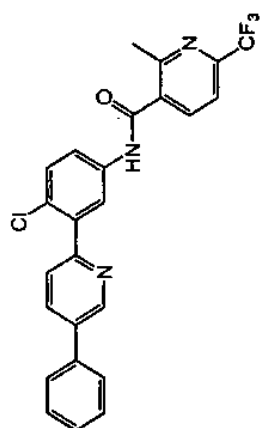
106



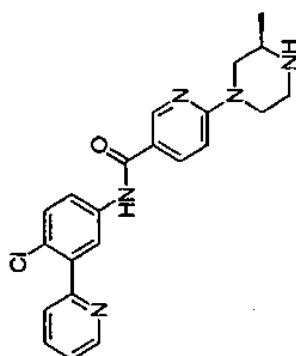
108



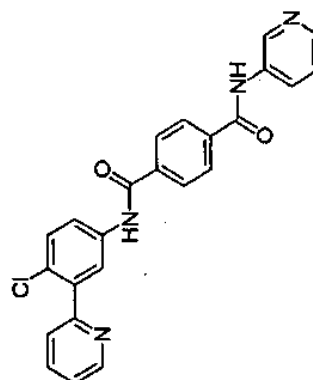
110



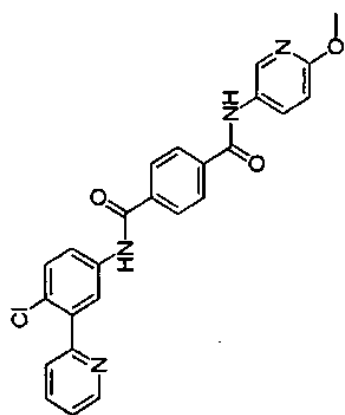
105



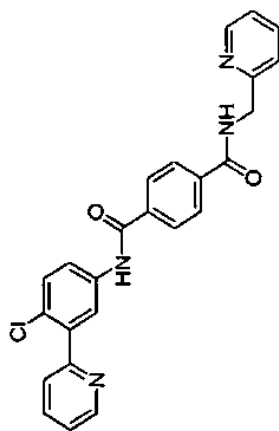
107



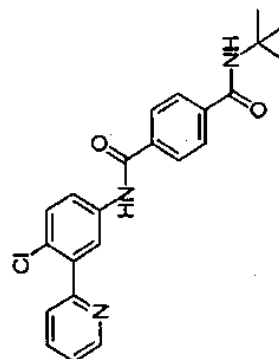
109



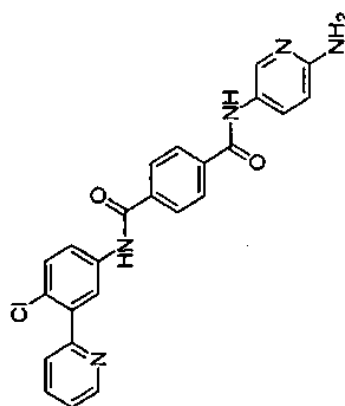
112



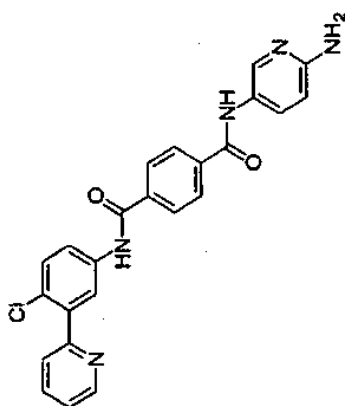
114



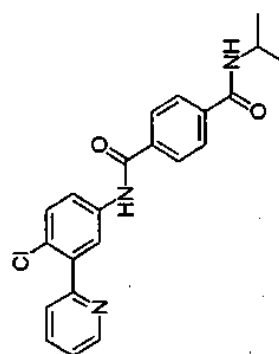
116



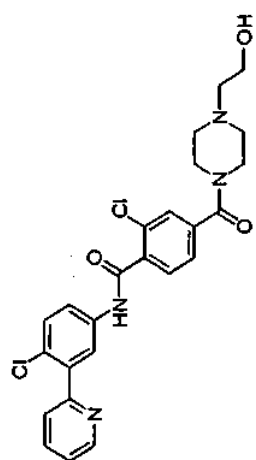
111



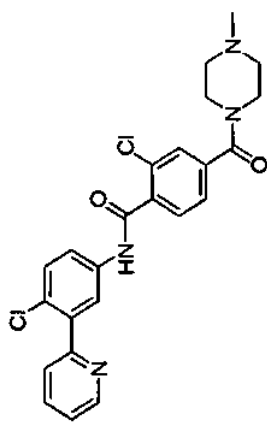
113



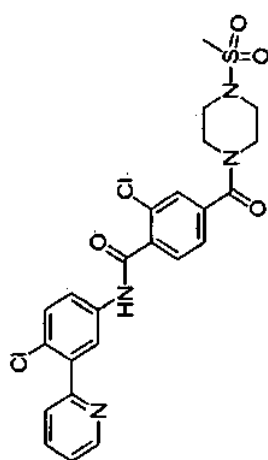
115



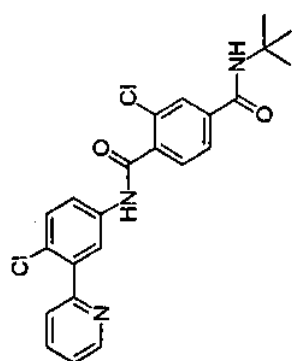
118



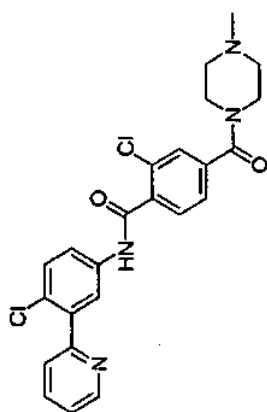
120



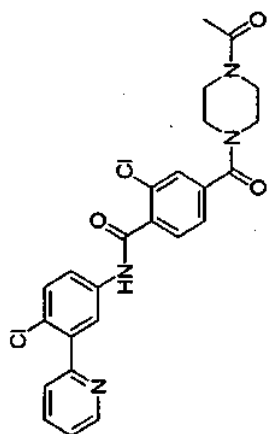
122



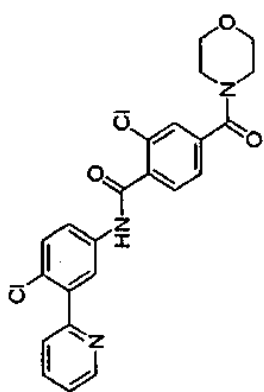
117



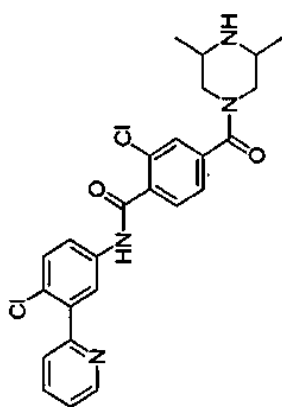
119



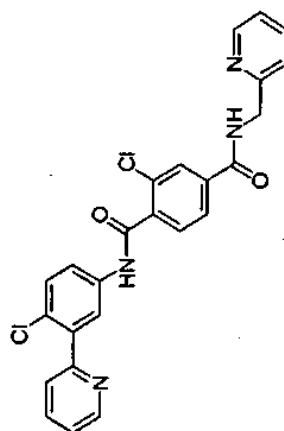
121



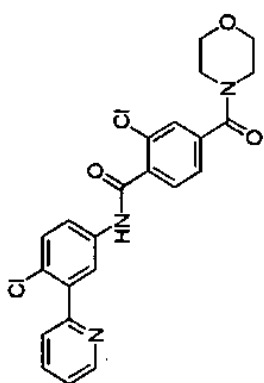
124



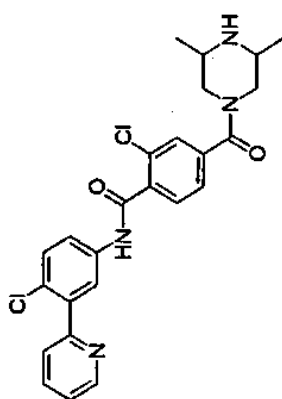
126



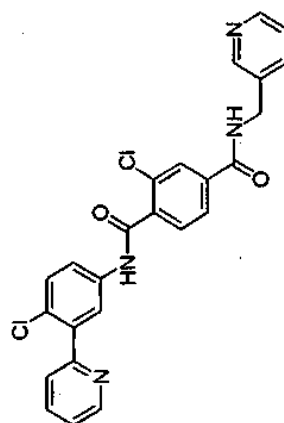
128



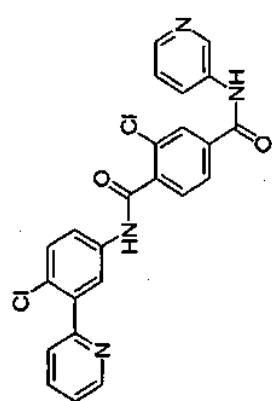
123



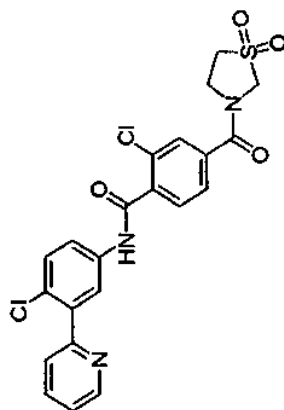
125



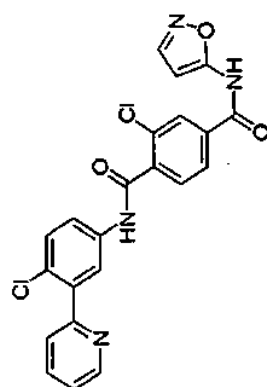
127



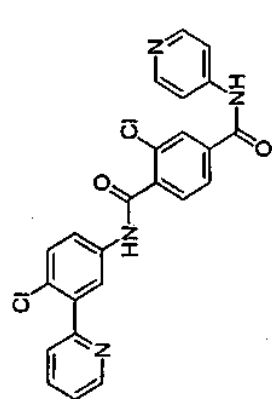
130



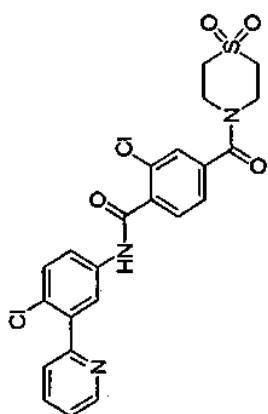
132



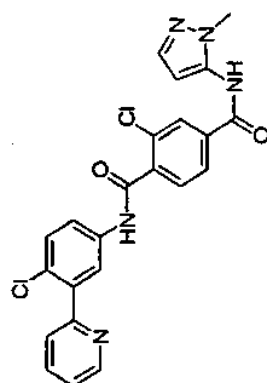
134



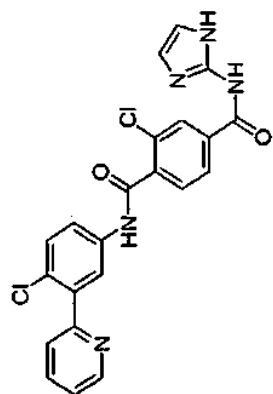
129



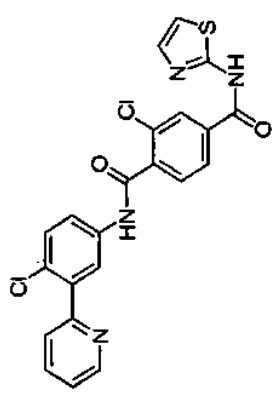
131



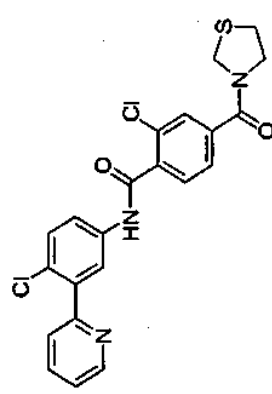
133



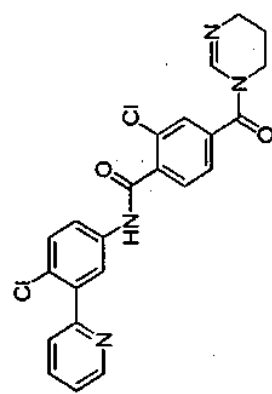
136



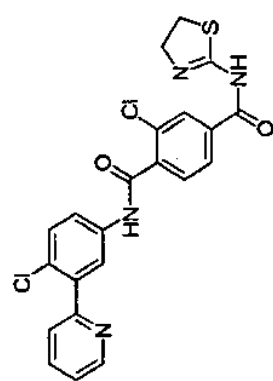
138



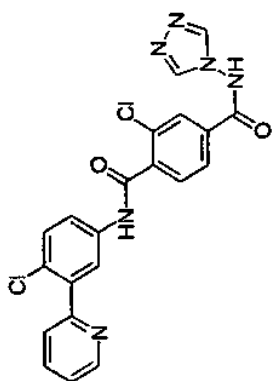
140



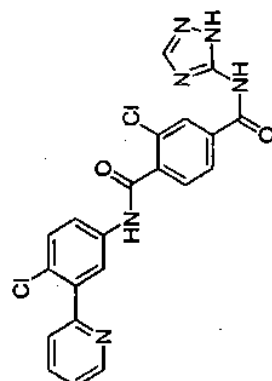
142



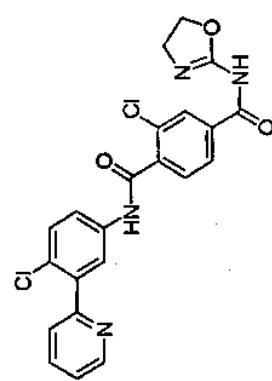
135



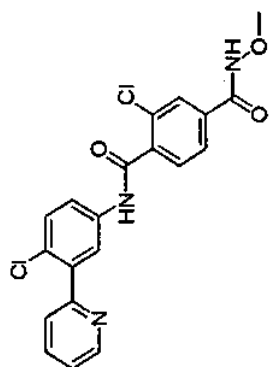
137



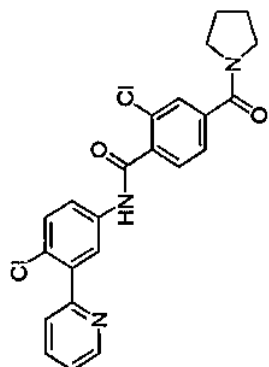
139



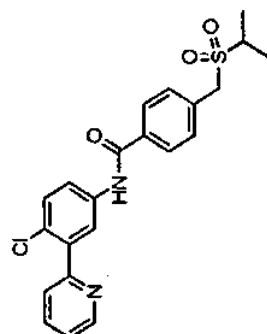
141



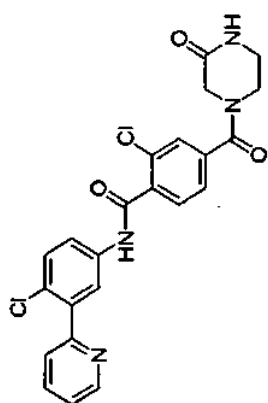
144



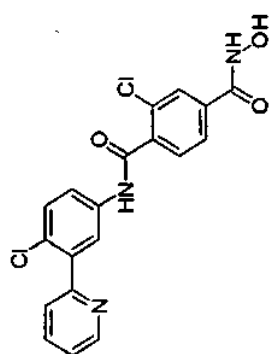
146



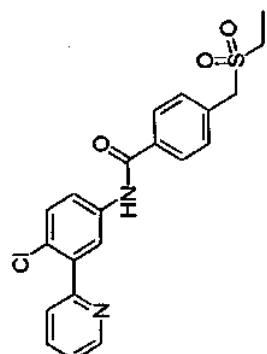
148



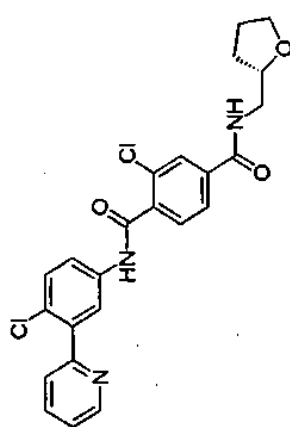
143



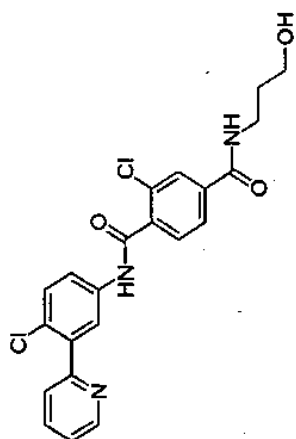
145



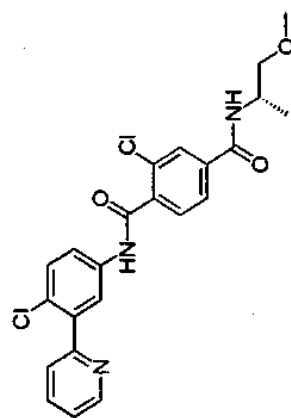
147



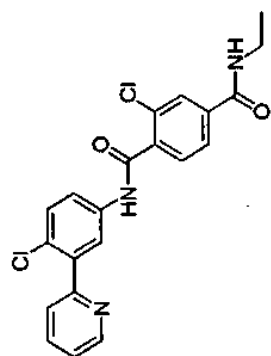
150



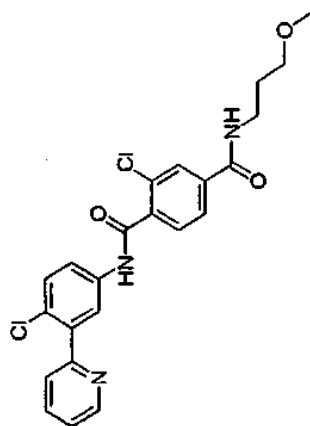
152



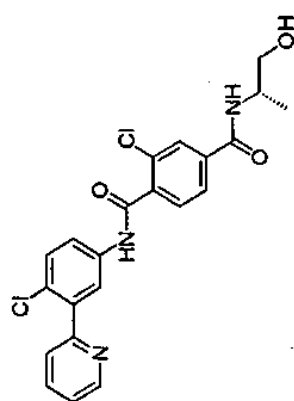
154



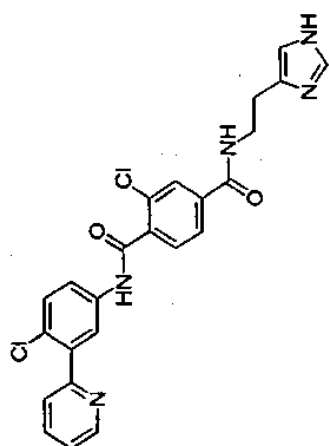
149



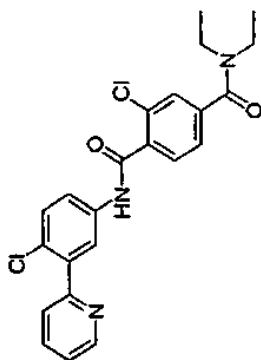
151



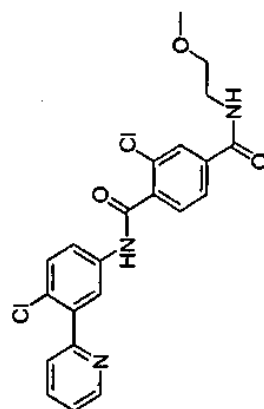
153



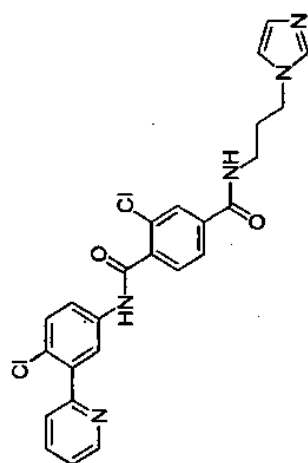
156



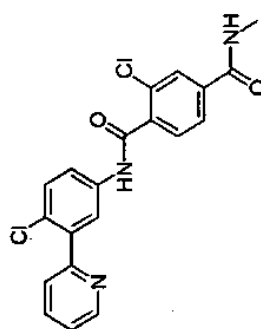
158



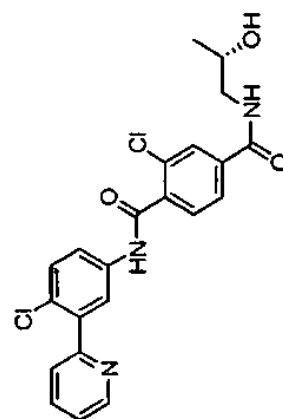
160



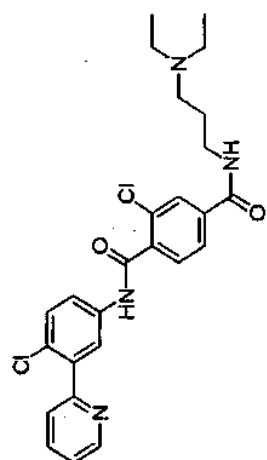
155



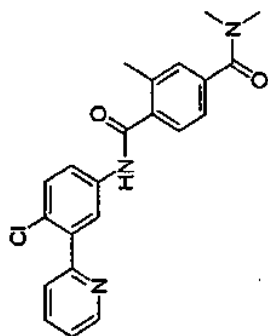
157



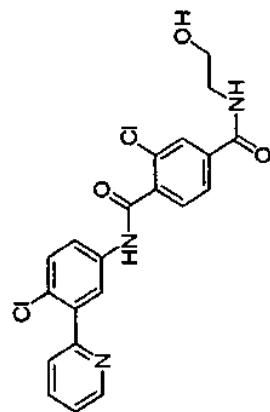
159



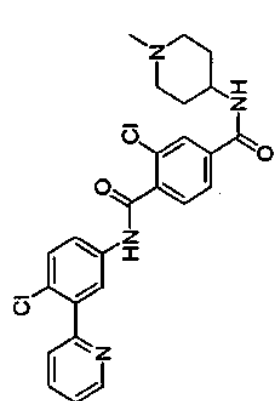
162



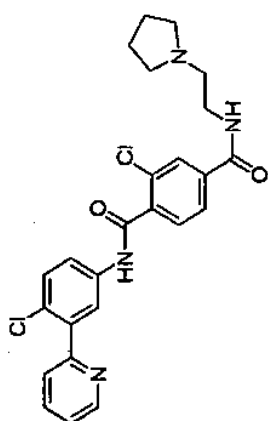
164



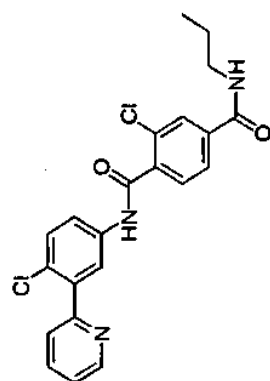
166



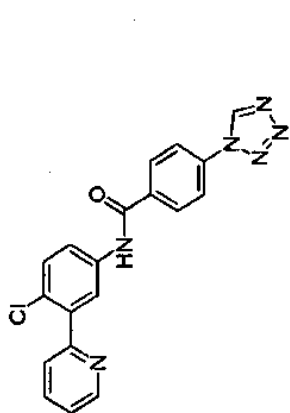
161



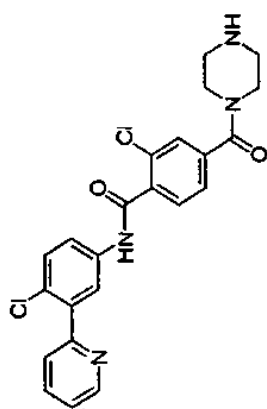
163



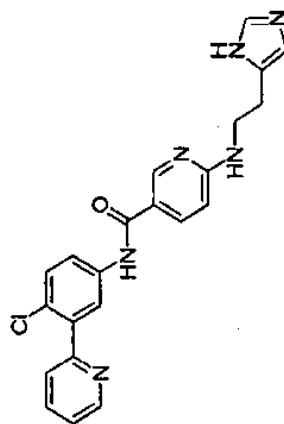
165



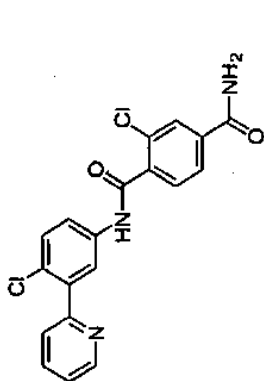
168



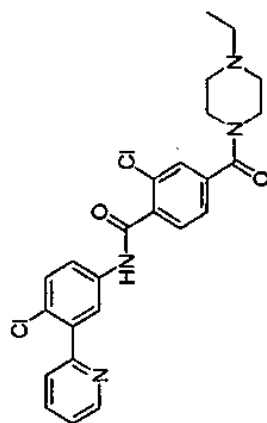
170



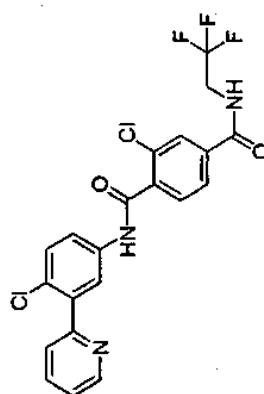
172



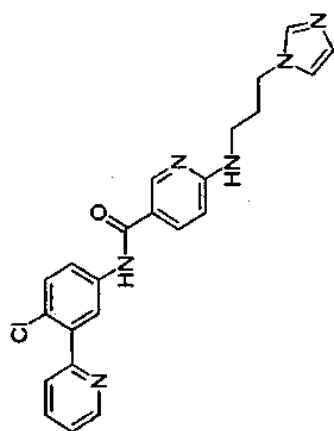
167



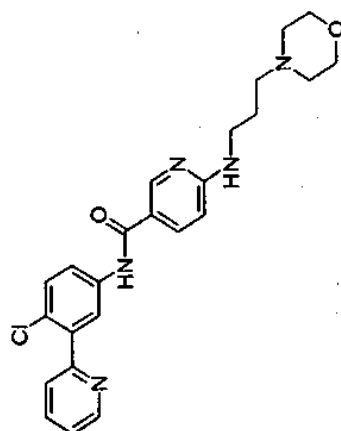
169



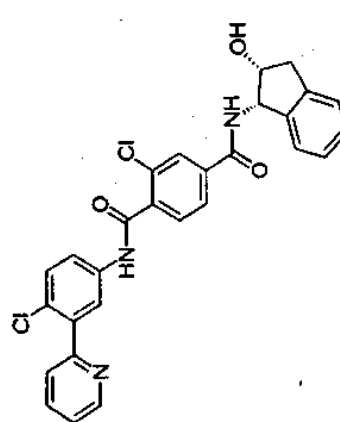
171



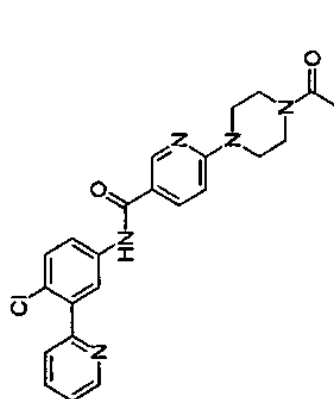
174



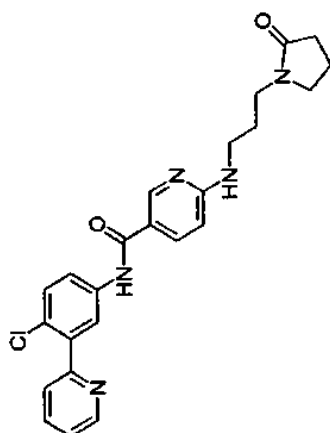
176



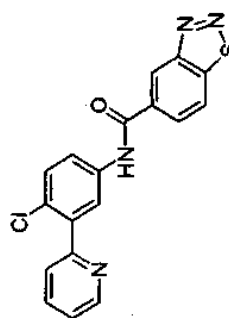
178



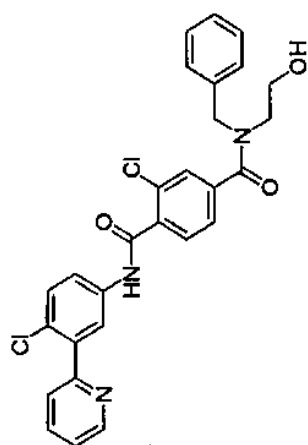
173



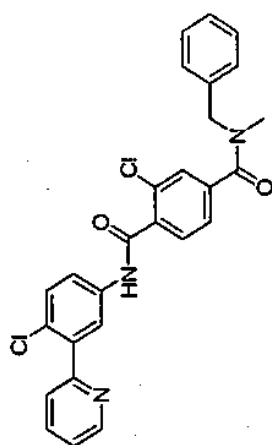
175



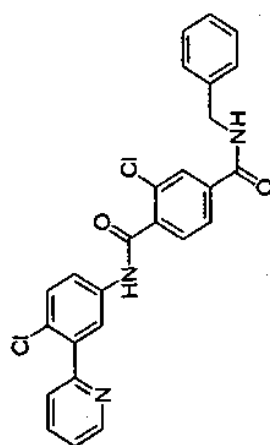
177



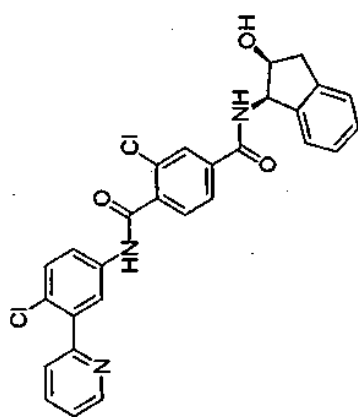
180



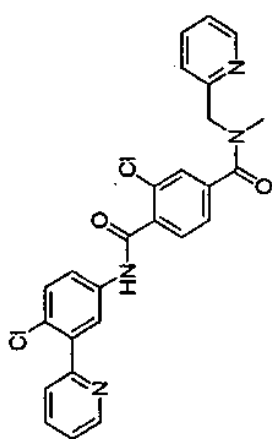
182



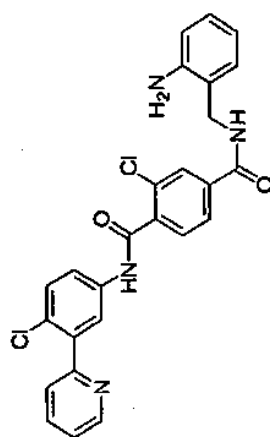
184



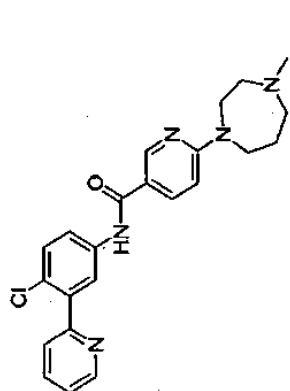
179



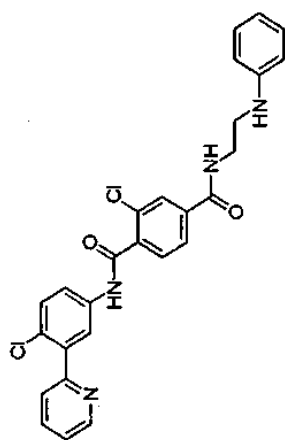
181



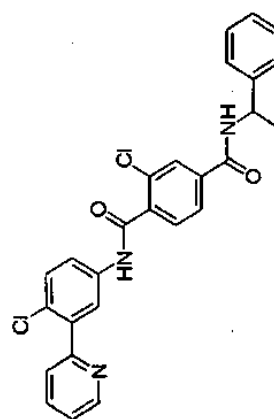
183



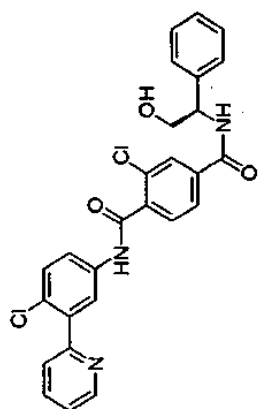
186



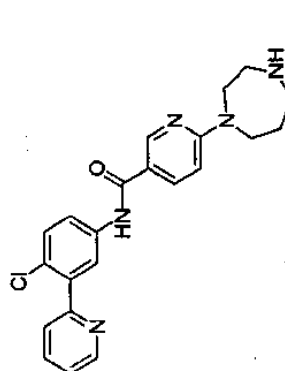
188



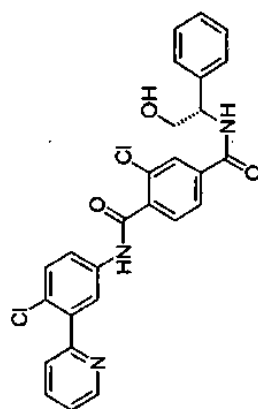
190



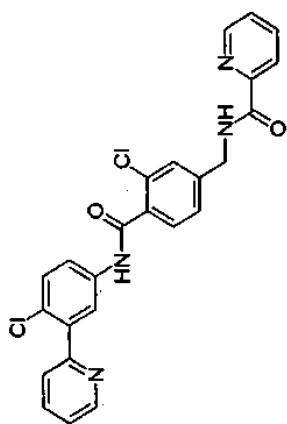
185



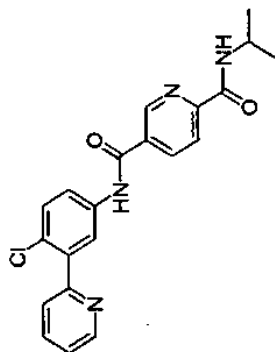
187



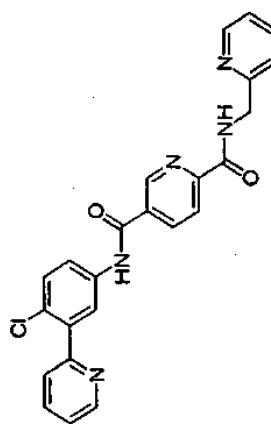
189



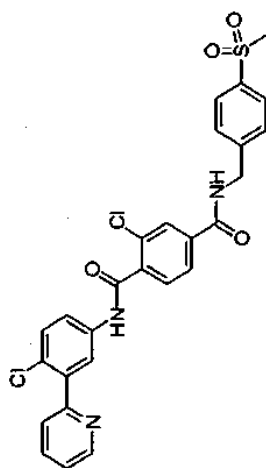
192



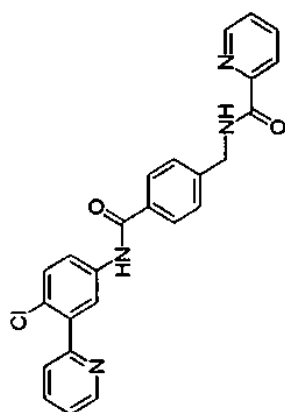
194



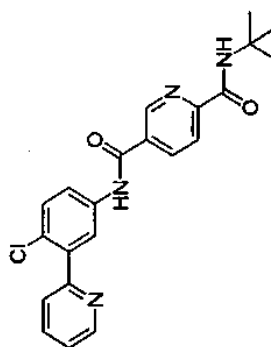
196



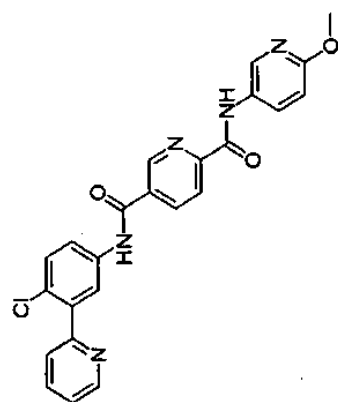
191



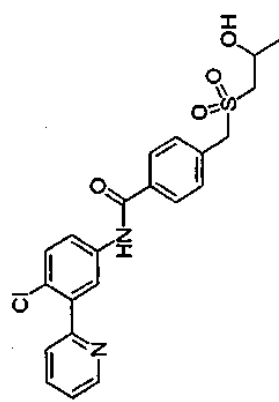
193



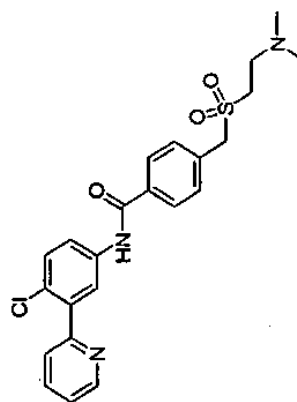
195



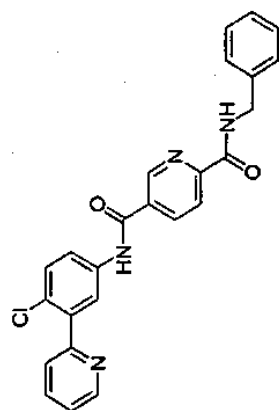
198



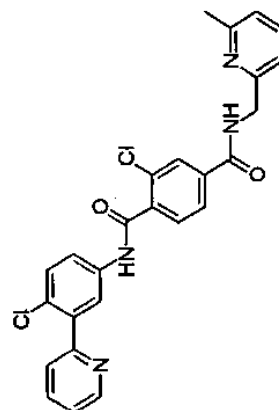
200



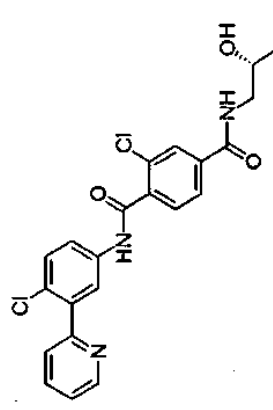
202



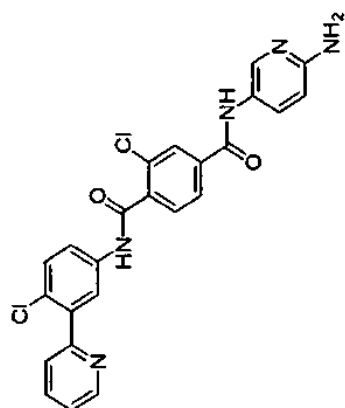
197



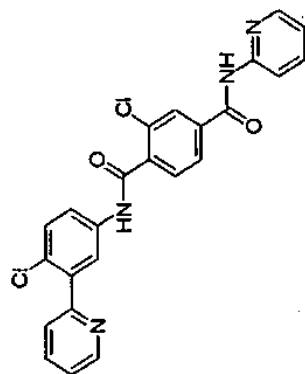
199



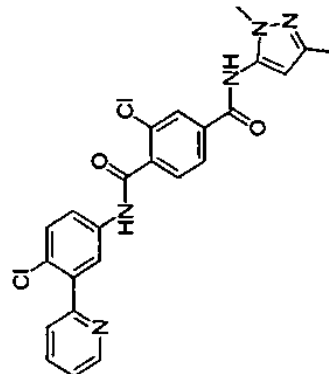
201



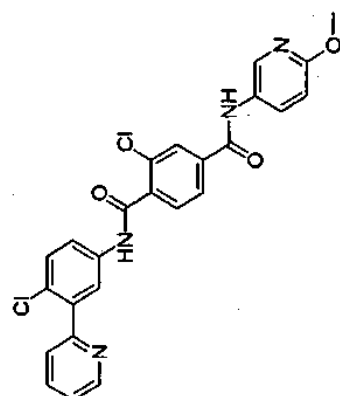
204



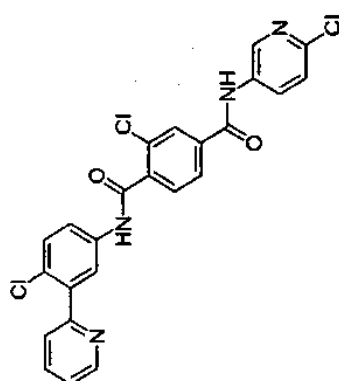
206



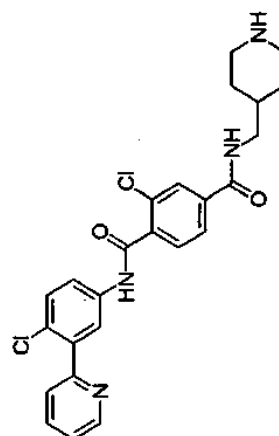
208



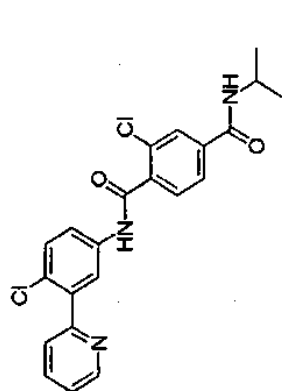
203



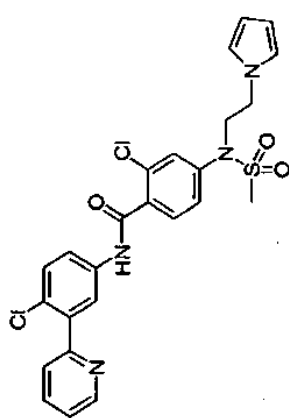
205



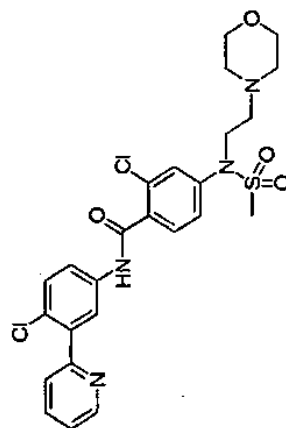
207



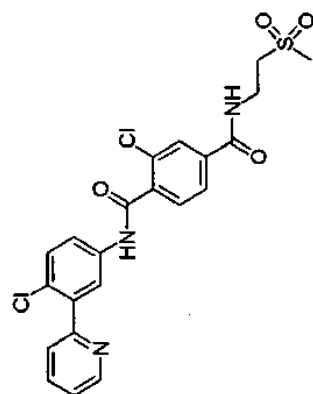
210



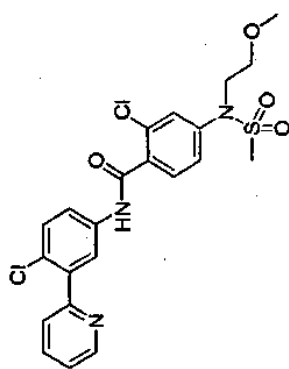
212



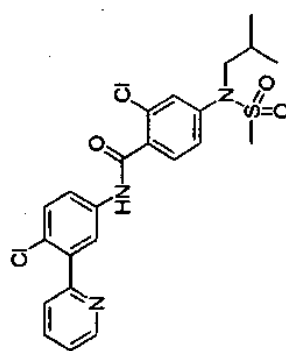
214



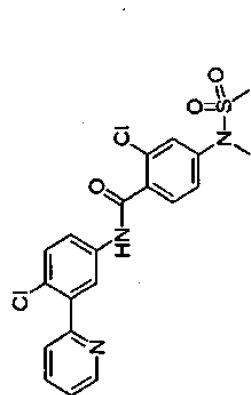
209



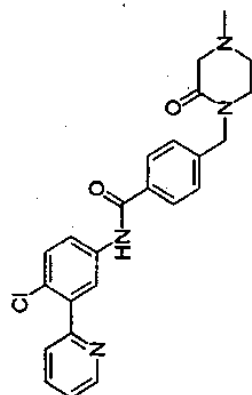
211



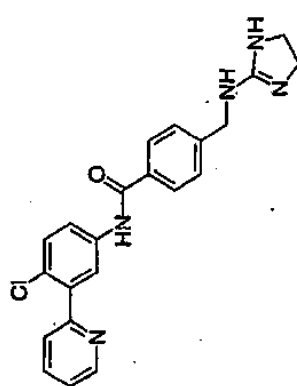
213



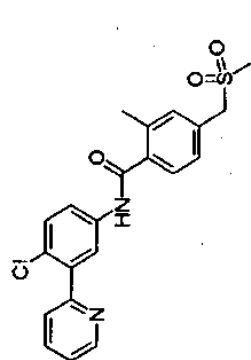
216



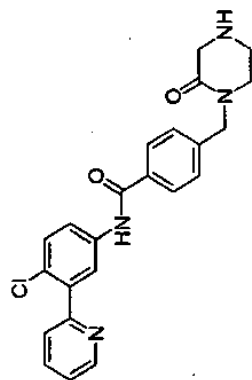
218



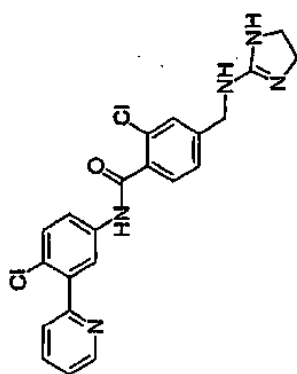
220



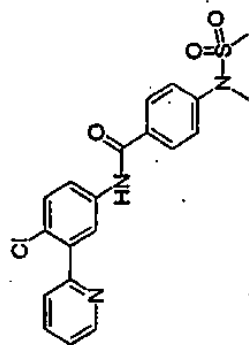
215



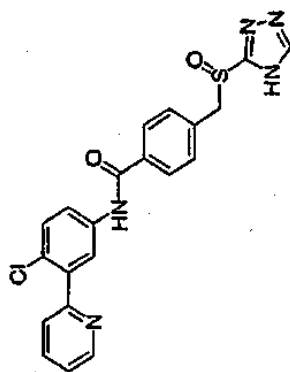
217



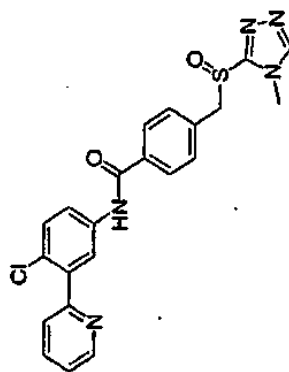
219



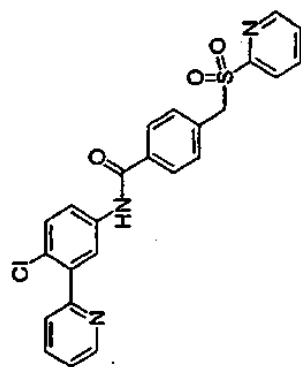
222



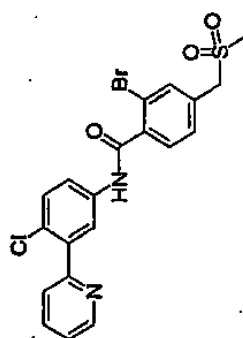
224



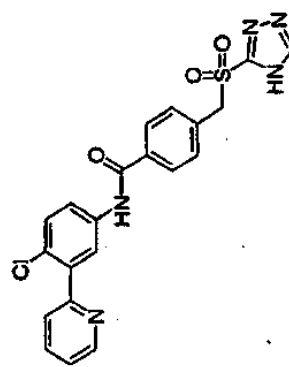
226



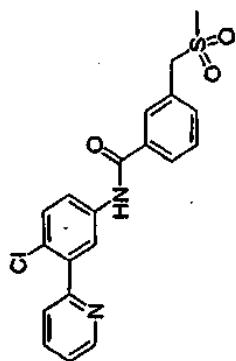
221



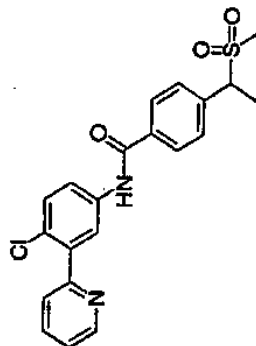
223



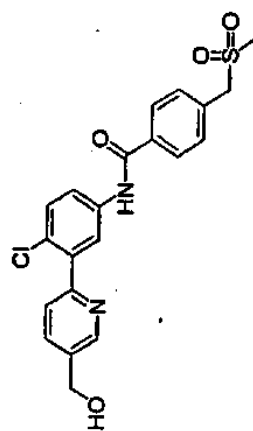
225



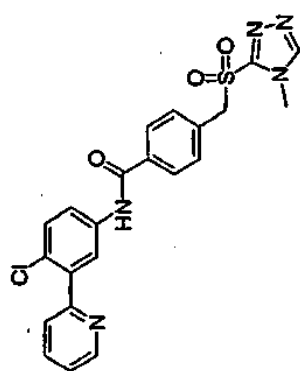
228



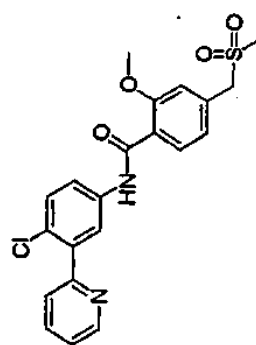
230



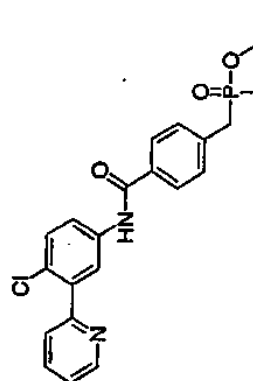
232



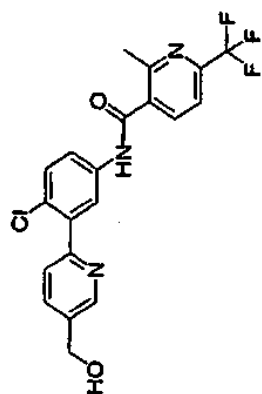
227



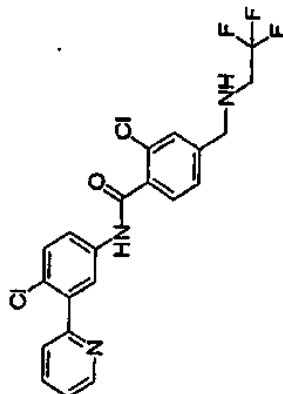
229



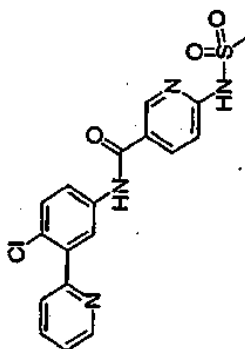
231



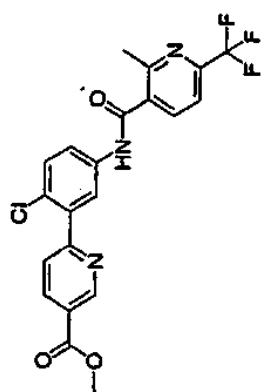
234



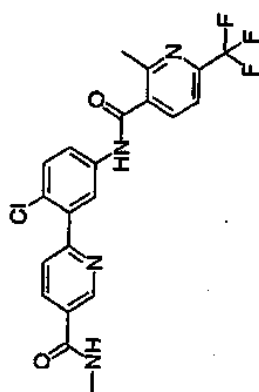
236



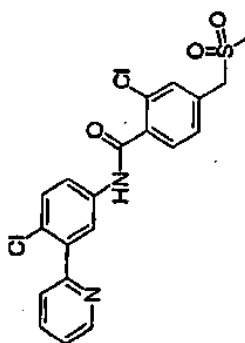
238



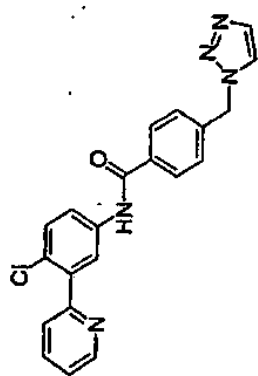
233



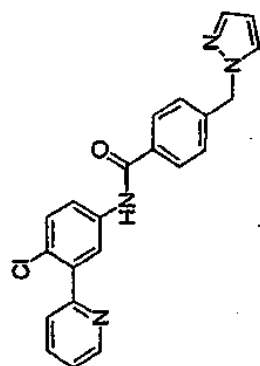
235



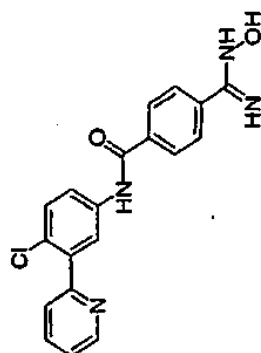
237



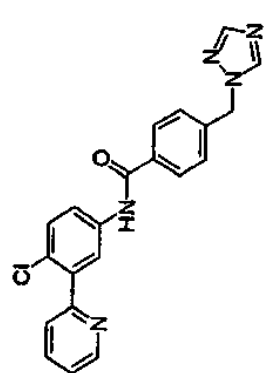
240



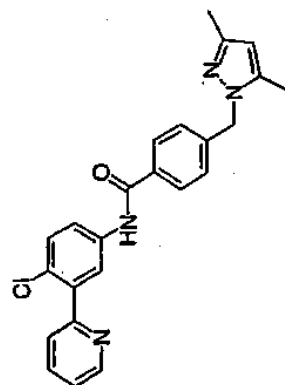
242



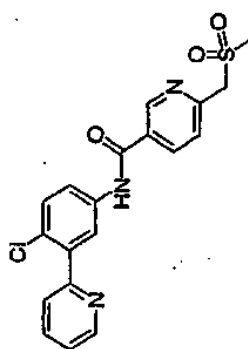
244



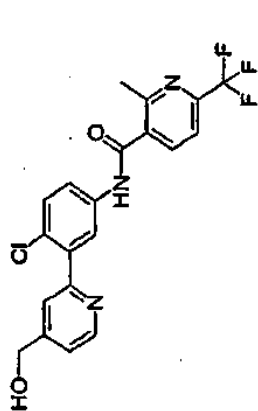
239



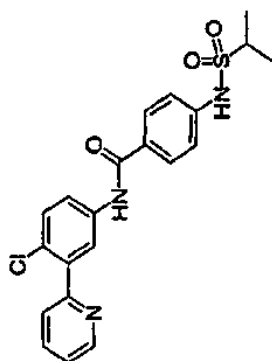
241



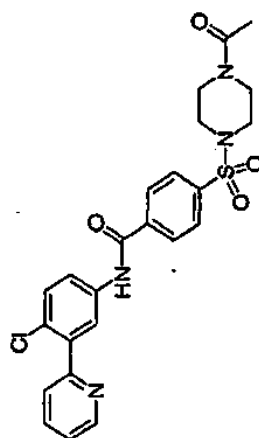
243



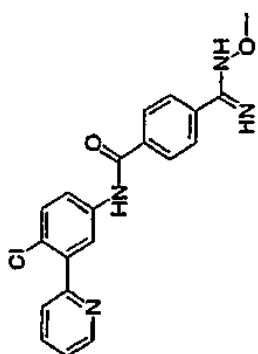
246



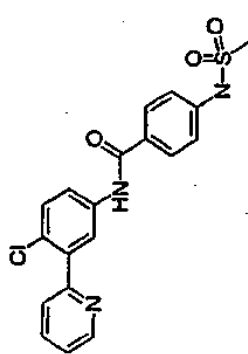
248



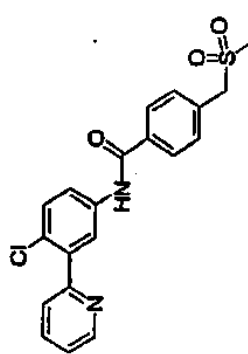
250



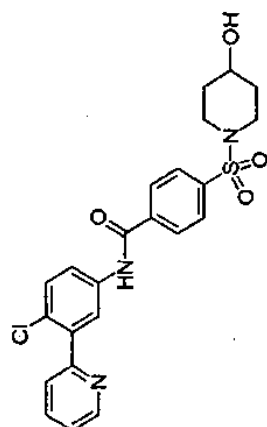
245



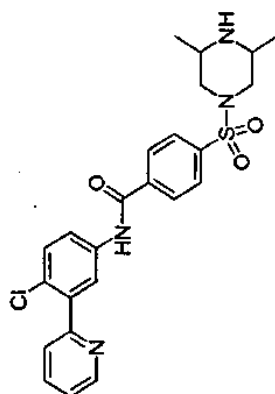
247



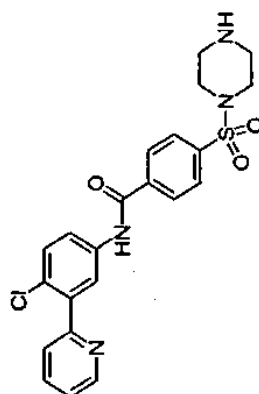
249



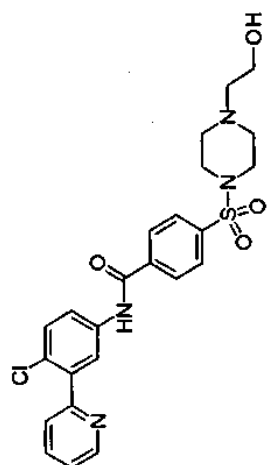
252



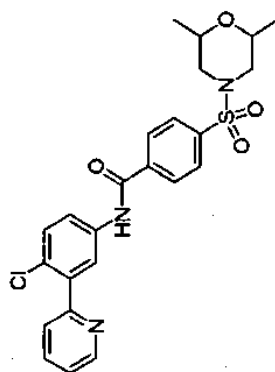
254



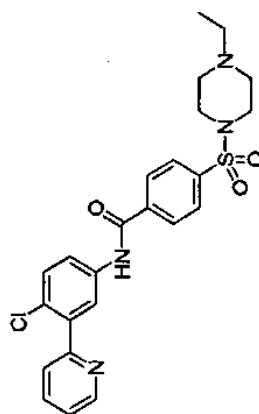
256



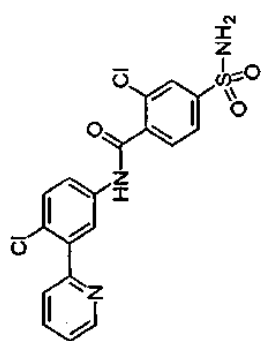
251



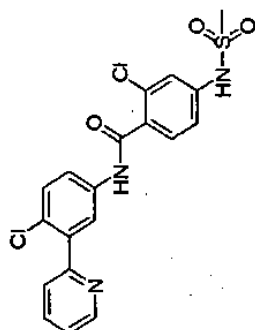
253



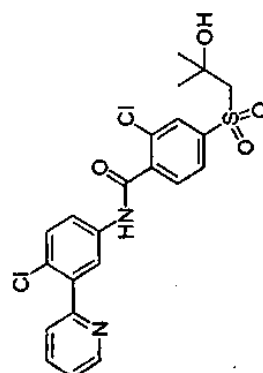
255



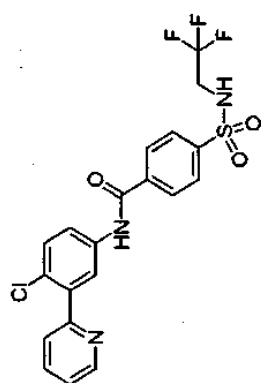
258



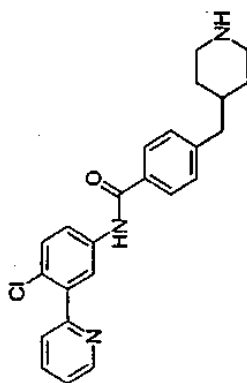
260



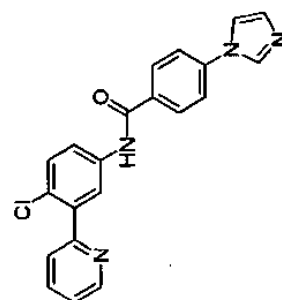
262



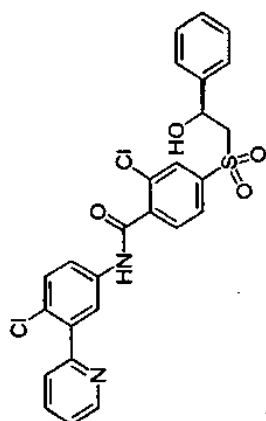
257



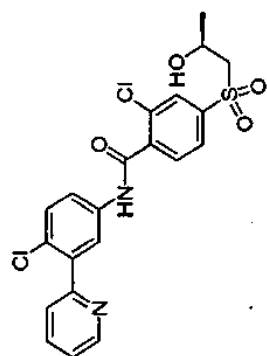
259



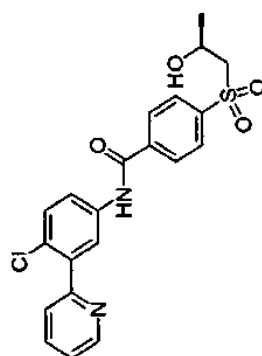
261



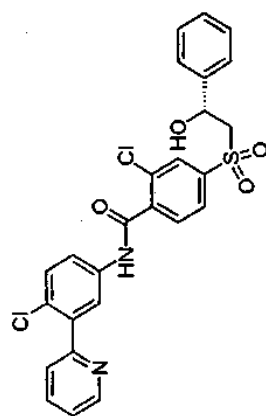
264



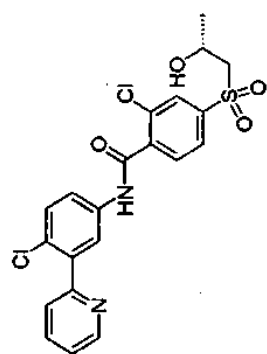
266



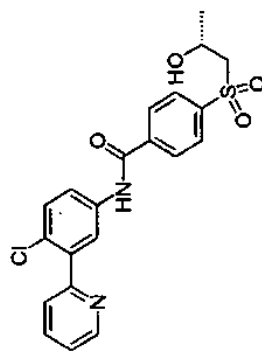
268



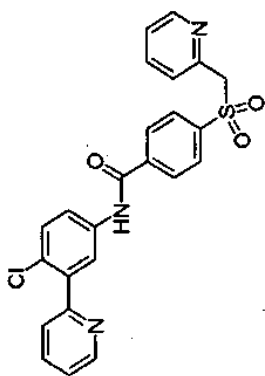
263



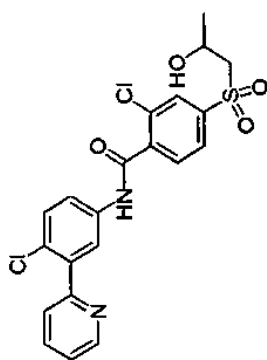
265



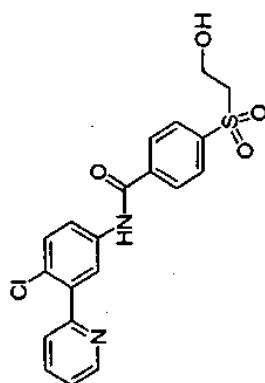
267



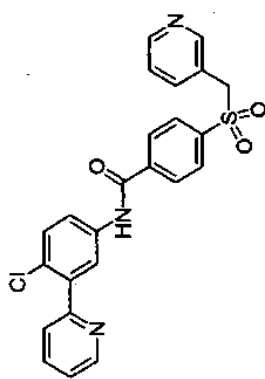
270



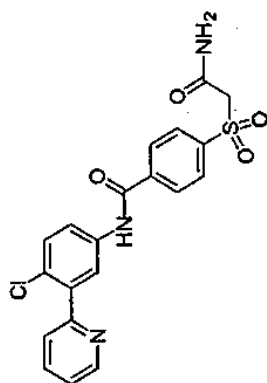
272



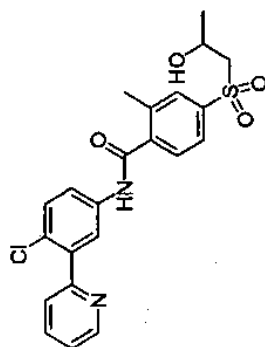
274



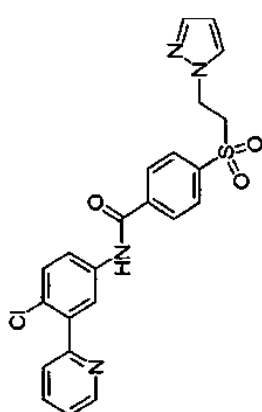
269



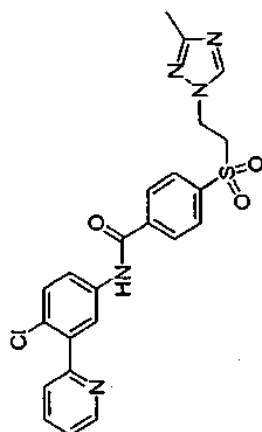
271



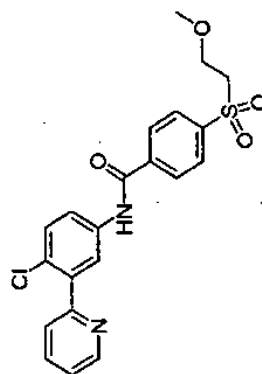
273



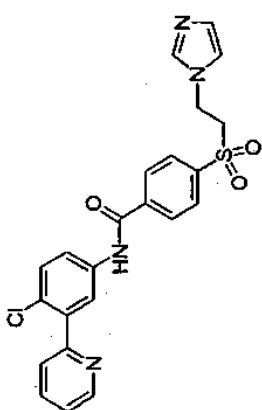
276



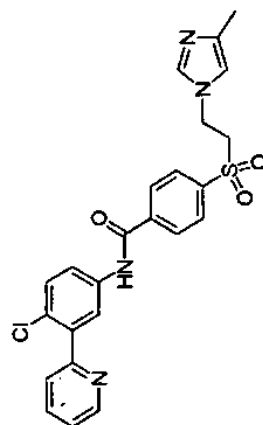
278



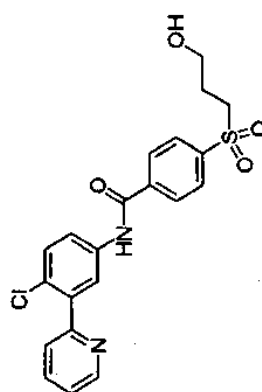
280



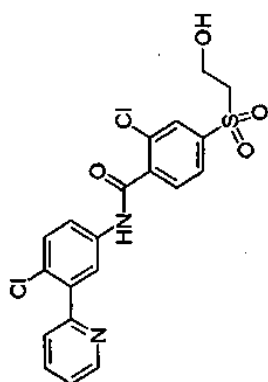
275



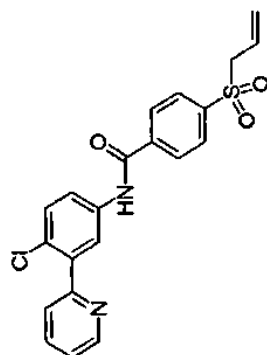
277



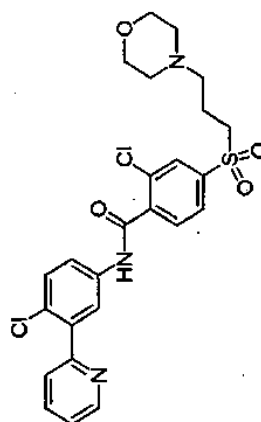
279



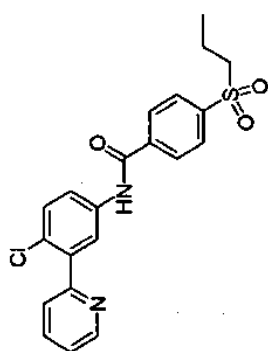
282



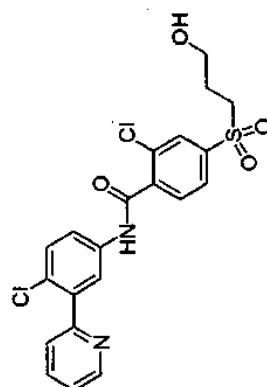
284



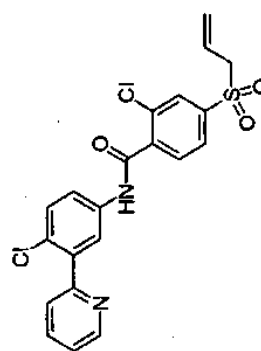
286



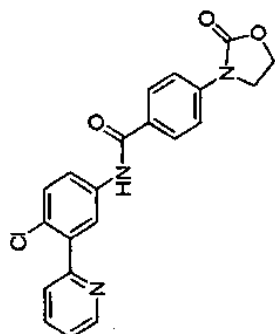
281



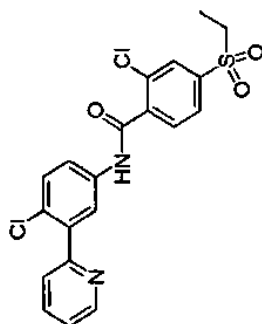
283



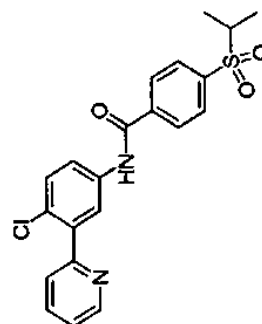
285



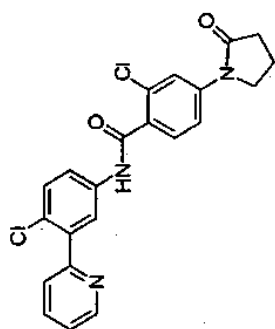
288



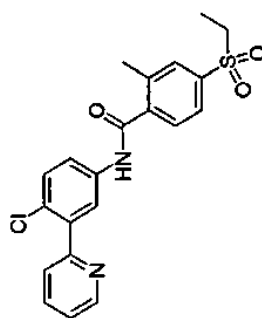
290



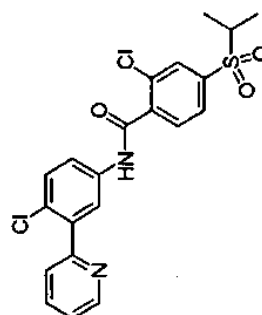
292



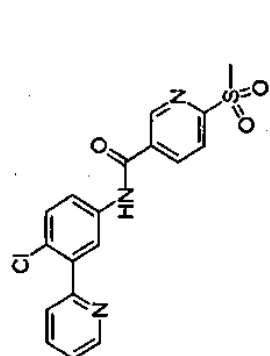
287



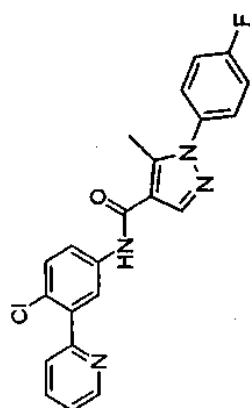
289



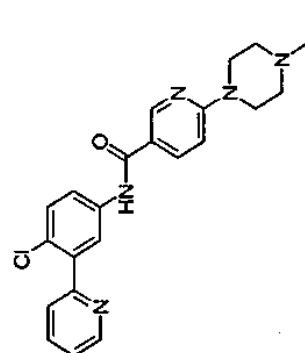
291



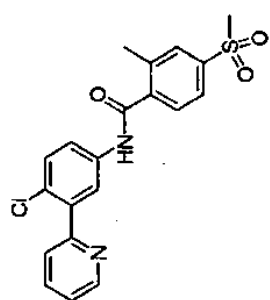
294



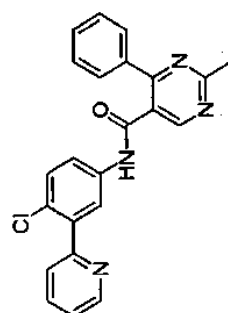
296



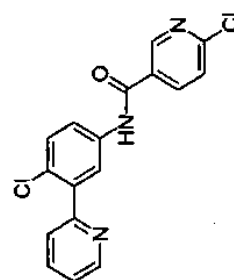
298



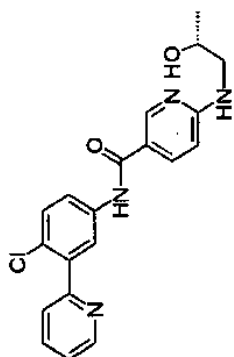
293



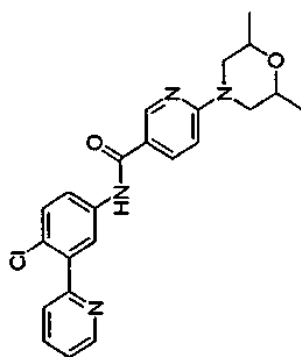
295



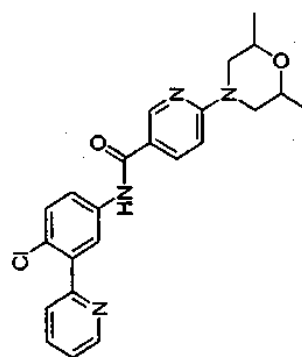
297



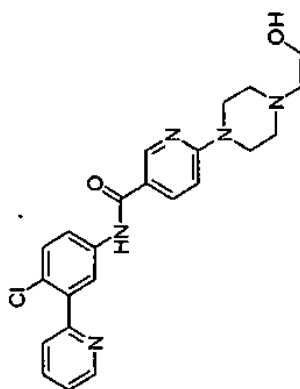
300



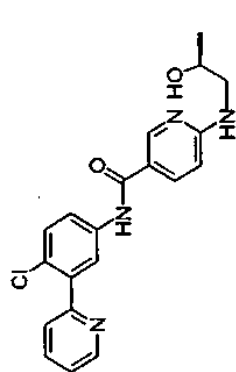
302



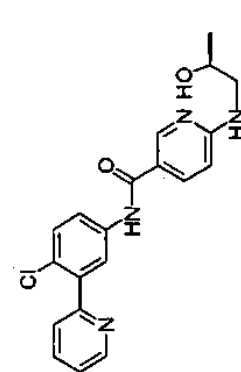
304



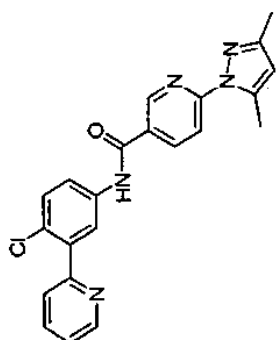
299



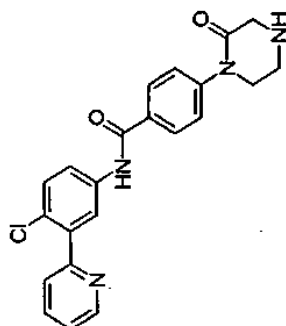
301



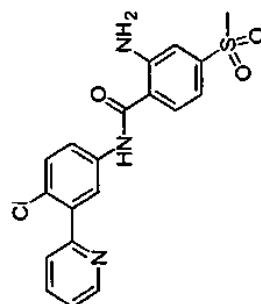
303



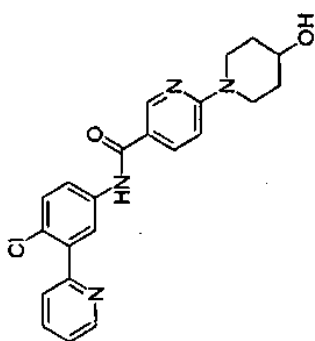
306



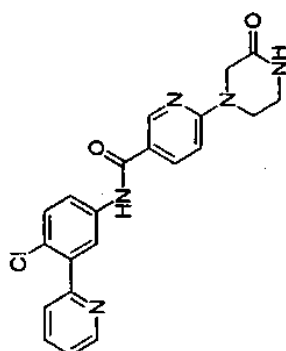
308



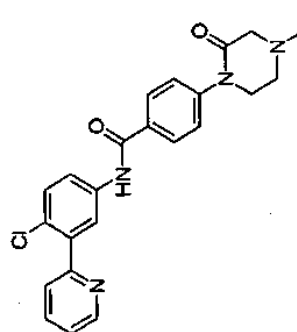
310



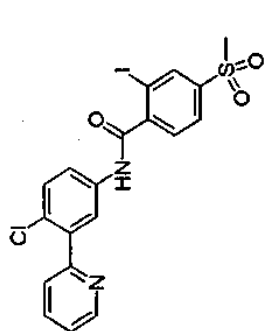
305



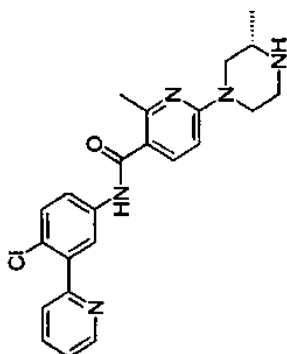
307



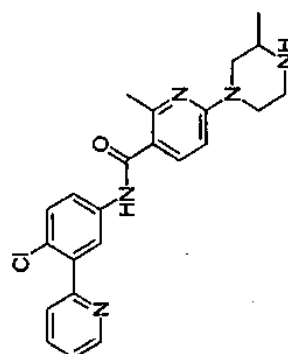
309



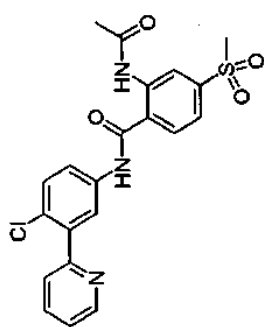
312



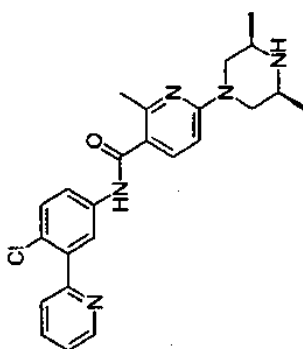
314



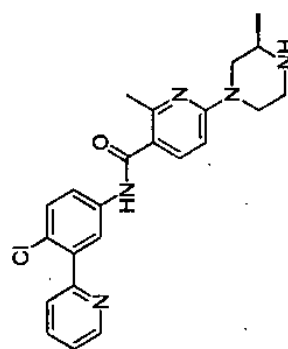
316



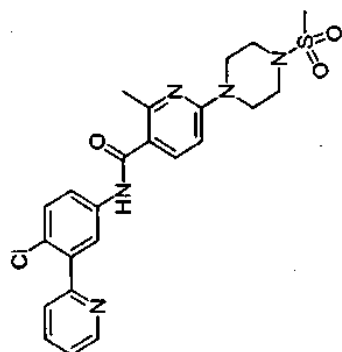
311



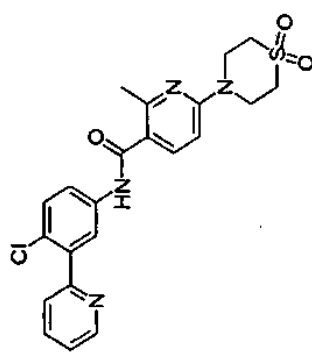
313



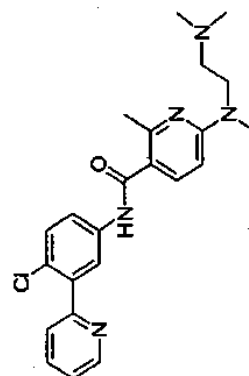
315



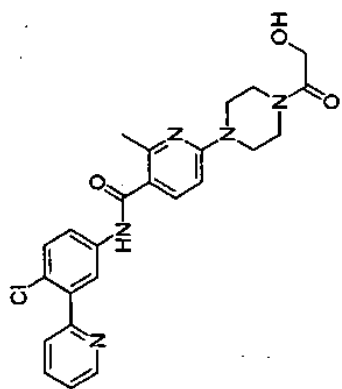
318



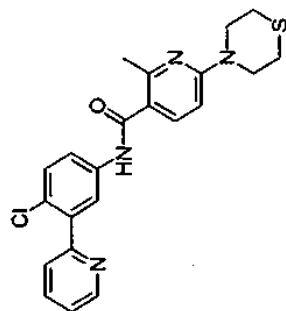
320



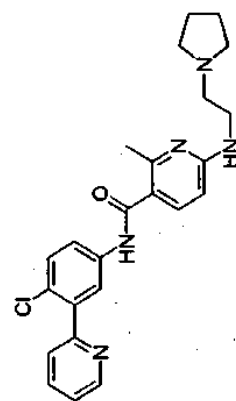
322



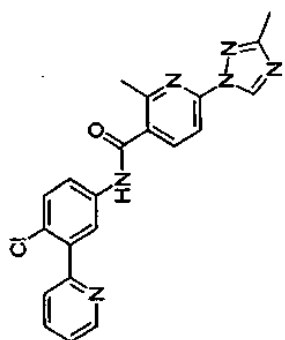
317



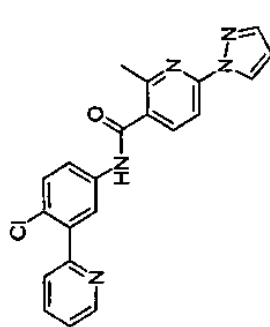
319



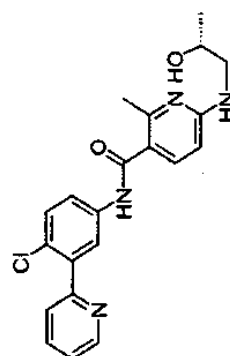
321



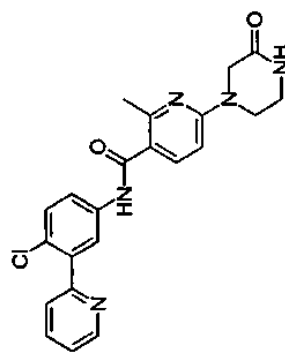
324



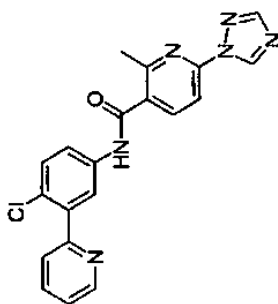
326



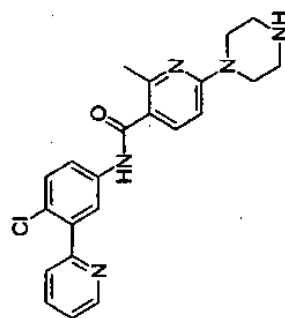
328



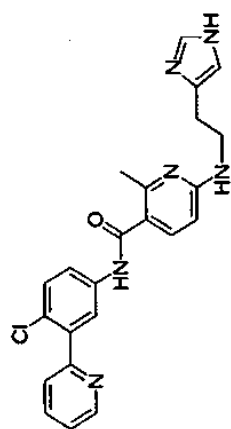
323



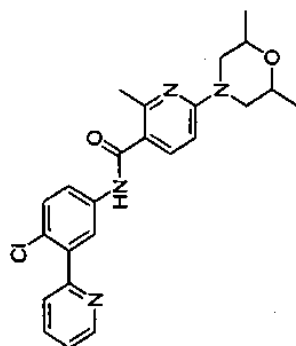
325



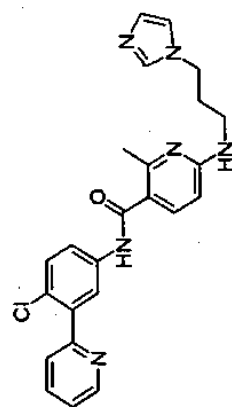
327



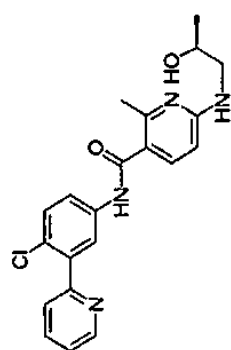
330



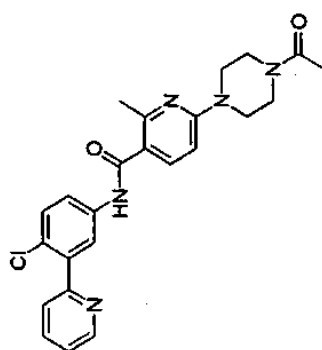
332



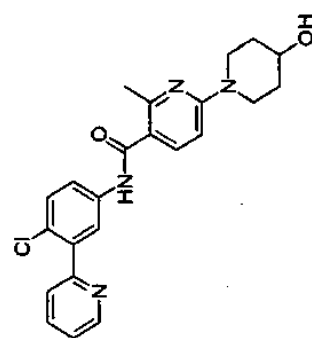
334



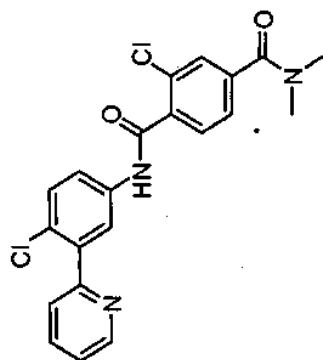
329



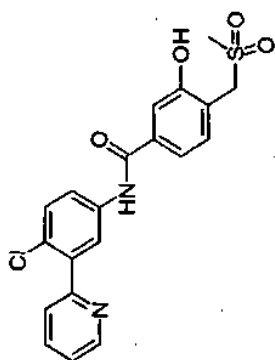
331



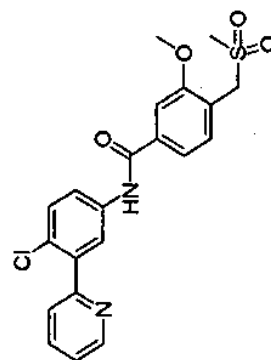
333



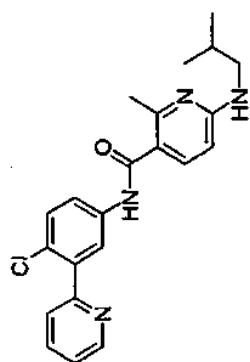
336



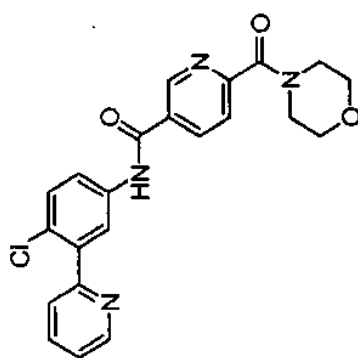
338



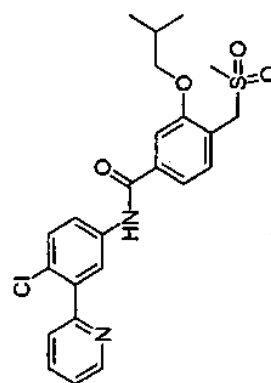
340



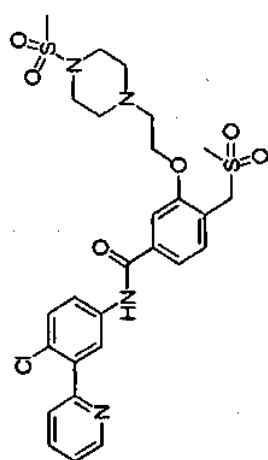
335



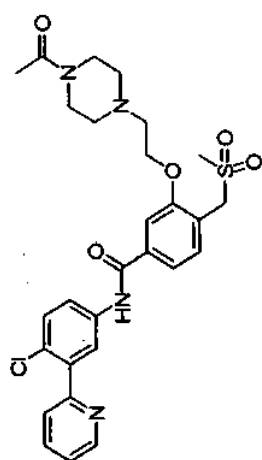
337



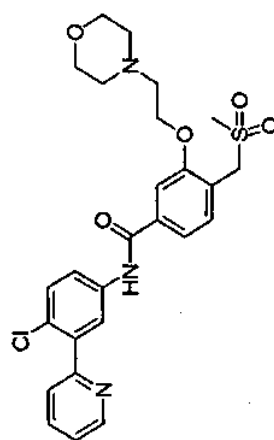
339



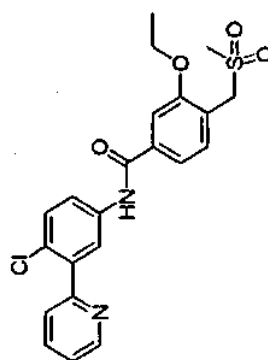
342



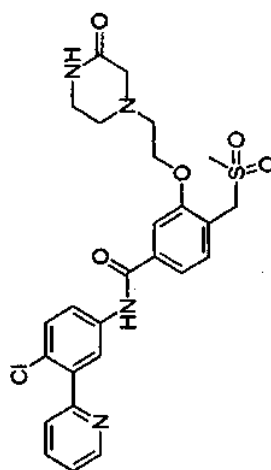
344



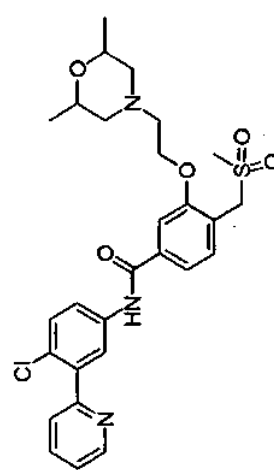
346



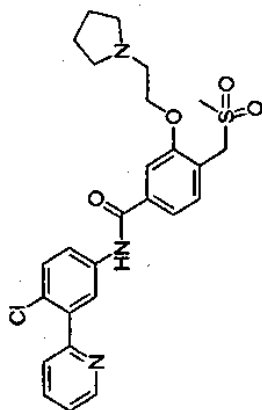
341



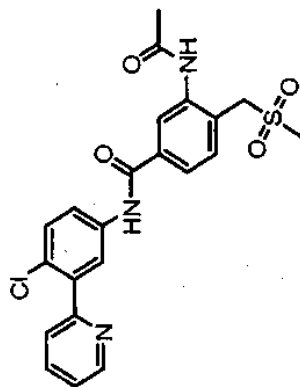
343



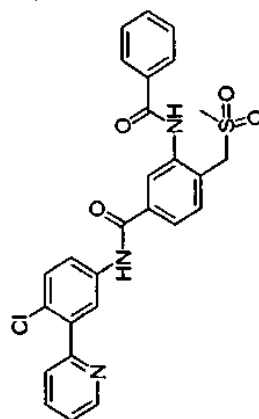
345



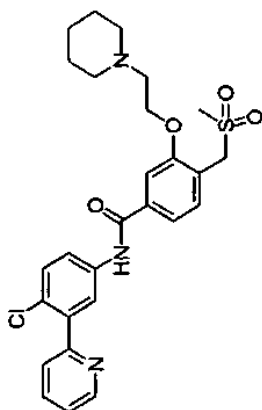
348



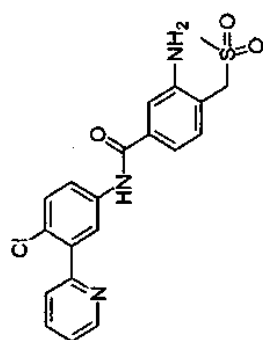
350



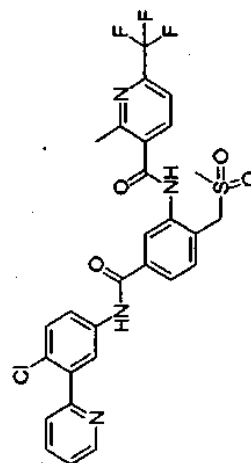
352



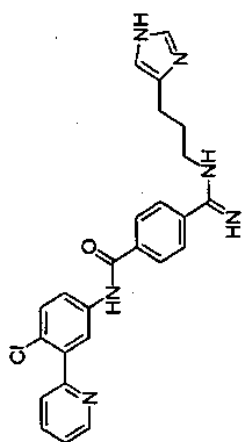
347



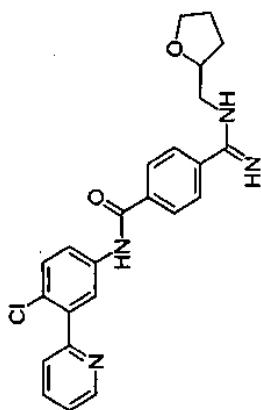
349



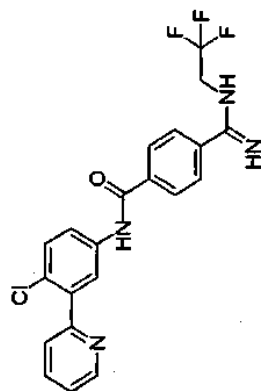
351



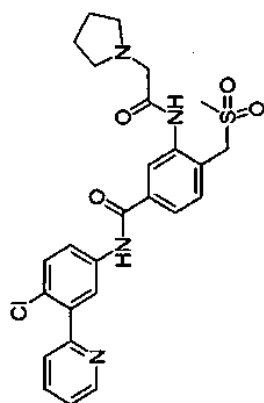
354



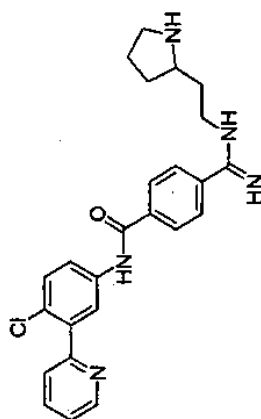
356



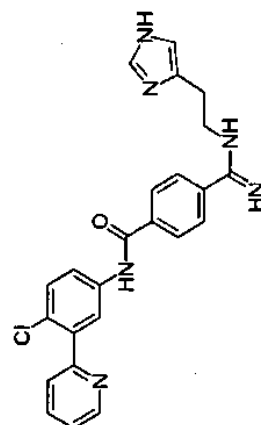
358



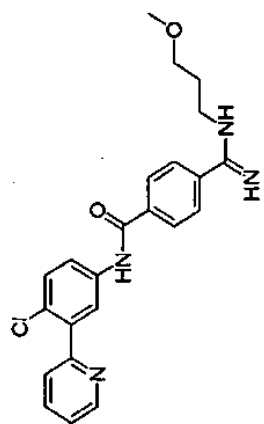
353



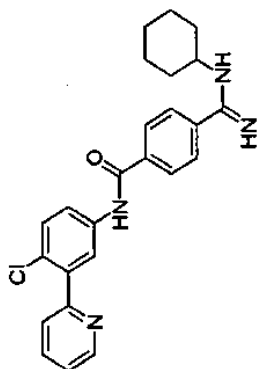
355



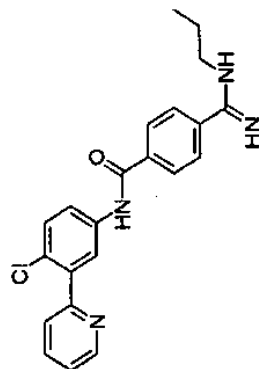
357



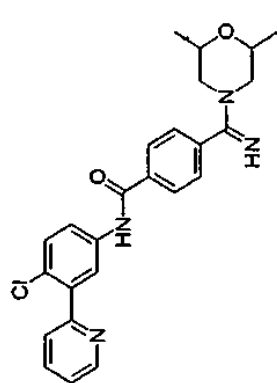
360



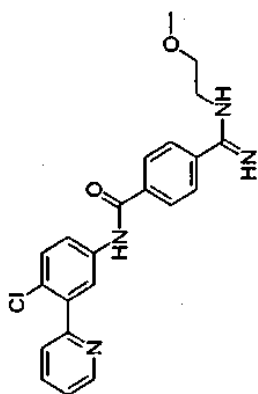
362



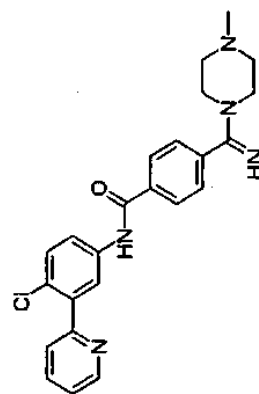
364



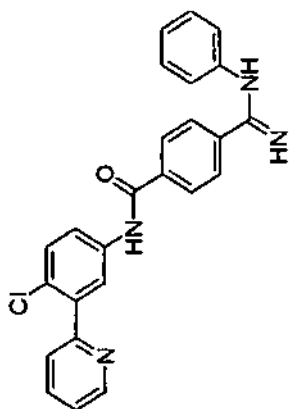
359



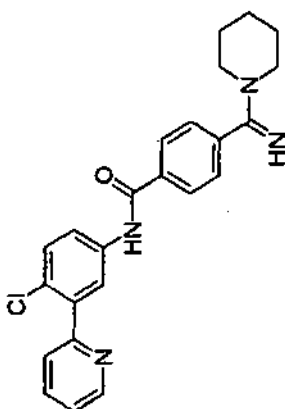
361



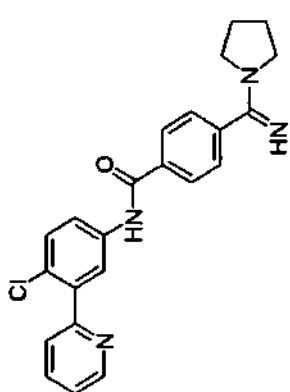
363



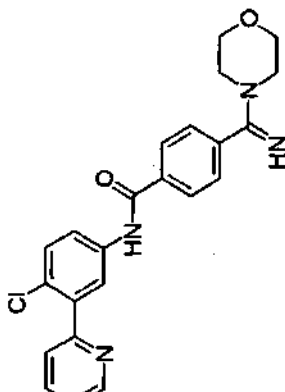
366



368



365



367

Los antagonistas que pueden ser usados para el tratamiento de los pacientes identificados mediante el método diagnóstico de la invención pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricos. Por consiguiente, los compuestos pueden existir como diastereómeros, enantiómeros o mezclas de los mismos. Las síntesis de los compuestos pueden emplear racematos, diastereómeros o enantiómeros como materiales de partida o como intermedios. Los compuestos diastereoméricos pueden ser separados mediante métodos cromatográficos o de cristalización. De forma análoga, las mezclas enantioméricas pueden ser separadas mediante el uso de las mismas técnicas o de otras técnicas conocidas en la materia. Cada uno de los átomos de carbono asimétricos puede tener la configuración R o S, y estas dos configuraciones pueden usarse como antagonistas.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Preparación de los anticuerpos anti-Hh

Preparación del antígeno:

El N-terminal del Shh humano (los aa 24 - 197) se subclonó en el vector pST293 con una etiqueta de histidina unizima (HQ) en lugar de la secuencia de señalización natural bajo un promotor phoA y se transformó en *E. coli* 58F3. Un cultivo de inicio se diluyó a 1:100 en 500 ml de medio limitante de fosfato C.R.A.P. con 50 µ/ml de carbencilina durante 24 h a 30 °C. El promotor phoA induce la expresión de la proteína una vez que se ha agotado el fosfato del medio a una DO₆₀₀ de ~ 2 (aproximadamente 7 h después), momento en el cual se añadió sulfato de cinc 100 µM para ayudar al plegamiento del Shh. El sedimento celular se resuspendió en 5 volúmenes (p/v) de tampón de lisis (fosfato de sodio 25 mM a pH 8,0, NaCl 0,15 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, β-mercaptoetanol 10 mM) con un Polytron PT300 y se lisó mediante tres pases a través de un microfluidificador a 10.000 psi. El homogeneizado se centrifugó a 14.000 g durante 60 min a 4 °C y se añadió Mes pH 5,0 a una concentración final de 50 mM. El lisado se cargó en una columna de 5 ml HiTrap SP HP (Pharmacia) previamente equilibrada con tampón A (fosfato de sodio 25 mM a pH 5,5, β-mercaptoetanol 10 mM) que contenía NaCl 150 mM. La columna se lavó con 4 volúmenes de columna (VC) de tampón A, seguido de 4 VC de tampón A que contenía NaCl 150 mM, y la proteína se eluyó con un gradiente de NaCl de 0,3 - 1,0 M en el mismo tampón. Las fracciones que contenían el *Shh* (según un análisis mediante SDS-PAGE) se agruparon, se añadió imidazol (pH 7,0) a una concentración final de 20 mM y el material se cargó en una columna de 5 ml His Trap (Pharmacia) equilibrada con tampón B (fosfato de sodio 25 mM a pH 8,0, NaCl 300 mM, β-mercaptoetanol 10 mM). Después de lavar con 5 VC de imidazol 20 mM en tampón B y 5 VC de un gradiente de imidazol de 20 - 50 mM, la proteína se eluyó con 5 VC de imidazol 250 mM en el mismo tampón. Las fracciones eluidas se analizaron mediante una SDS-PAGE, y la concentración del conjunto de elución se determinó mediante su absorbancia a 280 nm mediante el uso de un coeficiente de extinción de 1,17 (g/l)⁻¹ cm⁻¹ para el *Shh*. La proteína se esterilizó mediante una filtración 0,2 µM y se almacenaron alícuotas de uso único a - 80 °C, después se descongelaron en agua fría inmediatamente antes de su uso.

Generación de anticuerpos policlonales de conejo anti-Shh

Se inyectaron 250 µg del antígeno his-Shh-N preparado mediante el procedimiento descrito anteriormente, en cada uno de dos conejos blancos de Nueva Zelanda de 3 meses de edad (numerados como 59A y 59B) mediante el uso de 1:1 de antígeno:coadyuvante completo de Freund, seguido de una revacunación cada dos semanas (con una pausa entre las semanas 30 y 41) con 1:1 de antígeno:coadyuvante incompleto de Freund (Josman labs, LLC). Los sueros inmunes se valoraron mediante un ELISA de diluciones sucesivas sobre el mismo antígeno (Antibody Solutions, Mountain View, CA), presentando el conejo 59A un título máximo de 1:200.000 en la semana 9, y el conejo 59B más de 1:2.000.000 en la semana 11. Las muestras sanguíneas de las semanas 7 - 11 del conejo 59A y de las semanas 3 - 11 del conejo 59B se purificaron por afinidad sobre el antígeno Shh-N unido a microesferas de sepharose CNBractivadas, y los anticuerpos purificados se dializaron contra PBS y se ultracongelaron en alícuotas para su almacenamiento a -20 °C. Para comparar se creó el anticuerpo policlonal de conejo anti-Shh H-160 (Santa Cruz sc-902, nº de lote K0104) contra el fragmento del Shh humano de los aa 41 - 200.

Generación de anticuerpos monoclonales de conejo anti-Shh

Después de las revacunaciones en las semanas 45 y 52, se extirpó el bazo del conejo 59B (con un título de 1:15.000 en la semana 46) para las células de mieloma de conejo (240-E1, Eptomics). Los sobrenadantes del hibridoma se cribaron mediante un ELISA sobre el antígeno HQ-hShh-N, y los positivos (32) se cribaron adicionalmente para evaluar su reactividad en células COS fijadas en PFA transfectadas con hShh mediante una inmunofluorescencia, seguido de células 293 fijadas en formalina incluidas en parafina transfectadas con hShh mediante una inmunohistoquímica como se describe a continuación. Los 4 clones elegidos se expandieron, se subclonaron mediante diluciones limitantes y se ensayaron de nuevo como anteriormente. Los tres mejores subclones del único parental remanente positivo (#95) se seleccionaron para un aumento de escala en matraces Integra 95,3, 95,7 y 95,9. Después de 3 meses de crecimiento en medio con poco suero, los sobrenadantes se purificaron en una proteína-A sepharose, produciendo aproximadamente 1 mg de 95,3 (Shh: 4667), 1,2 mg de 95,7 (Shh: 4668) y 2 mg de 95,9 (Shh: 4669).

Inmunofluorescencia

Se transfectaron temporalmente células COS-7 con Shh humano completo sin marcar (registro NP_000184), con Ihh (NP_002172) o con Dhh (NP_066382) en pCMV Sport6 mediante el uso del reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante, en portaobjetos de 8 pocillos LabTekII o en placas de microscopía con paredes negras de 96 pocillos (Whatman) para su cribado. Después de 60 h de transfección, las células se fijaron con PFA al 3 % durante 20 min a la temperatura ambiente, se inactivaron durante 10 min con cloruro de amonio 50 mM y se permeabilizaron con saponina al 0,4 % (Sigma) en PBS que contenía BSA al 1 % y FBS al 2 %. Los policlonales y los monoclonales de conejo purificados por afinidad se usaron a 5 µg/ml, mientras que los sobrenadantes del hibridoma se diluyeron a 1:2. Se usó el monoclonal 5E1 anti-Shh (Ericson/Jessell 1998 Cell 87 p661) a 1 µg/ml como control positivo. La tinción del anticuerpo se detectó con anti-conejo de burro marcado con Cy3 (o de ratón para 5E1) (Jackson Immunoresearch) y se visualizaron mediante una microscopía de epifluorescencia mediante el uso de un microscopio de barrido de alto contenido Discovery-1 (Molecular Devices) y/o un microscopio DeltaVision (Applied Precision) equipado con DAPI, FITC y filtros de rodamina.

Inmunohistoquímica

Se transfectaron temporalmente células HEK293 con Shh humano completo sin marcar hShh (block H2006-223(5)), con Dhh (H2006-1676) o con Ihh (H2006-1677) en pADNc3,1 mediante el uso del reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante, en diez placas de 15 cm y se recogieron 48 h después con EDTA 5 mM en PBS. Los sedimentos celulares se procesaron para una fijación con formalina y una inclusión en parafina de acuerdo con los protocolos estándar. En resumen, las células se fijaron con formalina tamponada neutra al 10 %, se procesaron en procesadores automatizados, se incluyeron en parafina (FFPE) y se cortaron en secciones de 3 µm en portaobjetos Superfrost® Plus. Después los portaobjetos se desparafinizaron y se hidrataron con agua después de un tratamiento con una serie de xilenos y alcoholes en un autostainer Leica® y se pretrataron para la recuperación del antígeno con solución de recuperación Dako® TARGET en un módulo PT (Lab Vision); este método funcionó mejor que los métodos de recuperación DakoR High pH y Triology para los anticuerpos 95,9. Después se inactivó la actividad de peroxidasa endógena mediante la incubación de los portaobjetos en solución KPL (KPL Laboratories) durante 4 minutos a la temperatura ambiente. Después de bloquear las inmunoglobulinas endógenas con suero de bloqueo, los portaobjetos se tiñeron en un protocolo en tres etapas en un autostainer Dako®, empleando varios anticuerpos primarios de conejo anti-Hh o los sobrenadantes puros del hibridoma, seguido de anti-conejo secundarios biotinilados (Vector Laboratories) después el complejo ABC (ABC Elite Kit-Vector Laboratories) y se visualizaron mediante el uso de DAB (Pierce Laboratories) como cromógeno. Para maximizar la detección de los anticuerpos débiles en los sobrenadantes, se añadió una etapa de amplificación adicional, mediante el uso de una amplificación de la señal de tiramida (TSA), seguido de estreptavidina-HRP (kit de TSA de Perkin Elmer) en lugar del complejo ABC. Después los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina de Meyers y se deshidrataron con una serie de alcoholes y xilenos, seguido de la cubrición de los portaobjetos mediante el uso de medio de montaje orgánico (Permamount). Se usó IgG de ratón natural (Alpha Diagnostics) como control negativo y anti-Hh de conejo H-160 (Santa Cruz Biotech Sc-9024) como control positivo. La tinción con el rMab 95,9 purificado fue óptima a 5 µg/ml, y tanto éste como H-160 funcionaron mejor sin la amplificación de TSA, para minimizar el fondo.

Ensayo de ELISA en sándwich de Hh

Se recubrieron placas de ELISA durante una noche a 4 °C con 5 µg/ml del anticuerpo monoclonal anti-Shh / Ihh AA.F10 (Curis, Inc) o 95,9 y se incubaron con concentraciones crecientes de octil-Shh recombinante a la temperatura ambiente durante 1 h en diluyente de ensayo (BSA al 0,5 %, Tween 20 al 0,05 %, 15 ppm de proclina en PBS). Después de lavar, se detectó el octil-Shh unido mediante incubaciones secuenciales de 0,1 µg/ml de anti-Hh 5E1 biotinilado (anti-Shh / Ihh / Dhh) durante 1 h, 50 ng/ml de estreptavidina-HRP durante 30 min, después se visualizó con sustrato TMB y se leyó a 650 nm. El ELISA se realizó por triplicado y se representó la DO650 frente a la concentración de octil-Shh ± la desviación típica de la media. Mediante el uso de AA.F10 como el Ab de recubrimiento, este ensayo detecta de forma reproducible el octil-Shh en el intervalo de entre 78 pg/ml y 10 ng/ml.

Resultados

Generación de monoclonales de conejo contra Hh.

Se crearon dos anticuerpos policlonales de conejo contra el Shh-N humano expresado en *E. coli* con una etiqueta de unizima N-terminal. Ambos conejos 59A y 59B respondieron bien, con unos títulos de 1:200.000 y de más de 1:2 millones, respectivamente, en la 11ª semana de revacunación. Todas las muestras sanguíneas con un título de más de 1:7.000 fueron agrupadas, y el antígeno se purificó por afinidad, y el anticuerpo resultante se comparó con el actual anticuerpo "de referencia por excelencia" H-160 (Santa Cruz Biotechnology) mediante una inmunofluorescencia (IF), una inmunohistoquímica (IHC) y una inmunotransferencia Western de las células transfectadas con el Shh. El policlonal de conejo tiñó el Shh del retículo endoplásmico de las células Shh-COS transfectadas de forma estable (Figura 1 A), de forma similar a la tinción obtenida con H-160 (Figura 1 C), pero con un cierto fondo nuclear evidente en las células COS no transfectadas (Figura 1 B). También reconoció el Shh del citoplasma (muy probablemente del retículo endoplásmico) y la membrana celular de sedimentos de las células 293 fijadas en formalina-5 e incluidas en parafina mediante una IHC (Figura 2 C), de nuevo con una cierta tinción de fondo en las células no transfectadas (Figura 2 D), pero por lo demás ligeramente más fuerte que la tinción de H-160 (Figura 2B).

Los anticuerpos monoclonales de conejo (rmAb) no solo proporcionan un suministro teóricamente ilimitado de reactivo, sino que también tienen la ventaja de reconocer un epítipo más específico con una afinidad mayor que un policlonal mixto. Por lo tanto, se condensó el bazo del conejo 59B con el título más alto con células de mieloma de conejo para generar hibridomas de conejo. Los sobrenadantes de los 96 pocillos de estos fueron cribados mediante un ELISA del antígeno Shh-N (datos no mostrados) y se expandieron adicionalmente y se seleccionaron según su reactividad mediante una IF y una IHC como anteriormente. De los 32 clones parentales iniciales ELISA+, uno (el clon #95) permaneció positivo después de la subclonación, y se seleccionaron los tres IHC+ más fuertes: 95,3, 95,7 y 95,9. Los tres subclones eran probablemente idénticos, basándose en su similar inmunotinción de las células transfectadas con Shh (Figura 3 fila superior) y con unas secuencias N-terminales prácticamente idénticas (Figura 4A), aunque la presencia de la cadena pesada endógena (no reactiva frente al Shh) del compañero de fusión del

mieloma complicó el análisis de la secuencia.

Debido a su mayor rendimiento, se seleccionó 95,9 para un aumento de escala y una purificación. Reconoció el Shh en células transfectadas mediante una IF (Figura 1E) y una IHC (Figura 2 E), pero era más limpio que el policlonal del que derivaba, a juzgar por la muy reducida tinción de fondo de las células no transfectadas, mediante una IF (Figura IF, 2 D). El rmAb 95,9 no requirió una amplificación de TSA con objeto de detectar su antígeno. La tinción de las células transfectadas con Shh era específica porque otro anticuerpo monoclonal de conejo (R&D systems,) contra un antígeno no relevante solo dio como resultado una tinción de fondo del citoplasma (Figura 2 A y datos no mostrados). Adicionalmente, la tinción específica de Shh era más fuerte que la del anticuerpo H-160 (compárese la Figura 2 E con la 2 B).

Aunque se crearon contra el Shh-N, el 95,9 y sus clones hermanos 95,3 y 95,7 presentaron reacción cruzada con el 89 % del Ihh-N idéntico y con el 74 % del Dhh-N idéntico, a juzgar por su IF (Figura 3 A), o su IHC (datos no mostrados) y por su inmunotransferencia Western (Figura 3 B) de los clones completos transfectados, similares a las de H-160, por lo que por lo tanto nos referiremos a estos anticuerpos como anti-Hh. Mediante una inmunotransferencia Western, se detectaron tanto la forma completa Hh (~ 50 kDa) no procesada del ER de Hh como la escindida Hh-N (~ 25 kDa) en las células transfectadas (aunque en las células Shh/COS estables, en las que hay una menor expresión total de Shh, la banda completa es menos obvia o está ausente (datos no mostrados). La banda de ~95 kDa detectada por H-160, que se cree que no es específica, debido a su tamaño y a su presencia en las células no transfectadas, no fue reconocida en las células no transfectadas por 95,9 (aunque apareció en las células transfectadas con Dhh, donde presumiblemente es algún tipo de dímero de Dhh). Los tres clones anti-Hh y H-160 también presentaron reacciones cruzadas con el Shh-N de ratón mediante el uso de las tres técnicas (datos no mostrados), como se esperaba, dado que solo hay un aminoácido de diferencia (la Ser 67 de la secuencia humana es una Thr en el ratón), permitiéndonos teñir embriones de ratón como un medio de validación de la especificidad y la sensibilidad de 95,9.

El epítipo de 95,9 fue cartografiado mediante una digestión con tripsina del hShh marcado con his hasta los residuos 75 - 96, que son idénticos al 100 % con hlhh, y solo hay 3 aa diferentes en hDhh (Figura 5), sugiriendo así que 95,9 detectará el Shh y el Ihh con una sensibilidad similar, si no idéntica, explicando también la capacidad del anticuerpo para reaccionar de forma cruzada con los tres ligandos. Adicionalmente, este péptido se encuentra en la cara opuesta del Shh con respecto a los sitios de unión al anticuerpo de bloqueo previamente establecidos Ptch y 5E1 (Pepinsky, *et al.* (2000) J. Biol. Chem. 275 (15): 10995 - 11001), lo que apoya la incapacidad de 95,9 de competir con 5E1 por la unión al Hh (datos no mostrados, pero véase la Figura 11).

El rmAb anti-Hh 95,9 muestra una mayor sensibilidad y especificidad que el policlonal H-160 mediante una tinción por IHC

Se ha demostrado que varios anticuerpos anti-Hh reconocen el Hh recombinante, pero la tinción de los menores niveles presentes en los tejidos o tumores endógenos ha tenido menos éxito, especialmente en muestras FFPE. Dado que 95,9 fue seleccionado por su capacidad para reconocer el Hh fijado con FFPE, era de interés determinar si era lo suficientemente sensible y específico para detectar el Hh endógeno. En este punto, analizamos los embriones de ratón en desarrollo, dado que la distribución del ARNm del Shh durante el desarrollo ha sido bien documentada mediante hibridación *in situ* (ISH) como abundante en la fase E10,5 en la notocorda y en la placa basal del tubo neural ventral, a partir del cual se cree que Shh se difunde y crea un gradiente morfogénico para especificar el destino de las diversas neuronas del tubo neural (véase Wilson y Maden (2005) Dev. Biol. 282 (1): 1 - 13); así como en el intestino medio, donde está implicado en la morfogénesis del epitelio intestinal (Bitgood y McMahon (1995) Dev. Biol. 172 (1): 126 - 138) y en los primordios de las extremidades posteriores, donde regula una adecuada formación de los dedos (Chuong, *et al.* (2000) Cell Mol Life Sci. 57 (12): 1672 - 1681; Johnson *et al.* (1994) Curr Opin Genet Dev. 4 (4): 535 - 542). La prueba directa de que el ARNm es traducido procede de la tinción de la notocorda y de la placa base de embriones congelados con el anticuerpo monoclonal anti-Shh 5E1 (ref), pero este anticuerpo tiñe insuficientemente el shh en muestras fijadas en FFPE tales como las biopsias rutinarias de tumores, limitando por tanto su potencial como diagnóstico de supuestos tumores que expresan el Hh. Por el contrario, el anticuerpo anti-Shh 95,9 tiñó específicamente la notocorda y la placa basal ventral de embriones de ratón E10,5 (tinción marrón de la Figura 6 A), mucho más fuertemente que el anticuerpo H-160 (Figura 6 B) en las mismas condiciones de tinción (que previamente también se había averiguado que eran óptimas para el H-160 que los sedimentos de células Shh/293). En E11,5, no solo eran obvios el tubo neural ventral y la placa basal (Fig. 6 C), sino también la pálida tinción de las estructuras que se extienden hacia fuera de la placa basal (Fig. 6 D). Aunque esto podría ser coherente con el papel postulado del Hh como morfogénico, esto debería ser confirmado mediante una ISH para confirmar cualquier solapamiento con Gli1 o con Ptc1, para determinar si esta expresión es real, ya que el ARNm de Shh no debería solaparse en las células receptoras)). Si es real, sería sugestivo de la primera visualización directa del gradiente de Hh. La tinción de Hh también estaba presente en el neuroepitelio en desarrollo, entre la vesícula telecefálica y el cuarto ventrículo (E11,5; Figura 6 E), así como en el epitelio intestinal intermedio (Figura 6 F), como se esperaba a partir de los resultados previos de la ISH. No había tinción en ninguna parte del embrión en la que no se esperara encontrar Hh, lo que ilustra la especificidad de 95,9.

Como un ensayo adicional de la sensibilidad de 95,9, analizamos mediante una IHC un conjunto de 36 líneas

celulares de cáncer de colon humano en las que habíamos predeterminado los niveles de ARNm para Shh (y para Ihh y Dhh) mediante una Q-PCR. Los valores umbrales críticos (Ct) para Shh variaban desde indetectable en células RKO y Colo320 (por debajo de un Ct de 38) hasta 24 para las líneas celulares con la mayor expresión. Importantly, ninguna de las líneas celulares que carecían de los tres ARNm de Hh (tal como DLD-1) mostró ninguna tinción con 95,9, demostrando así la especificidad del anticuerpo hacia hedgehog. Tomando como base la tinción del citoplasma y de la membrana de Hh por parte de 95,9, pudieron agruparse varias líneas celulares en tres categorías positivas: baja (puntuada como 1+; por ejemplo, la Figura 7 B); moderada (2+; por ejemplo, la Figura 7 C) o alta (3+; por ejemplo, la Figura 7 D) expresión de Hh. Se representaron gráficamente los valores de ΔCt después de la normalización con respecto al gen estructural de la β -glucuronidasa (GUSB) frente a las puntuaciones de la IHC, ilustrando una tendencia hacia unas mayores puntuaciones de IHC con unos mayores valores de ARNm (unos menores valores de ΔCt), con un coeficiente de Spearman de -5 0,61 (Figura 7 E). La correlación no era perfecta debido a que algunas de las líneas celulares también expresaban Ihh, que probablemente es igualmente bien reconocido por 95,9 (basándose en una identidad de secuencia del 100 % en el epítipo; Figura 5), además de Shh (notablemente, la línea celular 3+ SW403 y la línea celular 2+ HT29), pero no obstante es estadísticamente significativa ($p = 0,0001$). Estos datos sugieren que 95,9 puede identificar provechosamente las líneas celulares cancerosas procesadas mediante FFPE que son Hh- mediante una IHC. Importantly, dos de las líneas celulares de xenoinjerto colorrectal que responden bien a GDC-0449 (y a 5E1) *in vivo*, LS180 y HT55 (datos no mostrados), solo expresan el Hh a unos niveles de 1+ (Figura 7 E), lo que sugiere que puede ser la propia presencia de Hh, en lugar de la elevada expresión de Hh, lo que es importante en la selección tumoral para la terapia antagonista de Hh. A este respecto, la mayor sensibilidad de 95,9 con respecto a H160 le puede permitir detectar una mayor proporción de expresores 1+, y por lo tanto lo hace un mejor anticuerpo diagnóstico.

La detección de Hh en biopsias tumorales humanas primarias podría ser útil para la selección de pacientes de cáncer del tipo III (paracrino de Hh guiada por ligando) para su tratamiento con antagonistas Hh, dado que sería poco probable que los tumores que no expresan el Hh respondieran a dicho tratamiento. Por lo tanto deseamos determinar si 95,9 era capaz de detectar el Hh en un tumor de ovario humano que previamente se había demostrado que expresaba el Shh mediante una ISH. De hecho, 95,9 proporcionó un robusto marcaje de Shh(+) pero no de un tumor de ovario diferente Shh(-) (Figura 8), confirmando su utilidad y su especificidad.

Alentados por la especificidad y la aparentemente superior sensibilidad de 95,9 con respecto a H-160, procedimos a determinar la prevalencia de la expresión de Hh en un mayor conjunto de muestras de ovario (72 tumores y 2 normales, datos no mostrados), de colon (99 tumores y 44 normales) y de páncreas (105 tumores y 17 normales) y clasificamos la tinción citoplasmática como ausente (0+), débil (1+), moderada (2+) o fuerte (3+), mostrándose las imágenes representativas de cada categoría para cada tipo tisular en la Figura 9 A. Aproximadamente el 20 % de ambas muestras de colon tumoral y normal (Figura 9 B) carecían de una tinción específica del citoplasma y de la membrana de Hh (cualquier fondo nuclear fue considerado no específico, dado que no se espera que Hh esté presente en esta parte de la célula). El 80 % restante eran positivos para Hh, es su mayoría con una expresión 1+ (el 68 % de los tumores y el 54 % de los normales), menos con una expresión 2+ (el 10 % de los tumores y el 23 % de los normales) y aún menos con una tinción fuerte 3+ (el 3 % de los tumores y ninguno normal). De forma análoga, se encontró una baja expresión en la mayoría de las muestras de ovario (el 57 % de los tumores y 2/2 de los normales fueron considerados 1+), con un 31 % en la categoría de 2+ y un 6 % en la categoría de 3+, y un 7 % de tumores negativos. Asimismo, el 23 % de los 105 tumores pancreáticos se consideraron negativos, en comparación con el 41 % de las muestras de páncreas normal; el 70 % de los tumores y el 41 % de los normales expresaban unos bajos niveles (1+) de Hh; el 7 % de los tumores y el 18 % de los normales expresaban unos niveles de 2+, y ninguna muestra mostró una tinción fuerte. Estos resultados indican que aunque la expresión de Hh no parece ser mucho más fuerte en los tumores que en los tejidos normales, existe un intervalo de expresión entre las muestras. Importantly, hasta un 23 % de las muestras tumorales carecían de la expresión de Hh en este análisis, lo que sugiere que puede merecer la pena evaluar la expresión de Hh en pacientes que están en ensayos clínicos con antagonistas del Hh para determinar si cualquier ausencia de respuesta se correlaciona con una ausencia de expresión de Hh. También es posible que los anticuerpos anti-Hh de la invención puedan usarse para determinar si el nivel de expresión de Hh se correlaciona con la respuesta al tratamiento antagonista.

Finalmente, queríamos determinar la sensibilidad del anticuerpo anti-Hh 95,9 en un tejido con poca expresión, tal como los folículos pilosos. Se ha detectado el ARNm de Hh mediante una hibridación *in situ* en los folículos pilosos (Iseki *et al.* (1996) *Biochem Biophys Res Commun.* 218 (3): 688 - 693) y adicionalmente, una inyección del anticuerpo bloqueante 5E1 o del antagonista de ciclopamina Hh, impide el desarrollo del pelo en embriones de ratón (Wang *et al.* (2000) *J. Invest. Dermatol.* 114 (5): 901 - 901; Chiang, *et al.* (1999) *Dev. Biol.* 205 (1): 1 - 9), sugiriendo fuertemente por tanto que la señalización de Hh es esencial en este órgano. Sin embargo, no se ha demostrado la presencia de la proteína Hh en el pelo de muestras cutáneas FFPE mediante una IHC, muy probablemente debido a una inadecuada sensibilidad del anticuerpo. Se sabe que la señalización Hh es elevada durante la fase anágena del crecimiento del pelo, con menos actividad durante la telógena (Sato *et al.* (1999) *J. Clin. Invest.* 104 (7): 855 - 864) y en los ratones adultos, el crecimiento del pelo está sincronizado de forma que la anágena se produce a las 4 semanas de edad, y mostró una fuerte señal en esta fase de crecimiento para ambas proteínas Shh (Figura 10 A), según se detectó mediante una tinción de 95,9. En los seres humanos, el crecimiento del pelo no está sincronizado, pero un subconjunto de los folículos debería estar en la fase anágena en cualquier momento dado. De hecho, observamos que aproximadamente un 10 % de los folículos pilosos de un cuero cabelludo fetal humano mostraban

una señal específica de Shh- mediante el uso de una sonda antisentido (Figura 10 B) pero no con una sonda sentido (datos no mostrados). Por consiguiente, un subconjunto de folículos pilosos mostraba reactividad al 95,9, con una tinción bien definida en el epitelio proximal por encima de la papila dérmica (Figura 10 C, E), mucho más fuerte que la muy débil tinción obtenida con H160 (Figura 10 D, F). Por lo tanto, el 95,9 es lo suficientemente sensible como para detectar unos bajos niveles de Hh en los folículos pilosos en fase anágena, y es superior al anticuerpo H160 a este respecto. Esto sugiere que es probable que 95,9 detecte una mayor proporción de muestras tumorales que expresan el Hh que H160, y por lo tanto, es el reactivo de elección para el desarrollo de un kit de IHC para la selección clínica de potenciales pacientes para un tratamiento con antagonistas del Hh.

10 EJEMPLO 2

Análisis en micromatriz para detectar la regulación por disminución de los polipéptidos Hedgehog en cánceres o tumores

15 Las micromatrices de ácidos nucleicos, que a menudo contienen miles de secuencias génicas, son útiles para la identificación de los genes expresados diferencialmente en tejidos enfermos en comparación con sus homólogos normales. Mediante el uso de micromatrices de ácidos nucleicos se retrotranscriben muestras de ARNm de ensayo y de control procedentes de muestras tisulares de ensayo y de control, y se marcan para generar sondas de ADNc. Las sondas de ADNc se hibridan a continuación a una matriz de ácidos nucleicos inmovilizados sobre un soporte sólido. La matriz está configurada de forma que la secuencia y la posición de cada uno de los miembros de la matriz es conocida. Por ejemplo, pueden ponerse en la matriz una selección de genes que se sabe que son expresados en ciertos estados patológicos, sobre un soporte sólido. La hibridación de una sonda marcada con cualquier miembro de la matriz en particular indica que la muestra a partir de la cual deriva la sonda expresa ese gen. Si la señal de hibridación de una sonda procedente de una muestra de ensayo (tejido enfermo) es mayor que la señal de hibridación de una sonda procedente de una muestra de control (tejido normal), se identifica el gen o genes sobreexpresados en el tejido enfermo. La implicación de este resultado es que una proteína sobreexpresada en un tejido enfermo es útil no solo como un marcador diagnóstico de la presencia de la afección patológica, sino también como un objetivo terapéutico para el tratamiento de la afección patológica.

30 La metodología de hibridación de ácidos nucleicos y la tecnología de micromatriz es bien conocida en la materia. En el presente ejemplo, la preparación específica de ácidos nucleicos para su hibridación, y las sondas, los portaobjetos y las condiciones de hibridación, están todas detalladas en la Solicitud de Patente PCT con el número de serie PCT/US01/10482, depositada el 30 de marzo de 2001.

35 EJEMPLO 3

Análisis cuantitativo de la expresión del ARNm hedgehog

40 En este ensayo se usa un ensayo de la nucleasa 5' (por ejemplo, TaqMan®) y una PCR cuantitativa en tiempo real (por ejemplo, ABI Prizm 7700 Sequence Detection System® (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA)), para encontrar los genes que están significativamente sobreexpresados en un tumor o tumores de glioma cancerosos en comparación con otros tumores cancerosos o con tejido normal no canceroso. La reacción del ensayo de la nucleasa 5' es una técnica fluorescente basada en una PCR que hace uso de la actividad exonucleasa 5' de la enzima polimerasa Taq de ADN para monitorizar la expresión génica en tiempo real. Se usan dos cebadores oligonucleotídicos (cuya secuencias se basan en el gen o en la secuencia EST de interés) para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Se diseña un tercer oligonucleótido o sonda para detectar la secuencia de nucleótidos ubicada entre los dos cebadores de la PCR. La sonda no es extensible por la enzima polimerasa Taq de ADN, y está marcada con un colorante fluorescente indicador y un colorante fluorescente inactivador. Cualquier emisión inducida por láser del colorante indicador es inactivada por el colorante inactivador cuando los dos colorantes están ubicados próximos entre sí, como le están en la sonda. Durante la reacción de amplificación mediante PCR, la enzima polimerasa Taq de ADN escinde la sonda de una forma dependiente del molde. Los fragmentos de sonda resultantes se disocian en disolución, y la señal del colorante indicador liberado está libre del efecto inactivador del segundo fluoróforo. Se libera una molécula de colorante indicador por cada nueva molécula sintetizada, y la detección del colorante indicador no inactivado proporciona la base de la interpretación cuantitativa y cuantitativa de los datos. Este ensayo se conoce bien y se usa habitualmente en la materia para identificar cuantitativamente las diferencias en la expresión génica entre dos muestras de tejido humano diferentes, véanse, por ejemplo, Higuchi *et al.*, *Biotechnology* 10: 413 - 417 (1992); Livak *et al.*, *PCR Methods Appl.*, 4: 357 - 362 (1995); Heid *et al.*, *Genome Res.* 6: 986 - 994 (1996); Pennica *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95 (25): 14717 - 14722 (1998); Pitti *et al.*, *Nature* 396 (6712): 699 - 703 (1998) y Bieche *et al.*, *Int. J. Cancer* 78: 661 - 666 (1998).

60 El procedimiento de la nucleasa 5' se lleva a cabo en un dispositivo de PCR cuantitativa en tiempo real, tal como el ABI Prism 7700TM Sequence Detection. El sistema consiste en un termociclador, un láser, un dispositivo de cámara de carga acoplada (CCD) y un ordenador. El sistema amplifica las muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por el láser se recoge en tiempo real a través de cables de fibra óptica para los 96 pocillos, y se detecta con la CCD. El sistema incluye un programa informático para operar el instrumento y para el análisis de los datos.

El material de partida de la criba es el ARNm extraído a partir de diversos tejidos cancerosos diferentes. El ARNm es cuantificado de forma precisa, por ejemplo, fluorométricamente. Como control negativo se aísla el ARN de varios tejidos normales del mismo tipo tisular que el de los tejidos cancerosos que se van a ensayar. Frecuentemente, la(s) muestra(s) tumoral(es) se compara(n) directamente con muestra(s) normal(es) "emparejadas" del mismo tipo tisular, lo que significa que la(s) muestra(s) tumoral(es) y normal(es) se obtienen a partir del mismo individuo.

Los datos del ensayo de la nucleasa 5' se expresan inicialmente como el Ct, o el ciclo umbral. Esto se define como el ciclo en el que la señal indicadora se acumula sobre el nivel de fluorescencia de fondo. Los valores de ΔCt se usan como una medición cuantitativa del número relativo de copias iniciadas en una secuencia objetivo en particular 5 en una muestra de ácido nucleicos cuando se comparan los resultados del ARNm canceroso con los resultados del ARNm humano normal. Como una unidad Ct se corresponde con 1 ciclo de PCR o aproximadamente un aumento relativo de 2 veces con respecto a lo normal, 2 unidades se corresponden con un aumento relativo de 4 veces, 3 unidades se corresponden con un aumento relativo de 8 veces, y así sucesivamente, se puede medir cuantitativamente y cuantitativamente el número de veces de aumento relativo en la expresión del ARNm entre dos o más tejidos diferentes. A este respecto, está bien aceptado en la material que este ensayo es lo suficientemente sensible técnicamente como para detectar de forma reproducible un aumento de al menos dos veces en la expresión del ARNm en una muestra tumoral humana con respecto a un control normal.

EJEMPLO 4

Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* es una técnica potente y versátil para la detección y la localización de secuencias de ácidos nucleicos en preparaciones celulares o tisulares. Puede ser útil, por ejemplo, para la identificación de los sitios de expresión génica, para el análisis de la distribución tisular de la transcripción, para la identificación y la localización de infecciones víricas, para el seguimiento de cambios en síntesis específicas de ARNm y para ayudar en el cartografiado de cromosomas.

La hibridación *in situ* se lleva a cabo siguiendo una versión optimizada del protocolo de Lu y Gillett, Cell Vision 1: 169 - 176 (1994), mediante el uso de ribosondas marcadas con ^{33}P generadas mediante una PCR. En resumen, los tejidos humanos incluidos en parafina fijados con formalina se seccionan, se desparafinizan, se desproteinizan en proteinasa K (20 g/ml) durante 15 minutos a 37 °C, y se procesan adicionalmente para la hibridación *in situ* según se describe en Lu y Gillett, *supra*. Se generan ribosondas antisentido marcadas con [^{33}P] UTP a partir del producto de una PCR y se hibridan a 55 °C durante una noche. Los portaobjetos se sumergen en emulsión de trazado nuclear Kodak NTB2 y se exponen durante 4 semanas.

Síntesis de la ^{33}P -ribosonda

Se ultrasecaron a vacío 6,0 μ l (125 mCi) de ^{33}P -UTP (Amersham BF 1002, SA < 2.000 Ci/mmol). En cada tubo, que contenía ^{33}P -UTP seco, se añadieron los siguientes ingredientes:

- 2,0 μ l de 5x de tampón de transcripción
- 30 1,0 μ l de DTT (100 mM)
- 2,0 μ l de mezcla de NTP (2,5 mM: 10 μ l; cada uno de GTP, CTP y ATP 10 mM + 10 μ l de H₂O)
- 1,0 μ l de UTP (50 μ M)
- 1,0 μ l de Rnasin
- 1,0 μ l de molde de ADN (1 μ g)
- 1,0 μ l de H₂O
- 1,0 μ l de polimerasa de ARN (para los productos de la PCR T3 = AS, T7 = S, habitualmente)

Los tubos se incuban a 37 °C durante una hora. Se añade 1,0 μ l de la DNasa RQ1, seguido de una incubación a 37 °C durante 15 minutos. Se añaden 90 μ l de TE (Tris 10 mM a pH 7,6 / EDTA 1 mM a pH 8,0), y la mezcla se pipeteó en papel DE81. El resto de la solución se carga en una unidad de ultrafiltración Microcon-50, y se rota mediante el uso del programa 10 (6 minutos). La unidad de filtración se invierte sobre un segundo tubo y se rota mediante el uso del programa 2 (3 minutos). Después de la rotación de recuperación final, se añaden 100 μ l de TE. Se pipetea 1 μ l del producto final en papel DE81 y se cuenta en 6 ml de Biofluor II.

La sonda se analiza en un gel de TBE / urea. Se añaden 1 - 3 μ l de la sonda o 5 μ l de ARN Mrk III a 3 μ l del tampón de carga. Después de calendar en un bloque térmico a 95 °C durante tres minutos, la sonda se coloca inmediatamente en hielo. Los pocillos de gel se enjuagan, se carga la muestra y se analiza a 180 - 250 voltios durante 45 minutos. El gel se envuelve con plástico transparente y se expone a una película XAR con una pantalla de intensificación en un congelador a -70 °C durante entre una hora y una noche.

Hibridación de ^{33}P

A. Pretratamiento de las secciones congeladas

Los portaobjetos se sacan del congelador, se colocan en bandejas de aluminio y se descongelan a la temperatura ambiente durante 5 minutos. Las bandejas se colocan en una estufa de incubación a 55 °C durante cinco minutos para reducir la condensación. Los portaobjetos se fijan durante 10 minutos con paraformaldehído al 4 % en hielo en la campana de extracción, y se lavan con 0,5 x SSC durante 5 minutos a la temperatura ambiente (25 ml de 20 x SSC + 975 ml de H₂O SQ). Después de la desproteización con 0,5 µg/ml de proteinasa K durante 10 minutos a 37 °C (12,5 µl de solución madre de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de RNasa sin RNasa precalentado), las secciones se lavan con 0,5 x SSC durante 10 minutos a la temperatura ambiente. Las secciones se deshidratan con etanol al 70 %, al 95 %, al 100 %, 2 minutos con cada uno.

10 B. Pretratamiento de las secciones incluidas en parafina

Los portaobjetos se desparafinizan, se colocan en H₂O SQ y se aclaran dos veces con 2 x SSC a la temperatura ambiente, durante 5 minutos cada vez. Las secciones se desproteizan con 20 µg/ml de proteinasa K (500 µl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de RNasa sin RNasa; 37 °C, 15 minutos) - embrión humano, o con 8 x de proteinasa K (100 µl en 250 ml de tampón de RNasa, 37 °C, 30 minutos) - tejidos en formalina. El posterior aclarado con 0,5 x SSC y la deshidratación se llevan a cabo como se ha descrito anteriormente.

C. Prehibridación

20 Los portaobjetos se dejan en una caja de plástico revestida con papel de filtro saturado con tampón Box (4 x SSC, formamida al 50 %).

D. Hibridación

25 Se calentaron 1,0 x 10⁶ cpm de sonda y 1,0 µl de ARNt (50 mg/ml de solución madre) por portaobjetos a 95 °C durante 3 minutos. Los portaobjetos se enfrían en hielo y se añaden y 48 µl de tampón de hibridación por portaobjetos. Después de agitar vorticialmente se añaden 50 µl de mezcla ³³P a 50 µl de prehibridación en el portaobjetos. Los portaobjetos se incuban durante una noche a 55 °C.

30 E. Lavados

El lavado se lleva a cabo 2 x 10 minutos con 2 x SSC, EDTA a la temperatura ambiente (400 ml de 20 x SSC + 16 ml de EDTA 0,25 M, V_f = 4 l), seguido de un tratamiento con RNasaA a 37 °C durante 30 minutos (500 µl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de RNasa = 20 µg/ml). Los portaobjetos se lavan 2 x 10 minutos con 2 x SSC, EDTA a la temperatura ambiente. Las condiciones de rigurosidad del lavado pueden ser como sigue: 2 horas a 55 °C, 0,1 x SSC, EDTA (20 ml de 20 x SSC + 16 ml de EDTA, V_f = 4 l).

F. Oligonucleótidos

40 Se lleva a cabo un análisis *in situ* sobre varias de las secuencias de ADN divulgadas en el presente documento. Los oligonucleótidos empleados para estos análisis se obtienen de forma que sean complementarios de los ácidos nucleicos (o los complementos de los mismos) según se muestra en las figuras anexas.

EJEMPLO 5

45 Expresión de un anticuerpo anti-Hh en *E. coli*

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glucosilada de un anticuerpo anti-hedgehog mediante su expresión recombinante en *E. coli*.

50 La secuencia de ADN que codifica para las anteriores secuencias de anticuerpos se amplifica inicialmente mediante el uso de cebadores seleccionados de la PCR. Los cebadores deberían contener los sitios de la enzima de restricción que se corresponden con los sitios de la enzima de restricción del vector de expresión seleccionado. Puede emplearse diversos vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es pBR322 (derivado de *E. coli*; véase Bolivar *et al.*, Gene, 2: 95 (1977)) que contiene los genes de resistencia a la ampicilina y a la tetraciclina. El vector es digerido con la enzima de restricción y desfosforilado. Después, las secuencias amplificadas mediante la PCR se ligan en el vector. El vector incluirá preferiblemente las secuencias que codifican para un gen de resistencia a antibióticos, un promotor trp, un líder de polihis (incluyendo los primeros seis codones STII, la secuencia de polihis y el sitio de escisión de la enterocinasa), la región codificante del anticuerpo anti-hedgehog, el terminador de la transcripción lambda y un gen argU.

Después se usa la mezcla de ligación para transformar una cepa seleccionada de *E. coli* mediante el uso de los métodos descritos en Sambrook *et al.*, *supra*. Los transformantes son identificados por su capacidad para crecer en placas LB y entonces se seleccionan las colonias resistentes al antibiótico. Puede aislarse el ADN del plásmido y confirmarse mediante un análisis de restricción y la secuenciación del ADN.

Los clones seleccionados pueden cultivarse durante una noche en medio de cultivo líquido tal como caldo LB complementado con antibióticos. El cultivo de una noche puede usarse posteriormente para inocular un cultivo a una escala mayor. Después las células se cultivan hasta una densidad óptica deseada, durante lo cual se activa el promotor de expresión.

Después de cultivar las células durante varias horas más, las células pueden ser recogidas mediante centrifugación. El sedimento celular obtenido mediante la centrifugación puede ser solubilizado mediante el uso de varios agentes conocidos en la materia, y las cadenas pesada y ligera solubilizadas del anticuerpo anti-hedgehog pueden entonces ser purificadas mediante el uso de una columna quelante de metales en unas condiciones que permitan una fuerte unión de la proteína.

Las anteriores secuencias polipeptídicas de la cadena pesada y ligera pueden ser expresadas en *E. coli* en forma de una etiqueta de poli-His, mediante el uso del siguiente procedimiento. Inicialmente se amplifica el ADN que codifica para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-hedgehog mediante el uso de los cebadores seleccionados de la PCR. Los cebadores concentran los sitios de la enzima de restricción que se corresponden con los sitios de la enzima de restricción del vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionarán un inicio de la traducción eficaz y fiable, una rápida purificación en una columna quelante de metales y la eliminación proteolítica con enterocinas. Las secuencias amplificadas mediante PCR marcadas con poli-His se ligan después en un vector de expresión, que se usa para transformar un hospedador de *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). En primer lugar los transformantes se cultivan en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30 °C con agitación hasta que se alcanza una D.O. 600 de 3 - 5. Después los cultivos se diluyen 50 - 100 veces con medio CRAP (que se prepara mezclando 3,57 g (NH₄)₂SO₄, 0,71 g citrato de sodio · 2 H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g extracto de levadura Difco, 5,36 g de hycase SF Sheffield en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa al 0,55 % (p/v) y MgSO₄ 7 mM) y se cultivan durante aproximadamente 20 - 30 horas a 30 °C con agitación. Las muestras se retiran para verificar la expresión mediante un análisis por SDS- PAGE, y el volumen de cultivo se centrifuga para sedimentar las células. Los sedimentos celulares se congelan hasta su purificación y replegamiento.

La pasta de *E. coli* procedente de entre 0,5 y 1 l de fermentaciones (6 - 10 g de sedimentos) se resuspende en 10 volúmenes (p/v) de guanidina 7 10 M, Tris 20 mM, tampón a pH 8. Se añaden sulfito de sodio sólido y tetratiónato de sodio para crear unas concentraciones finales de 0,1 M y de 0,02 M, respectivamente, y la solución se agita durante una noche a 4 °C. Esta etapa da como resultado una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados mediante una sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 min. El sobrenadante se diluye con 3 - 5 volúmenes del tampón de la columna quelante de metales (guanidina 6 M, Tris 20 mM, a pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micrómetros para clarificar. El extracto clarificado se carga en una columna quelante de metales de 5 ml Qiagen Ni-NTA equilibrada con el tampón de la columna quelante de metales. La columna se lava con tampón adicional que contiene imidazol 50 mM (Calbiochem, Utrol grade), a pH 7,4. La proteína eluye con el tampón que contiene imidazol 250 mM. Las fracciones que contienen la proteína deseada se agrupan y se almacenan a 4 °C. La concentración de proteínas se estima mediante su absorbancia a 280 nm mediante el uso del coeficiente de extinción calculado basándose en su secuencia de aminoácidos.

Las proteínas son replegadas mediante la dilución de la muestra lentamente en tampón de replegado recién preparado que consiste en: Tris 20 mM, a pH 8,6, NaCl 0,3 M, urea 2,5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de replegado se eligen de forma que la concentración final de la proteína esté entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de replegado se agita suavemente a 4 °C durante 12 - 36 horas. La reacción de replegado se inactiva mediante la adición de TFA hasta una concentración final del 0,4 % (un pH de aproximadamente 3). Antes de una purificación adicional de la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se añade acetonitrilo hasta una concentración final del 2 - 10 %. La proteína replegada se cromatografía en una columna de fase inversa Poros R1/H mediante el uso de un tampón móvil de TFA al 0,1 % con elución con un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80 %. Se analizan alícuotas de las fracciones con una absorbancia A280 en geles de poliacrilamida SDS y las fracciones que contienen la proteína replegada homogénea se agrupan. Generalmente, las especies adecuadamente replegadas de la mayoría de las proteínas eluyen a las menores concentraciones de acetonitrilo dado que esas especies son las más compactas, con sus interiores hidrófobos protegidos de la interacción con la resina de la fase inversa. Las especies agregadas habitualmente eluyen a unas mayores concentraciones de acetonitrilo. Además de resolver las formas mal plegadas de las proteínas con respecto a la forma deseada, la etapa en fase inversa también elimina la endotoxina de las muestras.

Las fracciones que contienen la proteína plegada deseada se agrupan y se elimina el acetonitrilo mediante el uso de una corriente suave de nitrógeno dirigida a la solución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mM, a pH 6,8 con cloruro de sodio 0,14 M y manitol al 4 % mediante diálisis o mediante filtración en gel, mediante el uso de resinas G25 Superfina (Pharmacia) equilibradas con el tampón de formulación y filtradas estériles.

EJEMPLO 6

Expresión del anticuerpo anti-hedgehog 5 en células de mamífero

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glucosilada del anticuerpo anti-hedgehog mediante su expresión recombinante en células de mamífero.

El vector pRK5 (véase el documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989), puede ser empleado como vector de expresión. Opcionalmente, se liga el ADN que codifica para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-hedgehog descrito en el presente documento en pRK5 con las enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción de dicho ADN mediante el uso de métodos de ligación tales como los descritos en Sambrook *et al.*, *supra*. El vector resultante se denomina anti-Hh-ADN.

Las células hospedadoras seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se cultivan hasta confluencia en placas de cultivo tisular en un medio tal como DMEM complementado con suero bovino fetal, y opcionalmente con componentes nutrientes y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-anti-Hh con aproximadamente 1 µg del ADN que codifica para el gen VA ARN [Thimmappaya *et al.*, Cell, 31: 543 (1982)] y se disuelven en 500 µl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl₂ 0,227 M. A esta mezcla se añaden, gota a gota, 500 µl de HEPES 50 mM (a pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO₄ 1,5 mM, y se deja formar un precipitado durante 10 minutos a 25 °C. El precipitado se suspende y se añade a las células 293, y se dejan sedimentar durante aproximadamente cuatro horas a 37 °C. El medio de cultivo se elimina mediante aspiración y se añaden 2 ml de glicerol al 20 % en PBS durante 30 segundos. Las células 293 se lavan después con medio exento de suero, se añade medio reciente y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se retira y se sustituye por medio de cultivo (solo) o por medio de cultivo que contiene 200 µCi/ml de ³⁵S-cisteína y 200 µCi/ml de ³⁵S-metionina. Después de una incubación de 12 horas, se recoge el medio condicionado, se concentra sobre un filtro rotatorio y se carga en un gel de SDS al 15 %. El gel procesado puede ser secado y expuesto a una película durante un periodo de tiempo seleccionado para revelar la presencia de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-hedgehog. Los cultivos que contienen las células transfectadas pueden experimentar una incubación adicional (en medio exento de suero) y el medio se ensaya en los bioensayos seleccionados.

Alternativamente, el anticuerpo anti-hedgehog puede ser expresado en células CHO. El pRK5-anti-Hh puede ser transfectado en células CHO mediante el uso de reactivos conocidos, tales como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden ser incubados y el medio sustituido por medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene radiomarcadores tales como ³⁵S-metionina. Después de determinar la presencia del anticuerpo anti-Hh, el medio de cultivo puede ser sustituido por medio exento de suero. Preferentemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días, y después se recoge el medio condicionado. El medio que contiene el anticuerpo anti-Hh expresado puede ser después concentrado y purificado mediante cualquier método seleccionado.

La expresión estable en células CHO se lleva a cabo mediante el uso del siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan en forma de un constructo de IgG (inmunoadhesina), en el que las secuencias codificantes de las formas solubles (por ejemplo, los dominios extracelulares) de las respectivas proteínas están condensadas con la secuencia de la región constante de una IgG1 que contiene los dominios de bisagra, CH2 y CH2 y/o es una forma marcada con poli-His.

Después de la amplificación mediante una PCR, los respectivos ADN son subclonados en un vector de expresión de CHO mediante el uso de las técnicas convencionales según se describe en Ausubel *et al.*, Current Protocols of Molecular Biology, Unidad 3,16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para que tengan sitios de restricción compatibles 5' y 3' del ADN de interés, para permitir el conveniente transporte de los ADNc. El vector usado en la expresión en células CHO es según se describe en Lucas *et al.*, Nucl. Acids Res. 24: 9 (1774 - 1779 (1996), y usa el promotor temprano / potenciador de SV40 para dirigir la expresión del ADNc de interés y de la reductasa de dihidrofolato (DHFR). La expresión de la DHFR permite la selección del mantenimiento estable del plásmido después de la transfección.

Se introducen veinte microgramos del ADN del plásmido deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO mediante el uso de los reactivos de transfección disponibles comercialmente SUPERFECT® (Quiagen), DOSPER® o FUGENE® (Boehringer Mannheim). Las células se cultivan según se describe en Lucas *et al.*, *supra*. Se congelan aproximadamente 3 x 10⁷ células en una ampolla para su crecimiento y producción adicionales, como se describe a continuación.

Las ampollas que contienen el ADN del plásmido se descongelan poniéndolas en un baño de agua y mezclándolas mediante un agitación vorticial. Los contenidos se pipeteen en un tubo de centrifuga que contiene 10 ml de medio, y se centrifugan a 1.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se resuspenden en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado a través de 0,2 µm con un 5 % de suero bovino fetal diafiltrado a través de 0,2 µm). Después las células se alicuotan en un matraz de agitación de 100 ml que contiene 90 ml de medio selectivo. Después de 1 - 2 días, las células se transfieren a un matraz de agitación de 250 ml llenado con 150 ml de medio de crecimiento selectivo, y se incuban a 37 °C. Después de otros 2 - 3 días, los matraces de agitación de 250 ml, de 500 ml y de 2.000 ml se siembran con 3 x 10⁵ células/ml. El medio celular se intercambia por medio reciente

mediante centrifugación y resuspensión en medio de producción. Aunque puede emplearse cualquier medio adecuado para CHO, realmente puede usarse un medio de producción descrito en la Patente de EE.UU. N° 5.122.469, concedida el 16 de junio de 1992. Se siembra un matraz de rotación de producción de 3 l a $1,2 \times 10^6$ células/ml. El día 0, se determina la cifra de pH de las células. El día 1, se toman muestras del matraz de rotación y se comienza la purga con aire filtrado. El día 2, se toman muestras del matraz de rotación, la temperatura se cambia a 33 °C y se toman 30 ml de 500 g/l de glucosa y 0,6 ml de antiespumante al 10 % (por ejemplo, una emulsión de polidimetilsiloxano al 35 %, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion). A lo largo de la producción, el pH se ajusta según sea necesario para mantenerlo alrededor de 7,2. Después de 10 días, o cuando la viabilidad cae por debajo del 70 %, se recoge el cultivo celular mediante centrifugación y se filtra a través de un filtro de 0,22 μ m. El filtrado se almacenó a 4 °C o se cargó inmediatamente en columnas para su purificación.

Para los constructos con la etiqueta de poli-His, las proteínas son purificadas mediante el uso de una columna Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación se añade imidazol al medio condicionado a una concentración de 5 mM. El medio condicionado es bombeado a una columna de 6 ml Ni-NTA equilibrada con Hepes 20 mM, a pH 7,4, tampón que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a un caudal de 4 - 5 ml/min a 4 °C. Después de la carga, la columna se lava con tampón de equilibrado adicional y la proteína eluye con el tampón de equilibrado que contiene imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada es posteriormente desalinizada con un tampón de almacenamiento que contiene Hepes 10 mM, 0, NaCl 14 M y manitol al 4 %, a pH 6,8, en una columna de 25 ml G25 Superfina (Pharmacia) y almacenada a -80 °C.

Los constructos de inmunoadhesina (que contienen Fc) se purifican a partir del medio condicionado como sigue. El medio condicionado es bombeado a una columna de 5 ml de Proteína A (Pharmacia) que ha sido equilibrada con tampón de fosfato de sodio 20 mM, a pH 6,8. Después de la carga, la columna se lava concienzudamente con tampón de equilibrado antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, a pH 3,5. La proteína eluida es inmediatamente neutralizada mediante la recolección de fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 μ l de tampón Tris 1 M, a pH 9. La proteína altamente purificada es posteriormente desalinizada con tampón de almacenamiento como se ha descrito anteriormente para las proteínas con etiquetas de poli-His. La homogeneidad se evalúa mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante la secuenciación de los aminoácidos N-terminales mediante una degradación de Edman.

EJEMPLO 7

Purificación de los anticuerpos anti-Hh mediante el uso de anticuerpos específicos anti-Hh

Los anticuerpos anti-Hh naturales o recombinantes pueden ser purificados mediante diversas técnicas convencionales en la materia de la purificación de proteínas. Por ejemplo, las variantes pro-, madura o pre-polipéptido de las anteriores secuencias de la cadena pesada y ligera son purificadas mediante una cromatografía de inmunofinidad mediante el uso de anticuerpos específicos para dichas secuencias. En general, una columna de inmunofinidad se construye mediante el acoplamiento covalente de las respectivas cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-Hh a una resina cromatográfica activada.

Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de los sueros inmunes bien mediante una precipitación con sulfato de amonio o bien mediante una purificación sobre Proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N. J.). Asimismo, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de líquido de ascitis de ratón mediante una precipitación con sulfato de amonio o una cromatografía sobre Proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada es unida covalentemente a una resina cromatográfica tal como SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Dicha columna de inmunofinidad se utiliza en la purificación de las anteriores secuencias pesada y ligera mediante la preparación de una fracción a partir de las células que contienen dichas secuencias en una forma soluble. Esta preparación se deriva mediante la solubilización del total de células o de una fracción subcelular obtenida a través de una centrifugación diferencial mediante la adición de detergente o mediante otros métodos bien conocidos en la materia. Alternativamente, el polipéptido soluble de la cadena pesada y ligera que contiene una secuencia de señalización puede ser secretado en una cantidad útil en el medio en el que se cultivan las células.

Se hacen pasar las preparaciones solubles de la cadena pesada y ligera a través de la columna de inmunofinidad, y la columna se lava en unas condiciones que permitan la absorbanza preferente de dichas secuencias (por ejemplo, tampones con una fuerza iónica elevada en presencia de detergente). Después la columna se eluye en unas condiciones que rompen la unión entre el anticuerpo / sustrato (por ejemplo, un tampón a pH bajo, tal como de aproximadamente pH 2 - 3, o una elevada concentración de un caotrópico tal como urea o ión tiocianato), y se recoge el polipéptido de la cadena pesada y/o ligera, respectivamente.

EJEMPLO 8

Inmunohistoquímica mediante el uso de anticuerpos anti-Hh

Diseño experimental: analizamos la expresión de la proteína del ligando Hh en carcinomas colorrectales y de ovario mediante el uso de 1 µg/ml y 5 de µg/ml del anticuerpo 95,9. Se tiñeron 20 carcinomas colorrectales y 20 carcinomas de ovario con 1 µg/ml y 5 µg/ml del anticuerpo 95,9 anti-Hh mediante el uso de un protocolo establecido previamente. Se empleó un sistema de puntuación tanto numérico como alfanumérico para capturar la cantidad de tinción epitelial del tumor. El sistema de puntuación numérico estima el nivel total de tinción de cada muestra (0 = no hay tinción, 1 = débil, 2 = moderada, 3 = fuerte). La puntuación alfanumérica captura 1) el % del epitelio tumoral que muestra cualquier nivel de tinción (0 = no hay tinción, 1 = < 25 %, 2 = 25 - 75 %, 3 = > 75 %) y 2) la intensidad predominante de la tinción (A = débil, B = moderada, C = fuerte). Los tumores que muestran menos del 5 % del epitelio tumoral teñido reciben una puntuación de 0. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Averiguamos que se observaba un mayor intervalo de intensidad de tinción con 5 µg/ml del anticuerpo primario. También encontramos la tinción de Shh en las células del tubo neural con 95,5 y en las células de cáncer de ovario, pero no en el tejido ovárico normal. Por lo tanto, el mAb 95,5 es un anticuerpo útil y sensible para su uso diagnóstico en el cáncer, particularmente en una tinción inmunohistoquímica.

Tabla 2. Hallazgos histológicos

Tumores de colon			Tumores de ovario		
Nº de muestra	IHC (1 µg/ml)	IHC (5 µg/ml)	Nº de muestra	IHC (1 µg/ml)	IHC (5 µg/ml)
1	1 (1 A)	1 (3 A)	21	0	1 (1 B)
2	1 (3 A)	2 (3 A)	22	1 (2 A)	2 (2 B) punteado
3	0	1 (2 A)	23	0	1 (2 A)
4	1 (2 A)	2 (3 B)	24	1 (1 A)	1 (1 B)
5	0	0	25	0	1 (3 A)
6	1 (2 A)	2 (3 B)	26	0	1 (2 A) punteado
7	0	1 (3 A)	27	2 (2 B)	2 (2 C)
8	0	1 (2 A)	28	1 (2 A)	2 (2 B) punteado
9	0	1 (2 A)	29	0	1 (3 A)
10	0 (focalmente fuerte)	1 (3 A) (focalmente fuerte)	30	0	1 (2 A)
11	0	1 (3 A)	31	0	1 (2 A)
12	0	0	32	0	1 (2 A)
13	0	2 (3 A)	33	0	1 (2 A)
14	0	1 (2 A)	34	0	1 (1 A)
15	1 (1 B)	2 (2 B)	35	0	1 (3 A) punteado estromal
16	0	0	36	0	0
17	0	1 (2 A)	37	0	1 (2 A)
18	0	1 (2 A)	38	0	1 (2 A)
19	1 (3 A)	2 (3 B)	39	0	1 (1 A)
20	0	1 (2 A)	40	0	1 (3 A)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genentech Inc. Scales, Suzanna J.

<120> Anticuerpos anti-Hedgehog

<130> P4137R1 WO

<150> 61/017.232

<151> 28-12-2007

<150> 61/099.864

<151> 24-09-2008

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

ES 2 551 736 T3

<400> 1

Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly Ser
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser
20

5 <210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <400> 2

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser
1 5 10

15 <210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <400> 3

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Ser Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10

25 <210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 4

Gly Gly Ile Leu Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
1 5 10 15

30 Ser

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 5

Arg Ser Thr Ile Thr Lys Asn Thr Asn Leu Asn Thr Val Thr Leu Lys
1 5 10 15

Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
20 25 30

40 <210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

45

ES 2 551 736 T3

<400> 6

Ala Arg Gly Ile Tyr Pro Val Gly Thr Asn Tyr Asn Ile
1 5 10

5

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10

<400> 7

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
1 5 10

15

<210> 8
<211> 322
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20

<400> 8

Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp
1 5 10 15

Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu
20 25 30

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

ES 2 551 736 T3

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro
275 280 285

Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His
290 295 300

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro
305 310 315 320

Gly Lys

<210> 9
<211> 24
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 9

Asp Ile Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val
1 5 10 15

Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys
20

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 10

Gln Ser Ser Pro Ser Val Tyr Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 11

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 12

Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1

5

<210> 13

ES 2 551 736 T3

<211> 32
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5 <400> 13

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Lys	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr
1				5					10					15	
Leu	Thr	Ile	Ser	Asp	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
			20					25					30		

10 <210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15 <400> 14

Ala	Gly	Gly	Tyr	Ile	Asp	Thr	Ser	Asp	Thr	Ala
1				5					10	

20 <210> 15
<211> 114
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 15

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

100 105 110

25 Asp Cys

ES 2 551 736 T3

<210> 16
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 16

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

10

<210> 17
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 17

ES 2 551 736 T3

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

<210> 18
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 18

Cys Gly Pro Gly Arg Gly Pro Val Gly Arg Arg Arg Tyr Ala Arg Lys
 1 5 10 15
 Gln Leu Val Pro Leu Leu Tyr Lys Gln Phe Val Pro Gly Val Pro Glu
 20 25 30

ES 2 551 736 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-hedgehog que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende las regiones de unión al antígeno HCHVR1 que comprenden la secuencia de aminoácidos del ID. SEC. Nº: 2, HCHVR2 que comprende la secuencia de aminoácidos del ID. SEC. Nº: 4 y HCHVR3 que comprende la secuencia de aminoácidos del ID. SEC. Nº: 6, y en el que la cadena ligera comprende las regiones de unión al antígeno LCHVR1 que comprenden la secuencia de aminoácidos del ID. SEC. Nº: 10, LCHVR2 que comprende la secuencia de aminoácidos del ID. SEC. Nº: 12 y LCHVR3 que comprende la secuencia de aminoácidos del ID. SEC. Nº: 14.
2. El anticuerpo anti-hedgehog de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es 95,9 y tiene la secuencia de anticuerpo maduro mostrada en la Figura 11.
3. Un método para detectar la expresión hedgehog en un tejido extraído a partir de un hospedador antes de la detección, que comprende la detección de la expresión hedgehog en dicho tejido poniéndolo en contacto con el anticuerpo anti-hedgehog de la reivindicación 1, y la medición del grado de unión.
4. Un método para el cribado de pacientes con un crecimiento tisular anormal para evaluar el riesgo de desarrollar cáncer, que comprende la determinación de si dicho tejido sobreexpresa hedgehog con el anticuerpo anti-hedgehog de la reivindicación 1, que comprende poner en contacto dicho tejido con dicho anticuerpo anti-hedgehog y la medición del grado de unión, en el que dicho tejido se extrae del paciente antes de la determinación.
5. El método de las reivindicaciones 3 o 4, en el que el tejido es un tumor o un cáncer.
6. Un método para la identificación de tumores sensibles a los antagonistas hedgehog en un tejido tumoral o en un tejido próximo al tumor, tejido tumoral o tejido próximo al tumor que se extraen del hospedador antes de la identificación, comprendiendo el método poner en contacto el tejido tumoral o el tejido próximo al tumor con el anticuerpo anti-hedgehog de la reivindicación 1, y determinar si el hedgehog está sobreexpresado en dicho tejido, en comparación con el tejido normal.
7. El método de las reivindicaciones 3, 4 o 6, en el que el tejido se extrae de un paciente antes de la determinación y en el que la muestra de tejido está opcionalmente en FFPE antes de ponerla en contacto con el anticuerpo anti-hedgehog.
8. El método de las reivindicaciones 3, 4 o 6, en el que la detección o la determinación se llevan a cabo mediante el uso de un método seleccionado de entre el grupo que consiste en una IHC y una inmunotransferencia Western.
9. El método de las reivindicaciones 3, 4 o 6, en el que el anticuerpo anti-hedgehog no compite con ptch por la unión al Shh.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo anti-hedgehog es 95,9 y tiene la secuencia de anticuerpo maduro mostrada en la Figura 11.
11. Un antagonista hedgehog para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un paciente, método que comprende el tratamiento del paciente con el antagonista hedgehog, en donde en el método se ha determinado que un tumor y/o un tejido próximo al tumor del paciente sobreexpresan el hedgehog mediante un método que comprende:
 - (a) poner en contacto un tumor y/o un tejido próximo al tumor extraído del paciente con el anticuerpo anti-hedgehog de la reivindicación 1,
 - (b) detectar la presencia de la expresión hedgehog,
 - (c) comparar la expresión hedgehog con la del tejido normal o la de un tejido del mismo tipo u origen no asociados al tumor, para determinar si el hedgehog está sobreexpresado.
12. Un antagonista hedgehog para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un paciente, método que comprende el tratamiento del paciente con el antagonista hedgehog, en donde en el método se ha determinado que el tejido sospechoso de ser canceroso o el tejido próximo a dicho tejido de dicho paciente sobreexpresa el hedgehog mediante un método que comprende (a) poner en contacto el tejido sospechoso de ser canceroso o el tejido próximo a dicho tejido de dicho paciente con el anticuerpo anti-hedgehog de la reivindicación 1; y (b) determinar si el hedgehog está sobreexpresado.
13. El antagonista hedgehog para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, en donde el tejido se extrae del paciente antes de la determinación y en donde el tejido está opcionalmente en FFPE antes de ponerlo en contacto con el anticuerpo anti-hedgehog.
14. El antagonista hedgehog para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, en donde la determinación o la

detección de si el hedgehog está sobreexpresado en un tejido se lleva a cabo mediante el uso de un método que se selecciona de entre el grupo que consiste en: una IHC y una inmunotransferencia Western.

5 15. El antagonista hedgehog de las reivindicaciones 11 o 12, en donde el anticuerpo anti-hedgehog no compite con ptch por la unión al Shh.

16. El antagonista hedgehog para el uso para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12 en donde el anticuerpo anti-hedgehog es 95,9 y tiene la secuencia de anticuerpo maduro mostrada en la Figura 11.

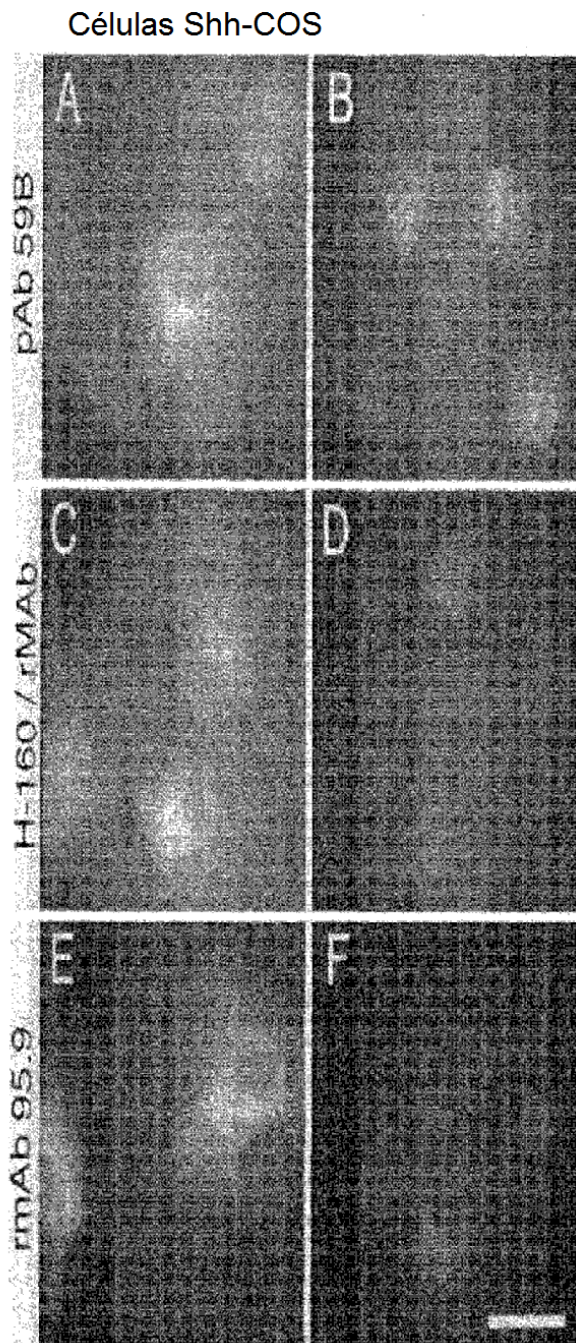


Figura 1

B, F COS no transfectadas
D rMab irrelevante en Shh-COS

H-160 = anti hShh de conejo
Sc-9024 de Santa Cruz Biotech

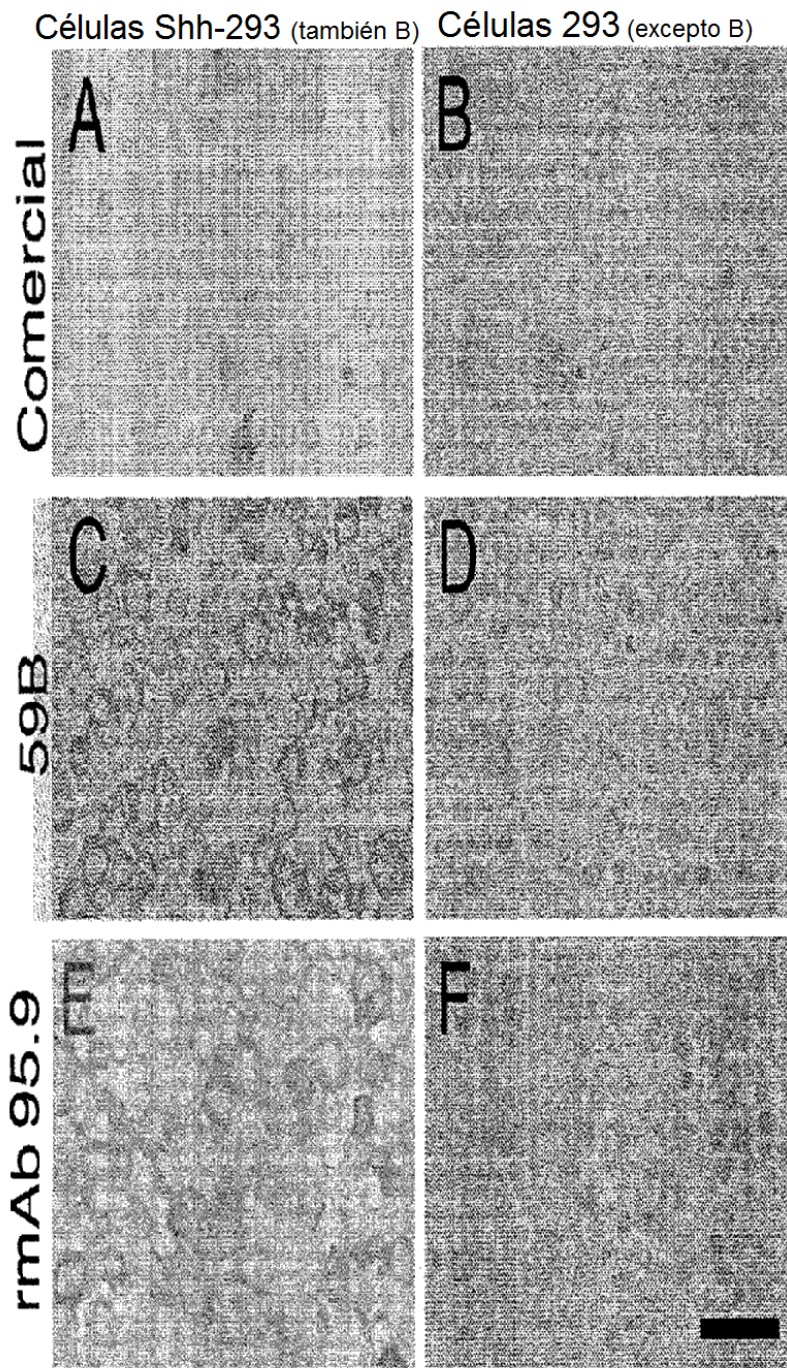


Figura 2

Figura 3

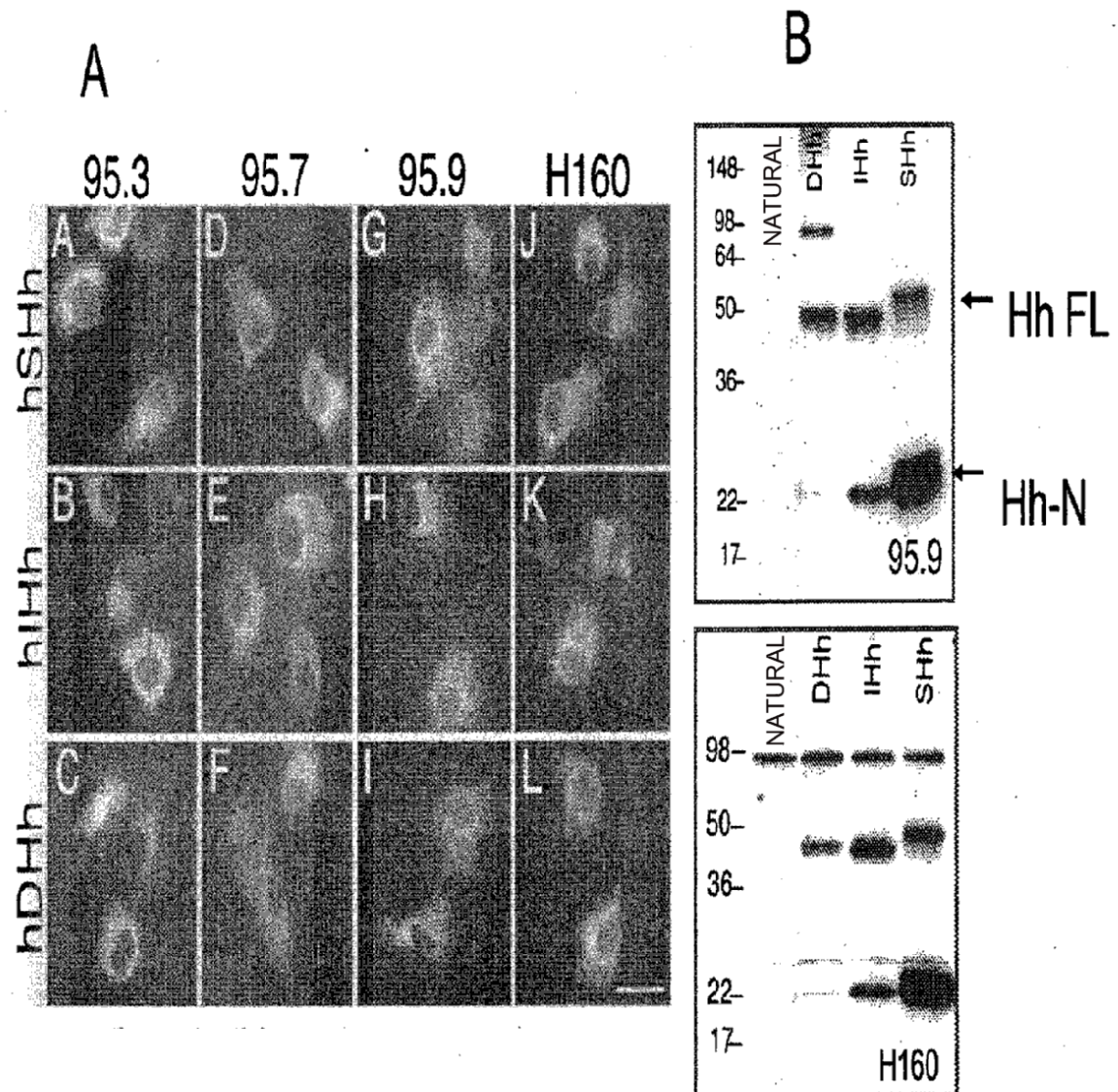
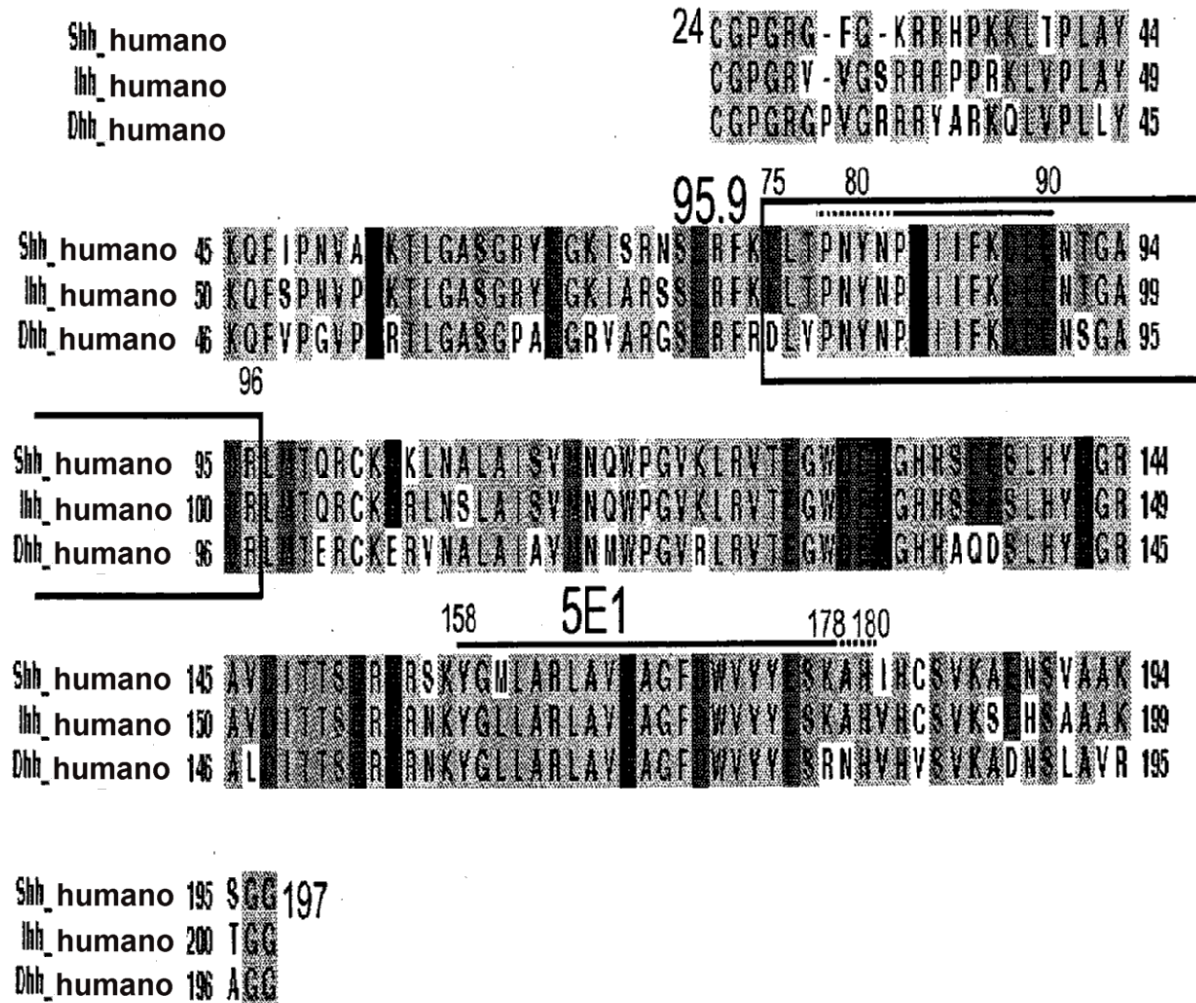


Figura 5



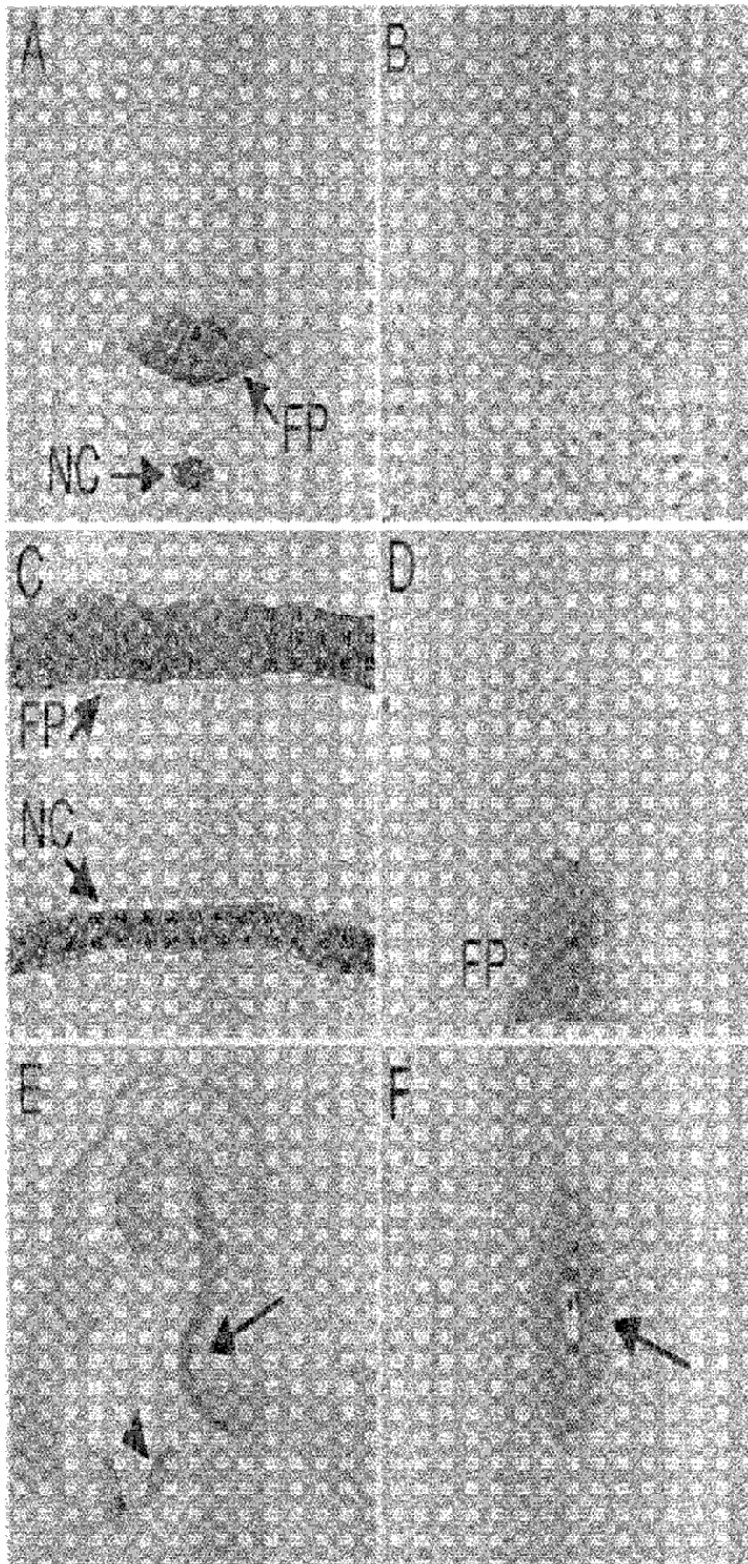
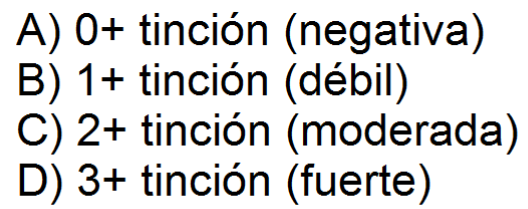


Figura 6



E

Coeficiente de Spearman = $-0,610$ ($p = 0,0001$)

Delta Ct

Puntuación histológica

Figura 8

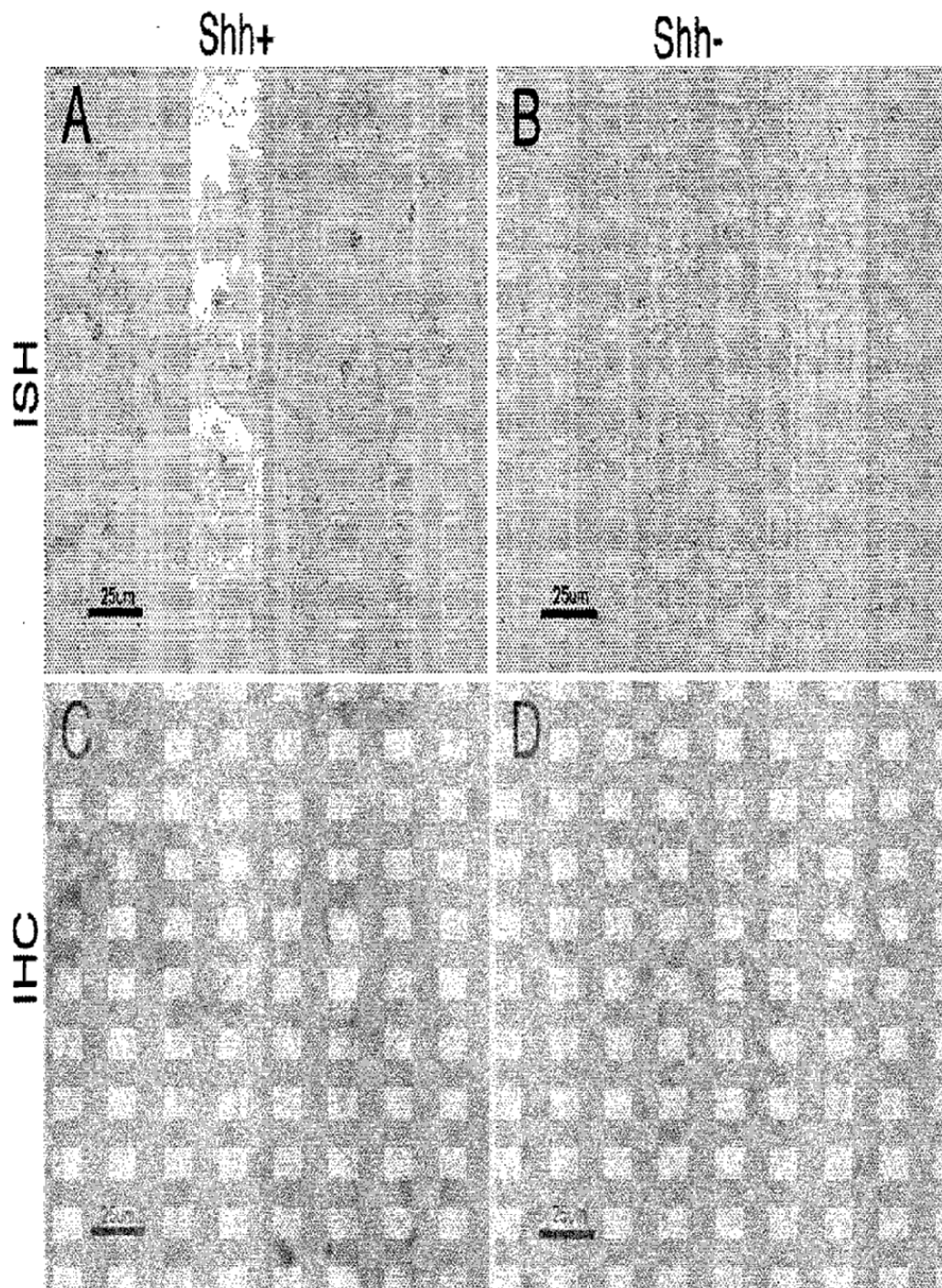


Fig 9A

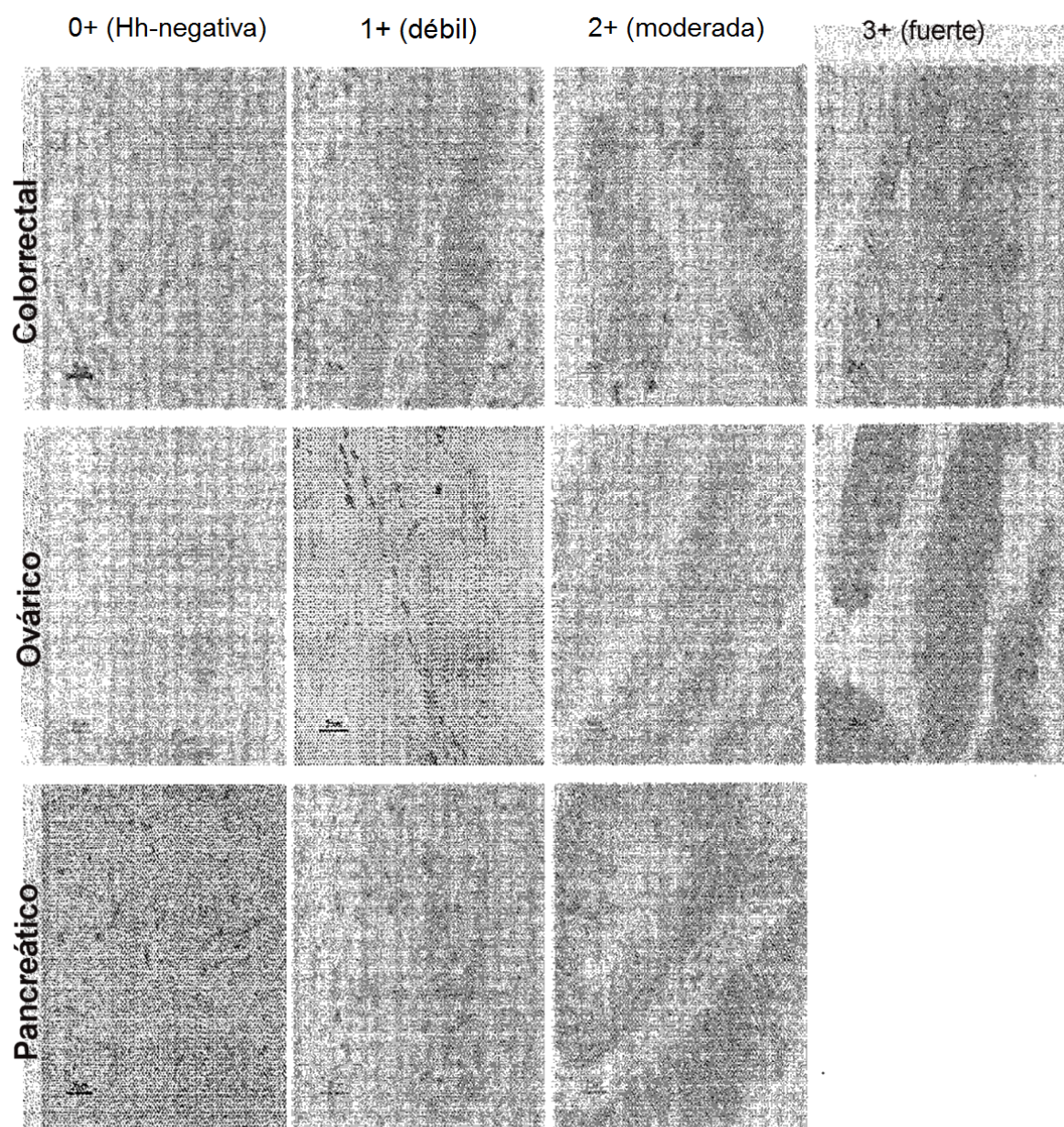


Fig 9B

	Puntuación de la IHC								Total
	0		1		2		3		
	n	frec	n	frec	n	frec	n	frec	n
Adenocarcinoma de colon	18	18%	68	69%	10	10%	3	3%	99
CRC metastásico	10	20%	38	76%	2	4%	0	0%	50
Adenocarcinoma de ovario	5	7%	41	57%	22	31%	4	6%	72
Tumores pancreáticos	24	23%	74	70%	7	7%	0	0%	105

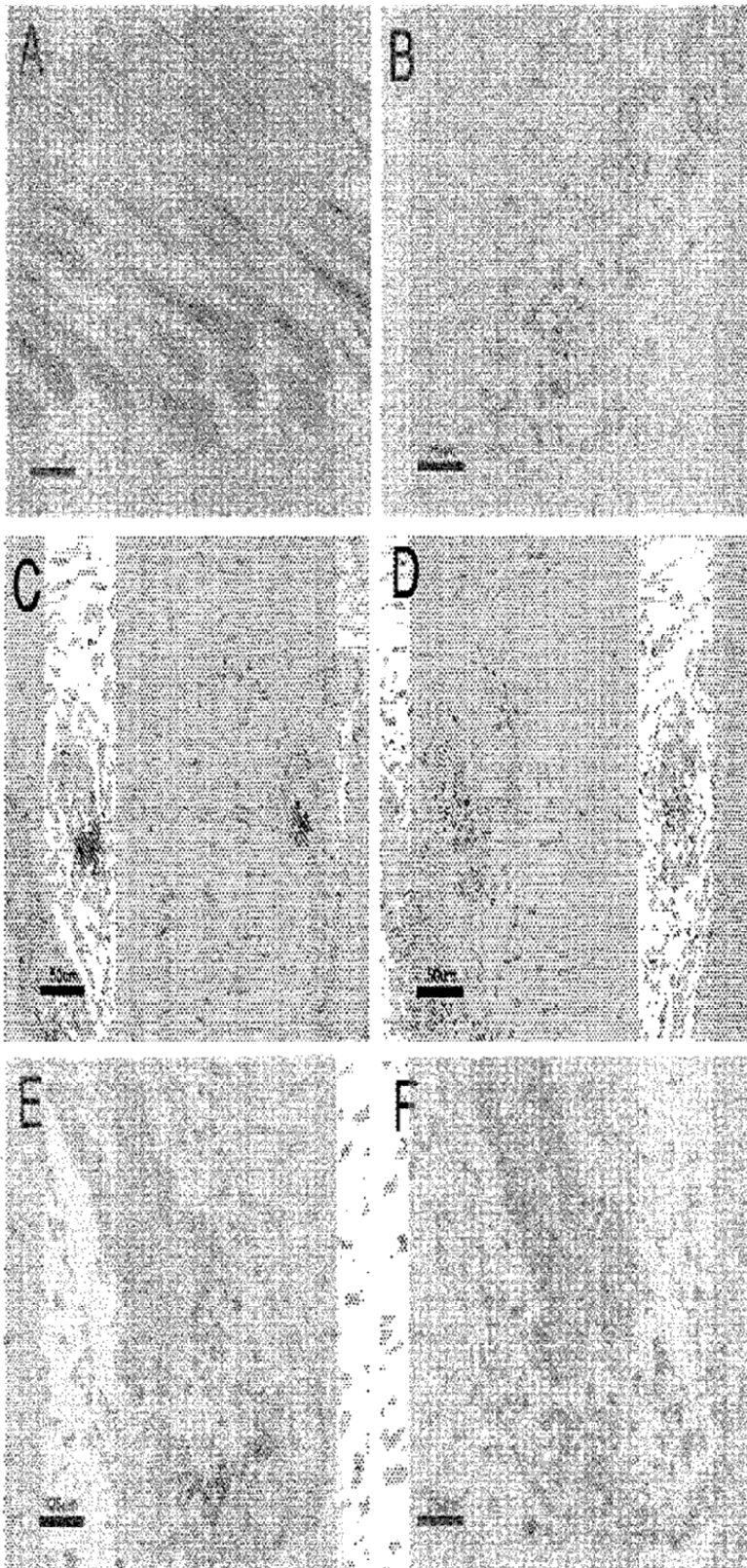


Figura 10

Fig 11A

Secuencia de señalización (de GNE)

• MGWSCIIFLVATATGAYAQSVKESGGGLVQPEGSLTLCTVS
 CDR1 GFSLSSYDMSWVRQAPGSGLEWIGGILSGGSAYYASWAKSR
 STITKNTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARGIYPVGTNYNNG
 CDR2 PGT^{**}LVTVSSG**QPKAPSVFPLAPCCGDTPTSSTVTLGCLVKGY
 CDR3 LPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSS
 SQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSK*PTCPPPELLGGPS
 VFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNE
 QVRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVH
 NKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTC
 MINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGSYFLYSK
 LSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

** Inicio de un esqueleto de la región de constante del anticuerpo de ratón

* Inicio de la región Fc

Fig 11B

Secuencia de señalización (de GNE)

• MGWSCIILFLVATATGVHSDIAVLTQTPSPVSAAVG
CDR1 GTVTINQSSPSVYSNYLAWYQQKPGQPPKLLI
CDR2 YYASTLASGVPSRFGSGSGTEFTLTISDLECADAA
CDR3 TYYCAGGYIDTSDTAFGGGTEVWVGDPVAPTVLIF
PPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTT
QTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNCHK
EYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC

Fig 12

Clon 95.9



Clon 95.9

