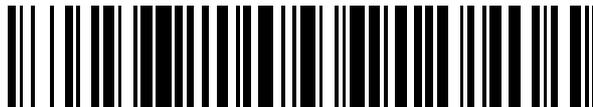


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 981**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2011 PCT/US2011/054877**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2012 WO12047968**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2011 E 11770024 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2625197**

54 Título: **Smoothened mutante y métodos de uso de la misma**

30 Prioridad:

05.10.2010 US 389995 P

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

08.11.2016

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (50.0%)

1 DNA Way

South San Francisco CA 94080-4490, US y

CURIS, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

DE SAUVAGE, FREDERIC J.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 588 981 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

Smoothened mutante y métodos de uso de la misma

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a ácidos nucleicos y proteínas SMO mutantes aislados relacionados con la resistencia de los tumores a la quimioterapia y a métodos de cribado de compuestos que se unen a mutantes SMO o modulan la actividad de SMO y a diagnósticos y terapias contra el cáncer y en particular a la detección de mutaciones que son diagnósticas y/o pronósticas y tratamiento de tumores resistentes a fármacos.

10 **Antecedentes de la invención**

La terapéutica del cáncer dirigida molecular ha mostrado una actividad impresionante en la clínica. Algunos de los ejemplos más señalados incluyen el inhibidor de la tirosina cinasa imatinib en la leucemia mieloide crónica positiva al cromosoma Filadelfia (LMC) o tumores del estroma gastrointestinal con KIT/PDGFR mutante (TEGI) y erlotinib en el cáncer de pulmón no microcítico con EGFR mutante (CPNM) (Krause, D.S. y R.A. Van Etten (2005) *N. Engl. J. Med.* 353(2):172-187). El tratamiento con estos agentes ha conducido a respuestas antitumorales espectaculares en las poblaciones de pacientes que albergan estas anomalías moleculares. Sin embargo, a pesar de las respuestas clínicas iniciales impresionantes, la mayoría de los pacientes con el tiempo progresan debido a la adquisición de resistencia a fármacos (Engelman, J.A. y J. Settleman (2008) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18(1):73-79). La identificación de los mecanismos de resistencia, en consecuencia, ha abierto la puerta a combinaciones de fármacos más racionales y al desarrollo de inhibidores de "segunda generación" que potencialmente pueden superar o evitar la aparición de resistencias.

El meduloblastoma es un tumor neuroectodérmico primitivo del cerebelo que representa el tumor maligno cerebral más habitual en niños (Polkinghorn, W.R. y N.J. Tarbell (2007) *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 4(5):295-304). A pesar de las mejoras en las tasas de supervivencia, los efectos secundarios debilitantes de la radiación adyuvante representan un desafío clínico de gran importancia, confirmando de este modo la necesidad de nuevas terapias dirigidas moleculares.

Se ha implicado directamente a la vía de señalización de Hedgehog (Hh) en la patogenia del meduloblastoma. Se ha demostrado la presencia de señalización Hh constitutiva, con mucha frecuencia debido a las mutaciones de pérdida de función subyacentes en el receptor inhibidor PTCH1, en aproximadamente el 30 % de los casos esporádicos (Zurawel, R.H. *et al.* (2000) *Genes Chromosomes Cancer* 27(1):44-51; Kool, M. *et al.* (2008) *PLoS ONE* 3(8):e3088; Dellovade, T. *et al.* (2006) *Annu. Rev. Neurosci.* 29:539; Rubin, L.L. y F.J. de Sauvage (2006) *Nat. Rev. Drug Discov.* 5:1026). Los ratones heterocigotos para Ptch1 (Ptch1^{+/-}) pueden desarrollar espontáneamente el meduloblastoma y el tratamiento con inhibidores de la vía de Hh da como resultado la eliminación del tumor y la supervivencia prolongada (Goodrich, L.V. *et al.* (1997) *Science* 277(5329):1109-1113; Romer, J.T. *et al.* (2004) *Cancer Cell* 6(3):229-240). Sin embargo, recientemente se ha observado que un paciente tratado con el nuevo inhibidor de la vía de Hh, GDC-0449, mostró inicialmente una respuesta espectacular al tratamiento (Charles M. Rudin *et al.* (2009) *N. Engl. J. Med.* (presentado), para luego fracasar en la obtención de una respuesta duradera al tratamiento y una recaída del tumor.

45 Existe una necesidad urgente en la técnica de encontrar compuestos que modulen la actividad de la SMO en dichas proteínas SMO mutantes para superar la resistencia a fármacos tras el tratamiento con GDC-0449. Existe además una necesidad de un método para diagnosticar pacientes que puedan ser resistentes al tratamiento, ya sea a través de la variación natural de su genotipo SMO o a través de la mutación y la resistencia adquiridas.

50 **Sumario de la invención**

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

55 La invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una proteína SMO mutante. Las moléculas de ácido nucleico codifican una secuencia de aminoácidos que es al menos en un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 en la que el aminoácido en la posición 518 de la SEQ ID NO: 2 es alanina (A) o lisina (K). También se desvela la secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos parental de SEQ ID NO: 3 (SMO de tipo silvestre), pero que contiene una mutación o mutaciones en las posiciones 1552, 1553 y/o 1554 que cambia el aminoácido codificado de ácido glutámico (E) a un aminoácido diferente. Las mutaciones pueden dar como resultado un cambio de ácido glutámico (E) a alanina (A) o lisina (K).

65 En otro aspecto, la invención proporciona sondas de ácido nucleico capaces de hibridarse específicamente a un ácido nucleico que codifica una proteína SMO mutada o un fragmento de la misma, que incorpora una mutación en el aminoácido 518 de la SMO como se establece en las reivindicaciones. La sonda es complementaria al ácido nucleico que codifica la SMO mutada o dicho un fragmento de la misma. La sonda puede tener una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos. En algunas realizaciones, la sonda puede marcarse de

forma detectable. La sonda se une de forma diferencial a la Smo mutante por encima de la Smo de tipo silvestre (que tiene un ácido glutámico en la posición 518).

5 La invención también proporciona una proteína SMO mutante aislada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos en un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 en la que la secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido en la posición 518 distinto del ácido glutámico (E). El aminoácido en la posición 518 es alanina (A) o lisina (K).

10 La invención proporciona además un anticuerpo que se une específicamente a la proteína SMO mutante de la invención en el que el epítipo del anticuerpo está presente en una SMO mutante que tiene un aminoácido distinto del ácido glutámico en la posición 518, pero no se une a la SMO de tipo silvestre tal como se establece en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une con alta afinidad a la SMO mutante, pero no se une con alta afinidad a la SMO de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, un Fab, un Fab', un F(ab')₂ o un fragmento Fv). En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un marcador detectable. En otras realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico, tal como, pero no limitado a un agente quimioterápico, una toxina o un isótopo radioactivo. En algunas realizaciones, el anticuerpo inhibe la actividad de la SMO. En otras realizaciones, el anticuerpo inhibe la actividad solamente de la SMO mutante.

20 También se proporciona en el presente documento un método de detección de un gen SMO mutado en una muestra que comprende la amplificación a partir de una muestra de un ácido nucleico que codifica el extremo carboxi del dominio 7 transmembrana de la SMO, o un fragmento de la misma que se sospecha que contiene una mutación y la comparación de la movilidad electroforética del ácido nucleico amplificado con la movilidad electroforética del correspondiente gen SMO de tipo silvestre o un fragmento del mismo. La movilidad electroforética puede determinarse sobre gel de poliacrilamida. En dichas realizaciones, la movilidad electroforética del Smo mutante puede diferenciarse de la del Smo de tipo silvestre.

30 También se proporciona en el presente documento un método de identificación de al menos una mutación SMO en una muestra que comprende poner en contacto un ácido nucleico de la muestra con una sonda de ácido nucleico que sea capaz de hibridarse específicamente a un ácido nucleico que codifique una proteína SMO mutada o un fragmento de la misma que incorpore una mutación y detectar la hibridación. En algunas realizaciones, el método detecta una mutación en la porción carboxi-terminal del dominio 7 transmembrana de la SMO. En algunas realizaciones, la mutación de la SMO se produce en el Smo en las posiciones 1552, 1553 y/o 1554 (que codifican aminoácidos en la posición 518) en la que la mutación da como resultado un codón que codifica un aminoácido distinto del ácido glutámico. En algunas realizaciones la sonda está marcada de forma detectable. En algunas realizaciones la sonda es un oligómero no codificante. En algunas realizaciones el ácido nucleico del gen SMO, o un fragmento del mismo, en la muestra se amplifica y se pone en contacto con la sonda.

40 La invención también proporciona un método para identificar un tumor en un sujeto humano que sea resistente al menos parcialmente al tratamiento con GDC-0449 que comprende determinar la presencia de un gen SMO mutado o proteína SMO mutada en una muestra del tumor en el que dicha mutación se localiza en el gen SMO que codifica una porción de la SMO en la superficie de la membrana extracelular (por ejemplo, la porción carboxi-terminal del dominio 7 transmembrana de la SMO) por lo que la presencia del gen mutado SMO o la proteína SMO mutada indica que el tumor es resistente al menos parcialmente al tratamiento con GDC-0449. La mutación se encuentra en una porción del gen SMO que codifica el aminoácido 518 de la SMO. La mutación provoca un cambio en el aminoácido 518 de la SMO de Glu a alanina (A) o lisina (K).

50 También se proporciona un método para identificar un tumor en un sujeto humano que sea susceptible al tratamiento con un inhibidor de la SMO que comprende (i) determinar la presencia de una proteína o gen SMO de tipo silvestre en una muestra del tumor por lo que la presencia de una proteína SMO o gen de tipo silvestre indica que el tumor es susceptible al tratamiento con un inhibidor de la SMO o (ii) determinar la presencia de una proteína o un gen SMO mutados en una muestra del tumor en la que la mutación da como resultado un cambio de aminoácido en la posición 518 de la SMO, por lo que la presencia de una proteína o un gen SMO mutados indica que el tumor no es susceptible al tratamiento con un inhibidor de la SMO tal como GDC-0449. En algunas realizaciones, la mutación de la SMO es un cambio del ácido glutámico (E) 518 a cualquier otro aminoácido. En algunas realizaciones, el aminoácido es alanina (A) o lisina (K).

60 También se proporciona un método para determinar el pronóstico de la paciente que está siendo tratado por un tumor dependiente de Hedgehog que comprende determinar en una muestra de un tumor la presencia o ausencia de una mutación en el aminoácido 518, según el cual la presencia de la mutación indica peor pronóstico en comparación con la ausencia de dicha mutación usando ciertos inhibidores de Smo.

65 La invención proporciona además un método de cribado de compuestos que inhiban la señalización de una proteína SMO mutante que incorpora una mutación en el aminoácido 518 que comprende poner en contacto la SMO mutante con un compuesto de ensayo y detectar la unión del compuesto a la SMO mutante, según el cual la unión del

compuesto de ensayo a la SMO mutante indica que el compuesto de ensayo es un inhibidor de la SMO mutante.

La invención también proporciona un método de cribado de compuestos que inhiban la señalización de una proteína SMO mutante que incorpora una mutación en el aminoácido 518 que comprende poner en contacto una célula que expresa el SMO mutante con un compuesto de ensayo y detectar la actividad de Gli en la célula, según el cual la presencia de actividad Gli indica que el compuesto de ensayo no es un inhibidor de la SMO mutante. En algunas realizaciones, la actividad Gli se mide usando una proteína Gli que está conjugada con un marcador detectable. En algunas realizaciones, el marcador detectable es un marcador fluorescente (por ejemplo, luciferasa).

También se proporciona en el presente documento un método para tratar el cáncer mediante la administración a un paciente que lo necesite de un compuesto que se une específicamente a la SMO que tiene una sustitución de aminoácido (mutación) en la posición 518. En algunas realizaciones, la proteína SMO mutante comprende la sustitución del ácido glutámico en 518 por cualquier otro aminoácido. En algunas realizaciones, el otro aminoácido es alanina (A) o lisina (K). En algunas realizaciones el compuesto es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el compuesto es una molécula pequeña que tiene la fórmula estructural de Fórmula I, Fórmula II y/o Fórmula III (véase a continuación).

También se proporciona en el presente documento un método para retrasar o prevenir la mutagénesis inducida por fármacos, que comprende administrar un inhibidor de la SMO y un inhibidor de la PI3K. En algunas realizaciones, el inhibidor de la SMO es GDC-0449. En algunas realizaciones, el inhibidor de la SMO es un inhibidor de una SMO mutante que tiene una sustitución de aminoácido en la posición 518. En algunas realizaciones, el inhibidor de la SMO mutante es un compuesto que tiene la fórmula estructural de Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III (véase a continuación).

25 Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra que E518 es un resto novedoso importante para la inhibición de la SMO por GDC-0449. **Panel A:** Representación esquemática de la SMO humana. Las regiones marcadas por mutagénesis de rastreo con alanina se indican en gris claro. Los aminoácidos importantes para la unión de GDC-0449 se muestran en negro, mientras que los restos críticos para la actividad del fármaco están en gris; **Panel B:** actividad de indicador *Gli*-luciferasa de células CH310T1/2 transfectadas con construcciones de SMO indicadas después de una respuesta a la dosis de GDC-0449. Los valores se normalizaron a los niveles máximos de actividad y representan las medias \pm las DE.

La **Figura 2** muestra que los Compuestos 4 (Fórmula II) y 5 (Fórmula III) son antagonistas SMO-D473H y E518K potentes con buenas propiedades farmacocinéticas en ratones. **Panel A:** estructuras químicas de diversos antagonistas de SMO utilizados en este estudio. Los círculos marcan los anillos A-, B- y C- de algunos compuestos como se indica para HhAntag. **Panel B:** compuestos cribados a $1\ \mu\text{M}$ con valores de % de inhibición de la actividad *Gli*-luciferasa inducida por sobreexpresión de SMO-WT, SMO-D473H o E518K en células C3H10T1/2; **Panel C:** concentración plasmática media frente al tiempo después de una sola dosis oral de 100 mg kg⁻¹ ya sea del compuesto 4 (cuadrados) o del compuesto 5 (triángulos) en ratones (n = 24; tres animales por punto temporal). El compuesto 4 estructuralmente similar, pero más potente se elimina más rápidamente del torrente sanguíneo que el compuesto 5 ($t_{1/2}$ de 21/2 frente a 22 horas).

45 Descripción detallada

La presente invención se expone en las reivindicaciones.

Es un descubrimiento de la presente invención que los acontecimientos mutacionales asociados a la resistencia a la quimioterapia para tumores dependiente de Hedgehog se producen en Smoothed (SMO) que transmite la resistencia de los tumores al tratamiento con compuestos que inhiben la señalización de hedgehog, tales como la ciclopamina y GDC-0449. La presente invención proporciona composiciones y métodos que son útiles como pronóstico, diagnóstico y terapéutica para el cáncer que es dependiente de la señalización de Hedgehog.

Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en el presente documento en general se entienden bien y se emplean habitualmente usando la metodología convencional por los expertos en la materia, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual 3rd. edition* (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, *et al.* eds., (2003)); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual* y *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths y D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987);

5 *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan *et al.*, eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995) y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V. T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

10 Para los fines de la interpretación de la presente memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando sea apropiado, los términos utilizados en singular incluirán también el plural y viceversa. En el caso de que cualquier definición que se expone a continuación entre en conflicto con cualquier documento referenciado, la definición que se expone a continuación prevalecerá.

15 El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos mientras presenten la actividad biológica deseada.

20 Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de investigación, diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo como se determina mediante, por ejemplo, el método de Lowry y, en algunas realizaciones, hasta más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de, por ejemplo, un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, Coomassie azul o tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

30 Los "anticuerpos nativos" son por lo general glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una superficie de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

35 La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino-terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada puede denominarse "V_H". El dominio variable de la cadena ligera puede denominarse "V_L". Estos dominios son generalmente las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

45 El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en su secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR, del inglés *hypervariable regions*), tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco conservadas (FR, del inglés *framework regions*). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, adoptando en gran parte una configuración de lámina beta, conectadas por tres HVR, que forman bucles que conectan y en algunos casos forman parte de la estructura de la lámina beta. Las HVR de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad 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 Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Instituto Nacional de Salud de los EE.UU., Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están involucrados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

60 Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de éstas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidos y se describen en general en, por ejemplo, Abbas *et al. Cellular and Mol. Immunology*, 4ª ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo entero" se utilizan en el presente documento indistintamente para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no fragmentos de anticuerpos como se definen a continuación. Las expresiones se refieren especialmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

Un "anticuerpo desnudo" para los fines del presente documento es un anticuerpo que no está conjugado a un resto citotóxico o un radiomarcador.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión al antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y todavía es capaz de entrecruzar un antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de unión al antígeno. En una realización, una especie de Fv de dos cadenas consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie de Fv monocatenario (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden unirse covalentemente mediante un conector peptídico flexible de manera que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres HVR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis HVR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión entero.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi terminal de la dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para el Fab' en el que el resto o restos cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase, por ejemplo, Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), págs. 269-315.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio pesado variable (V_H) conectado a un dominio ligero variable (V_L) en la misma cadena polipeptídica. Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más en detalle en, por ejemplo, el documento EP 0 404 097; el documento WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993). Triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson *et al.*, *Nat. Medicina*. 9: 129-134 (2003)

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que

comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el que carácter del anticuerpo no es ser una mezcla de anticuerpos individuales. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal de este tipo incluye normalmente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a la diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a la diana entre una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único entre una pluralidad de clones, tal como un grupo de clones de hibridomas, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Ha de entenderse que una secuencia de unión a la diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en el cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a la diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas en que normalmente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo es obtenerse a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan de acuerdo con la presente invención pueden hacerse mediante diversas técnicas, incluyendo, 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, segunda edición, 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 los EE.UU. N.º 4.816.567), tecnologías de presentación 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. USA* 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 similares a los humanos en animales que tienen partes o la totalidad de los loci de inmunoglobulinas humanas o genes que codifican secuencias de inmunoglobulinas humanas (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. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); Patentes de los EE.UU. N.º 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).

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, mientras presenten la actividad biológica deseada (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen los anticuerpos PRIMATIZED® en los que la región de unión al antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido mediante, por ejemplo, la inmunización de macacos con el antígeno de interés.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que restos de una HVR del receptor se reemplazan por restos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como un ratón, una rata, un conejo o un primate no humano que tengan la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323-329; y Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véase también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); y las Patentes de los EE.UU. N.º 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha hecho usando cualquiera de las técnicas para hacer anticuerpos humanos que se desvelan en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígenos no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo las bibliotecas de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los métodos descritos en Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Pueden prepararse anticuerpos humanos mediante la administración del antígeno a un animal transgénico no humano que ha sido modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la estimulación antigénica, pero cuyos loci endógenos han sido desactivados, por ejemplo, XenoMice inmunizados (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) con respecto a los anticuerpos humanos generados a través de una tecnología de hibridoma de células B humanas.

La expresión "región hipervariable", "HVR" o "HV," cuando se usan en el presente documento se refieren a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En anticuerpos nativos, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de los seis HVR y se cree que H3, en particular, desempeña un papel singular en la función de conferir 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 de camélidos de origen natural que consisten en una cadena pesada solamente son funcionales y estables en ausencia de la cadena ligera. Véase, por ejemplo, Hamers-Casteman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Se usan varias delineaciones de HVR y se incluyen en el presente documento. Las regiones determinantes de complementariedad de Kabat (CDR, del inglés *Kabat Complementarity Determining Regions*) se basan en la variabilidad de secuencia y son las utilizadas más habitualmente (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed., Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU., Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, *J. Mol Biol* 196:901-917 (1987)). Las HVR del AbM representan un término medio entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y son utilizadas por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas HVR se señalan a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	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 Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVR puede comprender "HVR extendidas" como se indica a continuación: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en el VH. Los restos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, citado anteriormente, para cada una de estas definiciones.

Los restos de la "región marco conservada" o "FR" son aquellos restos del dominio variable diferentes de los restos de la HVR como se define en el presente documento.

La expresión "numeración de restos del dominio variable como en Kabat" o "numeración de la posición de aminoácidos como en Kabat" y variaciones de las mismas, se refieren al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, citado anteriormente. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento o una inserción en una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de un solo

aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto FR de cadena pesada 82. La numeración de Kabat de restos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada "patrón" de Kabat.

5 El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se refiere a un resto en el dominio variable (aproximadamente los restos 1-107 de la cadena ligera y los restos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed., Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU., Bethesda, MD. (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se utiliza generalmente
10 cuando se refiere a un resto en una región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU publicado en Kabat *et al.*, citado anteriormente). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de los restos del anticuerpo humano IgG1 EU. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, las referencias a los números de restos en el dominio variable de los anticuerpos significan la numeración de los restos por el sistema de numeración de Kabat. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, las referencias a los números de restos en el dominio constante de los anticuerpos significan la numeración de los restos por el sistema de numeración EU (por ejemplo, véase la Solicitud Provisional de Los EE.UU. N.º 60/640.323, *Figures for EU numbering*).

20 Un anticuerpo de "afinidad madurada" es uno 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 precursor que no posee esa o esas alteraciones. Los anticuerpos de afinidad madurada preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al.* *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración de la afinidad por redistribución del dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los restos HVR y/o
25 FR se describe, por ejemplo, por Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci USA* 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).

30 Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Ciertos anticuerpos bloqueante o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

35 Un "anticuerpo agonista", como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que imita parcial o totalmente al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

Los "anticuerpos inhibidores del crecimiento" son los que impiden o reducen la proliferación de una célula que expresa un antígeno al que se une el anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede impedir o reducir la proliferación de las células cancerosas que expresan Smo o un mutante *in vitro* y/o *in vivo*.

40 Los anticuerpos que "induce apoptosis" son los que inducen la muerte celular programada como se determina por ensayos de apoptosis convencionales, tales como la unión de anexina V, la fragmentación del ADN, la contracción celular, la dilatación del retículo endoplásmico, la fragmentación celular y/o la formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos).

45 Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente del complemento; la unión al receptor Fc; la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*); la fagocitosis; la regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B) y la activación de células B.
50

La expresión "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo las regiones Fc de secuencia nativa y las regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la cadena pesada de la región Fc de la IgG humana por lo general se define como un tramo desde un resto de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el carboxilo-terminal de la misma. La lisina C-terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o la purificación del anticuerpo o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpos intactos puede comprender las poblaciones de anticuerpos con todos los restos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin restos K447 eliminados y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.
60

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" de ejemplo incluyen la unión a C1q; la CDC; la unión al receptor Fc; la ADCC; la fagocitosis; la regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio
65

variable de anticuerpo) y pueden evaluarse usando diversos ensayos como se desvelan, por ejemplo, en las definiciones del presente documento.

5 Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc de origen natural. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc de secuencia nativa de la IgG1 humana (alotipos no A y A); una región Fc de secuencia nativa de la IgG2 humana; una región Fc de secuencia nativa de la IgG3 humana; y región Fc de secuencia nativa de la IgG4 humana, así como variantes naturales de las mismas.

10 Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de la modificación de al menos un aminoácido, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante en el presente documento preferentemente poseerá al menos aproximadamente el 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y mucho más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % de homología con las mismas, más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % homología con las mismas.

20 "Receptor Fc" o "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones, un FcR es uno que se une un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes y formas con empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo inmunoreceptor con activación basada en tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene motivo inmunoreceptor con inhibición basada en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Véase, por ejemplo, Daëron, *Annu Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están incluidos en el término "FcR" en el presente documento.

35 La expresión "receptor Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) y de la regulación de la homeostasis de inmunoglobulinas. Los métodos para medir la unión a FcRn son conocidos (véase, por ejemplo, Ghetie y Ward., *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); documento WO 2004/92219 (Hinton *et al.*).

40 La unión a FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión de alta afinidad al FcRn humano pueden ensayarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o estirpes celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano o en primates no humanos a los que se les administran los polipéptidos con una región Fc variante. El documento WO00/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. Véase, por ejemplo, Shields *et al.* *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591 -6604 (2001).

50 Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En ciertas realizaciones, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función o funciones efectoras de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*), linfocitos citotóxicos naturales (NK, del inglés *natural killer*), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse a partir de una fuente nativa, por ejemplo, a partir de la sangre.

55 "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en que las Ig secretadas unidas a receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, los linfocitos NK, los neutrófilos y los macrófagos) posibilitan que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que lleva el antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Las principales células que median la ADCC, los linfocitos NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de CDAC *in vitro*, tal como el que se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 5.500.362 o 5.821.337 o la Patente de los EE.UU. N.º 6.737.056 (Presta). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen las células PBMC y los linfocitos NK. Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se desvela en Clynes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998).

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo como se describe en
 5 Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

Se describen variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos alteradas de la región Fc y capacidad aumentada o disminuida de unión a C1q en la patente de Estados Unidos N° 6.194.551B1 y el documento WO99/51642. Véase, también, Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000).

La expresión "anticuerpo que comprende una región Fc" se refiere a un anticuerpo que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. En consecuencia, una composición que comprende un anticuerpo que tiene una región Fc de acuerdo
 10 con la presente invención puede comprender un anticuerpo con K447, con todos los restos K447 eliminados o una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

"Afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). Salvo que se indique lo contrario, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conocen en la técnica diversos métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para los propósitos de la presente invención. A continuación se describen realizaciones ilustrativas y de ejemplo específicas para medir la afinidad de unión.

En una realización, la "Kd" o el "valor de Kd" de acuerdo con la presente invención se mide mediante un ensayo de unión de antígeno radiomarcado (RIA, del inglés *radiolabeled antigen binding assay*) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de Fab por el antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (¹²⁵I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno sin marcar, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, Chen, *et al.*, *J. Mol Biol* 293:865-881, (1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante una noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con albúmina sérica bovina al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n° 269620), se mezcla [¹²⁵I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). El Fab de interés después se incuba durante una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período de tiempo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. Posteriormente, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). La solución después se retira y la placa se lava ocho veces con TWEEN-20™ al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/pocillo de agente de centello (MICROSCINT-20™; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que proporcionar el 20 % de la unión máxima o menos, se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización, la Kd o el valor de Kd se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIACORE™-2000 o un BIACORE™-3000 (BIACORE, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). En resumen, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie de factor de dilución dos de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo TWEEN-20™ al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo simple de unión uno-a-uno de Langmuir (BIACORE® Evaluation Software versión 3.2) por ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la razón k_{off}/k_{on}. Véase, por ejemplo, Chen, Y., *et al.*, *J. Mol Biol* 293:865-881 (1999). Si la tasa de asociación excede de 10⁹ M⁻¹ s⁻¹ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la tasa de asociación puede determinarse usando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm;

emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con un espectrofotómetro equipado con flujo discontinuo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

5 Una "tasa on", "tasa de asociación" o " k_{on} " de acuerdo con la presente invención también puede determinarse como se ha descrito anteriormente usando un BIACORE™-2000 o un BIACORE™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

10 La expresión "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual", como se usa en el presente documento, se refiere a un grado suficientemente elevado de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado a un anticuerpo de la invención y el otro asociado a un anticuerpo de referencia/comparador) de modo que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores es de poca o ninguna importancia biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menor de aproximadamente el 50 %, menor de aproximadamente el 40 %, menor de aproximadamente el 30 %, menor de aproximadamente el 20 % y/o menor de aproximadamente el 10 % en función del valor para el anticuerpo de referencia/comparador.

20 La frase "sustancialmente reducida" o "sustancialmente diferente", como se usa en el presente documento, se refiere a un grado suficientemente elevado de diferencia entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado a una molécula de la invención y el otro asociado a una molécula de referencia/comparadora) de modo que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene importancia estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, mayor de aproximadamente el 10 %, mayor de aproximadamente el 20 %, mayor de aproximadamente el 30 %, mayor de aproximadamente el 40 % y/ mayor de aproximadamente el 50 % en función del valor para la molécula de referencia/comparadora.

"Purificada" significa que una molécula está presente en una muestra a una concentración de al menos el 95 % en peso, o al menos el 98 % en peso de la muestra en la que está contenida.

30 Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se separa de al menos otra molécula de ácido nucleico con la que está asociada normalmente, por ejemplo, en su entorno natural. Una molécula de ácido nucleico aislada incluye, además, una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

35 El término "vector", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un ADN bicatenario circular al que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector fágico. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que los segmentos adicionales de ADN pueden ligarse al genoma viral. Ciertos vectores tienen capacidad de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se han introducido (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y, de este modo, replicarse junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están unidos de forma operativa. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes", o simplemente, "vectores recombinantes". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están, con frecuencia, en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más habitualmente usada de vector.

50 "Polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen el ADN y el ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por la ADN o la ARN polimerasa o mediante una reacción de síntesis. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación de la estructura nucleotídica puede conferirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede comprender una modificación o modificaciones hechas después de la síntesis, tal como la conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, las "caperuzas", la sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, las modificaciones entre nucleótidos tales como, por ejemplo, aquellos con enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, etc.), aquellos que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, señales peptídicas, poli-L-isina, etc.), aquellos con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del o los

polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo habitualmente presentes en los azúcares puede remplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o puede conjugarse con soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3' terminal puede fosforilarse o sustituirse con aminos o restos de grupos de protección con caperuza orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-allyl-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleosídicos básicos tales como metil ribósido. Puede remplazarse uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en las que el fosfato es reemplazado por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o sin sustituir (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido tienen que ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos referidos en el presente documento, incluyendo el ARN y el ADN.

"Oligonucleótido", como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente sintéticos que generalmente tienen, pero no necesariamente, menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para los polinucleótidos es igual y completamente aplicable a los oligonucleótidos.

El término "Smo," o "SMO" como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier SMO nativo de cualquier vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término abarca SMO "de longitud completa", sin procesar, así como cualquier forma de SMO que se resultó del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes de SMO de origen natural, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. "Smo mutante" como se usa en el presente documento se refiere a una SMO que tiene una mutación en la porción carboxi-terminal del dominio 7 transmembrana de la SMO en la posición 518 de la SMO humana.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones tales como "tratar" o "tratado") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o la célula que se trata, y puede realizarse ya sea como profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la prevención de la aparición o la reaparición de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación de la patología y la remisión o un pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno o para ralentizar la progresión de una enfermedad o trastorno.

Un "individuo", "sujeto" o "paciente" es un vertebrado. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales de granja (como vacas), animales de deporte, mascotas (como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas. En ciertas realizaciones, un mamífero es un ser humano.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma que permite que la actividad biológica del principio activo sea eficaz y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administre la formulación. Dichas formulaciones pueden ser estériles.

Una formulación "estéril" es aséptico o está libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas. Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad de la sustancia/molécula, para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz abarca una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, puesto que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de, o en una fase temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

La expresión "agente citotóxico" como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o impide una función celular y/o causa la muerte o la destrucción celular. La expresión pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, Al²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹²) y los isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina,

etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nudeolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos que se desvelan a continuación. Otros agentes citotóxicos se describen a continuación. Un agente tumoricida causa la destrucción de las células tumorales.

Una "toxina" es cualquier sustancia capaz de tener un efecto perjudicial sobre el crecimiento o la proliferación de una célula.

Un "agente quimioterápico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo alitretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escoplectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocamicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; esponjistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, medoretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como camustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediína (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 1 y caliqueamicina omega 1 (véase, por ejemplo, Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor de la alfa-4 integrina oral; dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos relacionados con la cromoproteína enedina), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabidina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de liposomas de doxorubicina HCl (DOXL®), doxorubicina liposomal TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina pegilada liposomal (CAELYX®) y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicina, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptoizocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, camofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; anti-suprarrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejos polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogemanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2" trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, Roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas de paclitaxel modificadas por ingeniería con albúmina (ABRAXANE™) y docetaxel (TAXOTERE®); clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino tales como cisplatino, oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN®) y carboplatino; vincas, que impiden que la polimerización de tubulina forme microtúbulos, incluyendo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®) y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorina; novantrona; edatraxato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, incluyendo bezaroteno (TARGRETIN®); bifosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (ARELIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo de citosina nudeosídico de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos no codificantes, particularmente los que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y las vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECÁN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inhibidor de la COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor del proteosoma

- (por ejemplo PS341); bortezumib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersén de sodio (GENASENSE®); Pixantrona; Inhibidores del EGFR (véase la definición a continuación); inhibidores de tirosina cinasa (véase la definición a continuación); inhibidores de la serina-treonina cinasa, tales como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); inhibidores de la farnesiltransferasa tales como lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tal como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona; y FOLFOX, una abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.
- 10 Los agentes quimioterápicos que se definen en el presente documento incluyen "agentes antihormonales" o "agentes terapéuticos endocrinos", que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer. Pueden ser hormonas sí mismas, incluyendo, pero no limitadas a: antiestrógenos con perfil agonista/antagonista mixto, incluyendo, tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, keoxifeno y moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM) tales como SERM3; antiestrógenos puros sin propiedades agonistas, tales como fulvestrant (FASLODEX®) y EM800 (dichos agentes pueden bloquear la dimerización de los receptores de estrógenos (ER, del inglés *estrogen receptor*), inhibir la unión al ADN, aumentar la renovación de ER y/o suprimir los niveles de ER); inhibidores de la aromatasas, incluyendo los inhibidores de la aromatasas esteroideas tales como formestano y exemestano (AROMASIN®) y los inhibidores de la aromatasas no esteroideas tales como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de la aromatasas incluyen vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol y 4(5)-imidazoles; agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante, incluyendo leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, buserelina y triptorelina; esteroides sexuales, incluyendo progestinas tales como el acetato de megestrol y el acetato de medroxiprogesterona, estrógenos tales como dietilestilbestrol y premarina y andrógenos/retinoides tales como fluoximesterona, ácido todo trans-retinoico y fenretinida; onapristona; antiprogestinas; reguladores a la baja del receptor de estrógeno (ERD, del inglés *estrogen receptor down-regulators*); antiandrógenos tales como flutamida, bicalutamida y nilutamida; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.
- 20 Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa SMO) *in vitro* o *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células (tales como una célula que expresa SMO) en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el progreso del ciclo celular (en un sitio distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueantes clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, medroretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en Mendelsohn e Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, Capítulo 1, titulado "*Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs*" por Murakami *et al.* (W.B. Saunders, Filadelfia, 1995), por ejemplo, pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos ambos derivados del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células.

Un "antagonista de SMO mutante" es un compuesto que inhibe la actividad biológica de una SMO que tiene una sustitución de aminoácido en la posición 518 de la SMO humana que cambia el ácido glutámico del tipo silvestre en esta posición por cualquier otro aminoácido. La actividad biológica de la SMO es la capacidad de transducir una señal tras la estimulación con hedgehog a la activación del factor de transcripción Gli.

I. Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos de la divulgación incluyen secuencias que codifican SMO mutantes aisladas. Los ácidos nucleicos comprenden una secuencia que es al menos en un 80 % idéntica a la secuencia del ácido nucleico de la SEQ ID NO: 3 y que contiene al menos una mutación de esta secuencia para codificar cualquier aminoácido en la posición 518 distinto del ácido glutámico (E). En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica alanina (A) o lisina (K) en la posición 518. En algunas realizaciones, el ácido nucleico tiene al menos una mutación de la SMO de tipo silvestre parental en el nucleótido 1552, 1553 y/o 1554. En algunas realizaciones, el porcentaje de identidad es del 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 89 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % a la SEQ ID NO: 3 a condición de que haya al menos una mutación en la posición 1552, 1553 y/o 1554. La invención también incluye fragmentos de dichos ácidos nucleicos que abarcan la región de las mutaciones descritas anteriormente en fragmentos que tienen al menos 20 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, los fragmentos de nucleótidos tienen 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nucleótidos de longitud. Los fragmentos pueden tener cualquier longitud que abarque la región de las mutaciones descritas anteriormente hasta la molécula de ácido nucleico que codifica la SMO mutante de longitud completa.

Pueden usarse SMO mutante aislado y fragmentos de la misma, por ejemplo, para la hibridación, para generar cebadores y sondas para los ensayos de pronóstico y diagnóstico de la invención y para la expresión en sistemas recombinantes (por ejemplo, para generar proteínas SMO mutantes o porciones de las mismas para su uso como inmunógenos y para su uso en ensayos de la invención como se describen en el presente documento).

5 La invención proporciona sondas de ácido nucleico que pueden usarse para identificar la molécula de ácido nucleico SMO mutante en los métodos de la invención. Pueden cribarse muestras de ácido nucleico derivadas de tejido sospechoso de tener un SMO mutante o de tejido en el que el estado de SMO es desconocido, usando una sonda específica para SMO mutante usando procedimientos convencionales, como se describe en Sambrook *et al.*,
10 *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989). Como alternativa, el ácido nucleico que codifica SMO puede amplificarse a partir del tejido y sondearse con una sonda específica de la invención para determinar la presencia o ausencia de SMO mutante. La metodología de la PCR es bien conocida en la técnica (Sambrook *et al.*, citado anteriormente; Dieffenbach *et al.*, *PCR PRIMER: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1995).

15 Las secuencias de nucleótidos (o su complemento) que codifican SMO mutante tienen diversas aplicaciones en la técnica de la biología molecular, incluyendo usos como las sondas de hibridación, y en la generación de sondas de ARN y ADN no codificantes. El ácido nucleico que codifica SMO mutante también será útil para la preparación de polipéptidos de SMO mutante mediante las técnicas recombinantes descritas en el presente documento, en las que
20 dichos polipéptidos de SMO mutantes pueden encontrar un uso, por ejemplo, en la preparación de anticuerpos anti-SMO mutantes como se describe en el presente documento.

Pueden usarse ácidos nucleicos de SMO mutante de longitud completa, o porciones de los mismos, como sondas de hibridación para la identificación de SMO mutante.

25 Opcionalmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación pueden derivarse de al menos la región mutante de la secuencia nucleotídica de SMO mutante de longitud completa.

30 A modo de ejemplo, un método de cribado comprenderá aislar la región codificante de SMO mutante usando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada entre aproximadamente 40 bases. Las sondas de hibridación pueden marcarse mediante diversos marcadores, incluyendo radionucleótidos tales como ³²P o ³⁵S, o marcadores enzimáticos tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda a través de sistemas de acoplamiento avidina/biotina. Las sondas marcadas que tengan una secuencia complementaria a la del gen SMO mutante de la
35 presente invención pueden usarse para cribar bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico o ARNm para determinar con qué miembros de dichas bibliotecas se hibrida la sonda. Los productos de hibridación pueden resolverse en geles de poliacrilamida. Además, las mutaciones de SMO pueden determinarse usando el método descrito en los Ejemplos. Las condiciones de hibridación, incluyendo la rigurosidad moderada y la rigurosidad elevada, se proporcionan en Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

40 Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas pueden compararse y alinearse con las secuencias conocidas para SMO y SMO mutante. La identidad de secuencia en la región carboxi-terminal del dominio 7 transmembrana puede determinarse usando métodos conocidos en la técnica.

45 Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos que codifican SMO incluyen oligonucleótidos no codificantes o codificantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico monocatenario (ya sea ARN o ADN) capaz de unirse al ARNm de SMO mutante diana (codificante) o secuencias de ADN (no codificante) de SMO mutante. Los oligonucleótidos no codificantes o codificantes, de acuerdo con la presente invención, comprenden un fragmento de la región codificante del ADN de SMO mutante que contiene la región de mutación. Dicho fragmento comprende
50 generalmente al menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 14 a 30 nucleótidos. La capacidad de derivar un oligonucleótido no codificante o uno codificante, basada en una secuencia de ADNc que codifica una proteína dada se describe en, por ejemplo, Stein y Cohen (1988) *Cancer Res.* 48:2659 y van der Krol *et al.* (1988) *BioTechniques* 6:958.

55 La unión de oligonucleótidos no codificantes o codificantes a secuencias de ácido nucleico diana da como resultado la formación de híbridos que bloquean la transcripción o la traducción de la secuencia diana a través de uno de varios medios, incluyendo la degradación potenciada de los híbridos, la terminación prematura de la transcripción o la traducción o por otros medios. Dichos métodos están incluidos en la presente descripción. Los oligonucleótidos no codificantes pueden por tanto usarse para bloquear la expresión de proteínas SMO mutantes, en la que las
60 proteínas SMO mutantes pueden desempeñar un papel en la resistencia del cáncer en mamíferos a los quimioterápicos tales como GDC-0449. Los oligonucleótidos no codificantes o codificantes comprenden además oligonucleótidos que tienen cadenas principales de azúcar modificado-fosfodiéster (u otros enlaces de azúcar, tales como los descritos en el documento WO 91/06629) y en los que dichos enlaces de azúcar son resistentes a nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con enlaces de azúcar resistentes son estables *in vivo* (es decir, capaces de resistir la degradación enzimática) pero retienen la especificidad de secuencia para ser capaces de unirse a secuencias de nucleótidos diana.
65

Los ejemplos específicos de compuestos no codificantes preferidos útiles para inhibir la expresión de las proteínas SMO mutantes incluyen oligonucleótidos que contienen cadenas principales modificadas o enlaces entre nucleósidos no naturales. Los oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas incluyen los que conservan un átomo de fósforo en la cadena principal y los que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal.

5 Para los fines de la presente memoria descriptiva, y como a veces se hace referencia en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su cadena principal internucleosídica también pueden considerarse oligonucleósidos. Las cadenas principales de oligonucleótidos modificados preferidas incluyen, por ejemplo, fósforotioatos, fósforotioatos quirales, fósforditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotri-ésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilo incluyendo 3'-alquilo fosfonatos, 5'-alquilo fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y borano-fosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos unidos 2'-5' de éstos, y los que tienen polaridad invertida en los que uno o más enlaces internucleotídicos son un enlace 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Los oligonucleótidos preferidos que tienen polaridad invertida comprenden un enlace sencillo 3' a 3' en el enlace 3'-más internucleotídico, es decir, un único resto de nucleósido invertido que puede ser abásico (falta la nucleobase o tiene un grupo hidroxilo en lugar de la misma). También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre. Las Patentes de los EE.UU. representativas que muestran la preparación de enlaces que contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de los EE.UU. N.º: 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 20 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.194.599; 5.565.555; 5.527.899; 5.721.218; 5.672.697 y 5.625.050.

Se prefieren cadenas principales de oligonucleótidos modificados que no induyan un átomo de fósforo en los mismos y tengan cadenas principales que están formadas por enlaces internucleosídicos alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos mixtos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen los que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de metileno formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de riboacetilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metileneimino y metilenhidrazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otros que tienen partes componentes N, O, S y CH₂ mezclados. Las Patentes de los EE.UU. representativas que muestran la preparación de dichos oligonucleósidos incluyen, pero no se limitan a: Las Patentes de los EE.UU. N.º: 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 35 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.792.608; 5.646.269 y 5.677.439.

En otros oligonucleótidos no codificantes preferidas, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, la cadena principal, de las unidades nucleotídicas se reemplazan por grupos novedosos. Las unidades base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Un compuesto oligomérico de este tipo, un mimético de oligonucleótido que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación, se denomina ácido nucleico peptídico (PNA, del inglés *peptide nucleic acid*). En compuestos de PNA, la cadena principal de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza por una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se conservan y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la cadena principal. Las Patentes de los EE.UU. representativas que muestran la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de los EE.UU. N.º: 5.539.082; 5.714.331 y 5.719.262. Pueden encontrarse contenidos adicionales acerca de compuestos de PNA en Nielsen *et al.* (1991) *Science* 254:1497-1500.

Los oligonucleótidos no codificantes preferidos incorporan cadenas principales de fosforotioato y/o cadenas principales de heteroátomos y en particular -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- (conocido como una cadena principal de metileno (metilimino) o MMI), -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- (en el que la cadena principal de fosfodiéster nativa se representa como -O-P-O-CH₂-) descritas en la Patente de los EE.UU. N.º 5.489.677 anteriormente referenciada y las cadenas principales de amida de la Patente de los EE.UU. N.º 5.602.240 anteriormente referenciada. También se prefieren los oligonucleótidos no codificantes que tienen estructuras de cadena principal de morfolino de la Patente de los EE.UU. N.º 5.034.506 anteriormente referenciada.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-alquilo, S-alquilo o N-alquilo; O-alqueno, S-alqueno o N-alqueno; O-alquilo, S-alquilo o N-alquilo; o O-alquil-O-alquilo, en el que el alquilo, el alqueno y el alquilo pueden ser alquilo C1 a C10 o alqueno C2 a C10 y alquilo sustituidos o sin sustituir. Se prefieren en particular O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, en los que n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos no codificantes preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C1 a C10, alquilo inferior sustituido, alqueno, alquilo, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂ CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades

farmacocinéticas de un oligonucleótido o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tengan propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin *et al.* (1995) *Helv. Chim. Acta* 78: 486-504), es decir, un grupo alcoxicoxi. Una modificación preferida adicional incluye 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos en el presente documento a continuación y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o de 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂.

Una modificación preferida adicional incluye ácidos nucleicos bloqueados (LNA, del inglés *locked nucleic acid*) en los que el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcar formando así un resto de azúcar bicíclico. El enlace es preferentemente un grupo metileno (-CH₂-)_n que une el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4' en el que n es 1 o 2. Los LNA y la preparación de los mismos se describen en el documento WO 98/39352 y el documento WO 99/14226.

Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-alilo (2'-CH₂-CH=CH₂), 2'-O-alilo (2'-O-CH₂-CH=CH₂) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación en 2' puede estar en la posición arábica (arriba) o en la posición ribosa (abajo). Una modificación 2'-arábica preferida es 2'-F. También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, en particular la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en oligonucleótidos unidos en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcares, tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes representativas de los EE.UU. que muestran la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de los EE.UU. N.º: 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.792.747 y 5.700.920.

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de la nucleobase (con frecuencia denominada en la técnica simplemente "base"). Como se usa en el presente documento, las nucleobases "sin modificar" o "naturales" incluyen las bases púricas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de adenina y guanina de 6-metilo y otros alquilo, derivados de adenina y guanina de 2-propilo y otros alquilo, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil (-C=C-CH₃ o -CH₂-C=CH) uracilo y citosina y otros derivados de alquilo de bases pirimidínicas, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxil adeninas y guaninas y otras 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uracilo y citosinas 5-sustituidas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Nucleobases modificadas adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazin citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazin citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), sitios de fijación G, tales como una fenoxazin citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridindol citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las nucleobases modificadas también pueden incluir las que la base de purina o pirimidina está reemplazada por otros heterocidos, por ejemplo 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Otras nucleobases incluyen las desveladas en la Patente de los EE.UU. N.º 3.687.808, las desveladas en *THE CONCISE ENCYCLOPEDIA OF POLYMER SCIENCE AND ENGINEERING*, Kroschwitz, J.I., ed., John Wiley & Sons, 1990, págs. 858-859 y las desveladas por Englisch *et al.*, *ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION*, Wiley-VCH, Alemania, 1991, 30: 613. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6-sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del híbrido de ácido nucleico a 0,6-1,2 °C. (Sanghvi *et al.* *ANTISENSE RESEARCH AND APPLICATIONS*, CRC Press, Boca Ratón, 1993, págs. 276-278) y se prefieren las sustituciones de bases, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietil azúcar. Las patentes representativas de los EE.UU. que muestran la preparación de nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a: la patente de los EE.UU. N.º 3.687.808, así como las Patentes de los EE.UU. N.º: 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121; 5.596.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096; 5.681.941 y 5.750.692.

Otra modificación de los oligonucleótidos no codificantes es unir químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que mejoren la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Los compuestos de la divulgación pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados incluyen intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesterolos, lípidos, lípidos catiónicos, fosfolípidos, fosfolípidos catiónicos, biotina, ácido fólico, fenazina, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de la presente divulgación, incluyen

grupos que mejoran la captación del oligómero, potencian la resistencia del oligómero a la degradación, y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con ARN. Los grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de la presente divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o excreción del oligómero. Los restos conjugados incluyen, pero no se limitan a restos lipídicos tales como un resto de colesterol (Letsinger *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6553-6556), ácido cólico (Manoharan *et al.* (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett* 4: 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan *et al.* (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:306-309; Manoharan *et al.* (1993) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3:2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:533-538), una cadena alifática, por ejemplo, restos dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras *et al.* (1991) *EMBO J.* 10: 1111-1118; Kabanov *et al.* (1990) *FEBS Lett* 259: 327-330; Svinarchuk *et al.* (1993) *Biochimie* 75: 49-54, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-o-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietil-amonio (Manoharan *et al.* (1995) *Tetrahedron Lett* 36: 3651-3654; Shea *et al.* (1990) *Nucl Acids Res* 18: 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan *et al.* (1995) *Nucleosides & Nucleotides* 14: 969-973) o ácido acético adamantano (Manoharan *et al.* (1995) *Tetrahedron Lett.* 36:3651-3654), un resto de palmitilo (Mishra *et al.* (1995) *Biochim Biophys Acta* 1264: 229-237) o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos también pueden conjugarse con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilarsocina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diacepina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco con sulfamida, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Se describen conjugados oligonucleótido-fármaco y su preparación en las Patentes de los EE.UU. N.º: 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928; 5.688.941 y 6.656.730.

No es necesario para todas las posiciones en un compuesto dado que estén modificadas uniformemente y, de hecho, más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente pueden incorporarse en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente divulgación también incluye compuestos no codificantes que son compuestos quiméricos. Compuestos no codificantes "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de la presente divulgación, son compuestos no codificantes, en particular oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta de al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen normalmente al menos una región en la que el oligonucleótido está modificado con el fin de conferir al oligonucleótido una mayor resistencia a la degradación por nucleasas, un aumento de la captación celular y/o un aumento de la afinidad de unión para el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir ARN:ADN o híbridos ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un híbrido de ARN:ADN. La activación de la RNasa H, por tanto, da como resultado la escisión del ARN diana, mejorando de este modo en gran medida la eficiencia de la inhibición por oligonucleótido de la expresión génica. En consecuencia, con frecuencia pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxi oligonucleótidos de fosforitoato que se hibridan con la misma región diana. Pueden formarse compuestos no codificantes quiméricos como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, miméticos de oligonucleósidos y/o oligonucleótidos como se han descrito anteriormente. Los oligonucleótidos no codificantes quiméricos preferidos incorporan por lo menos un azúcar modificado en 2' (preferentemente de 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el extremo 3' terminal para conferir resistencia a las nucleasas y una región con al menos 4 azúcares 2'-H contiguos para conferir actividad RNasa H. Dichos compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o gapmeros. Los gapmeros preferidos tienen una región de azúcares modificados en 2' (preferentemente 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el extremo terminal 3' y en el extremo terminal 5' separados por al menos una región que tenga al menos 4 azúcares 2'-H contiguos y preferentemente incorporan enlaces de cadena principal fosforitoato. Las Patentes de los EE.UU. representativas que muestran la preparación de dichas estructuras híbridas incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de Los EE.UU. N.º: 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356 y 5.700.922.

Los compuestos no codificantes utilizados de acuerdo con la presente divulgación pueden fabricarse convenientemente y habitualmente a través de la técnica bien conocida de la síntesis en fase sólida. El equipo para dicha síntesis es vendido por diversos vendedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Puede emplearse, adicionalmente o como alternativa, cualquier otro medio para dicha síntesis conocida en la técnica. Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforitoatos y derivados alquilados. Los compuestos también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, moléculas receptoras específicas, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las Patentes de los EE.UU. representativas que muestran la preparación de dichas formulaciones de ayuda en la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de los EE.UU. N.º: 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721;

4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575 y 5.595.756.

5 Otros ejemplos de oligonucleótidos codificantes o no codificantes incluyen los oligonucleótidos que están unidos covalentemente a restos orgánicos, tales como los descritos en el documento WO 90/10048 y otros restos que aumentan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácido nucleico diana, tales como poli-(L-lisina). Más aún, pueden unirse agentes intercalantes, tales como elipticina y agentes alquilantes o complejos de metales a oligonucleótidos codificantes o no codificantes para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido no codificante o codificante por la secuencia de nucleótidos diana.

10 Pueden introducirse oligonucleótidos no codificantes o codificantes en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana mediante cualquier método de transferencia génica, incluyendo, por ejemplo, la transfección de ADN mediada por CaPO₄, la electroporación o mediante el uso de vectores de transferencia génica tales como el virus de Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, un oligonucleótido no codificante o codificante se inserta en un vector retroviral adecuado. Una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana se pone en contacto con el vector retroviral recombinante, ya sea *in vivo* o *ex vivo*. Los vectores retrovirales adecuados incluyen, pero no se limitan a, los derivados del retrovirus murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV) o los vectores de copia doble designados DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase el documento WO 90/13641).

20 También pueden introducirse oligonucleótidos codificantes o no codificantes en una célula que contiene la secuencia de nucleótidos diana mediante la formación de un conjugado con una molécula de unión a ligando, como se describe en el documento WO 91/04753. Las moléculas de unión a ligando adecuadas incluyen, pero no se limitan a, receptores de la superficie celular, factores de crecimiento, otras citocinas, u otros ligandos que se unen a receptores de la superficie celular. Preferentemente, la conjugación de la molécula de unión a ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión a ligando para unirse a su correspondiente molécula o receptor, ni bloquea la entrada del oligonucleótido codificante o no codificante o su versión conjugada en la célula.

25 Como alternativa, un oligonucleótido codificante o no codificante puede introducirse en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana mediante la formación de un complejo oligonucleótido-lípido, tal como se describe en el documento WO 90/10448. El complejo oligonucleótido codificante o no codificante-lípido se disocia preferentemente dentro de la célula por una lipasa endógena.

30 Las moléculas de ARN o de ADN codificantes o no codificantes tienen generalmente al menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 o 1000 nucleótidos de longitud, en las que en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia nucleotídica referenciada más o menos el 10 % de esa longitud referenciada.

45 También pueden utilizarse secuencias de nucleótidos que codifican SMO mutante para construir sondas de hibridación para cartografiar el gen que codifica ese SMO y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en el presente documento pueden cartografiarse a un cromosoma y regiones específicas de un cromosoma usando técnicas conocidas, tales como la hibridación *in situ*, el análisis del enlace frente a marcadores cromosómicos conocidos y el cribado de hibridación con bibliotecas.

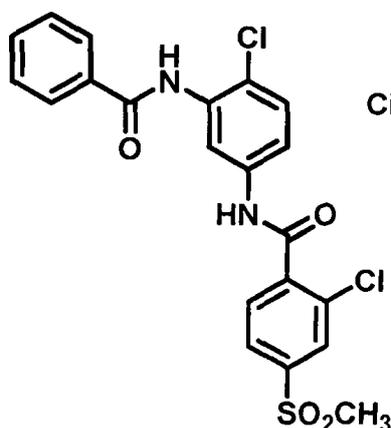
50 Un antagonista potencial de SMO mutante es una construcción de ARN o ADN no codificante preparada usando tecnología no codificante, donde, por ejemplo, una molécula de ARN o ADN no codificante actúa bloqueando directamente la traducción del ARNm mediante la hibridación con el ARNm diana y evitando la traducción de proteínas. La tecnología no codificante puede usarse para controlar la expresión génica a través de la formación de una triple hélice o de ADN o ARN no codificante, ambos métodos se basan en unión de un polinucleótido al ADN o ARN. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican SMO mutante en el presente documento, se usan para diseñar un oligonucleótido de ARN no codificante de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice - véase Lee *et al.* (1979) *Nucl Acids Res* 6:3073; Cooney *et al.* (1988) *Science* 241:456; Dervan *et al.* (1991) *Science* 251:1360), evitando de este modo la transcripción y la producción de SMO mutante. El oligonucleótido de ARN no codificante se hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de mRNA al SMO mutante (Okano (1991) *Neurochem.* 56:560); *OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también pueden entregarse a las células de manera que el ARN o el ADN no codificantes puedan expresarse *in vivo* para inhibir la producción de SMO mutante. Cuando se usa ADN no codificante, se prefieren oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de traducción-iniciación, por ejemplo, entre aproximadamente las posiciones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

Los antagonistas potenciales de SMO mutante incluyen moléculas pequeñas que se unen al sitio ocupado en la SMO de tipo silvestre por GDC-0449, bloqueando de este modo la actividad biológica de la SMO mutante. Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, péptidos pequeños o moléculas similares a péptidos pequeños, péptidos preferentemente solubles y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

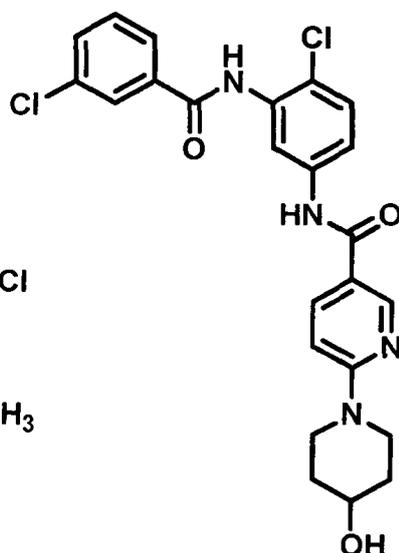
5 Las ribozimas son moléculas de ARN enzimático capaces de catalizar la escisión específica del ARN. Las ribozimas actúan mediante hibridación específica de secuencia al ARN diana complementario, seguida de la escisión endonucleolítica. Los sitios específicos de escisión por ribozima dentro de un ARN diana potencial pueden identificarse mediante técnicas conocidas. Para más detalles véanse, por ejemplo, Rossi (1994) *Current Biology*,
10 4:469-471 y la publicación PCT N.º WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice utilizadas para inhibir la transcripción deberían ser monocatenarias y estar compuestas por desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de manera que promueva la formación de la triple hélice a través de las reglas de emparejamiento de bases
15 de Hoogsteen, que generalmente requieren tramos considerables de purinas o pirimidinas en una cadena de un híbrido. Para más detalles véase, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 97/33551, citada anteriormente.

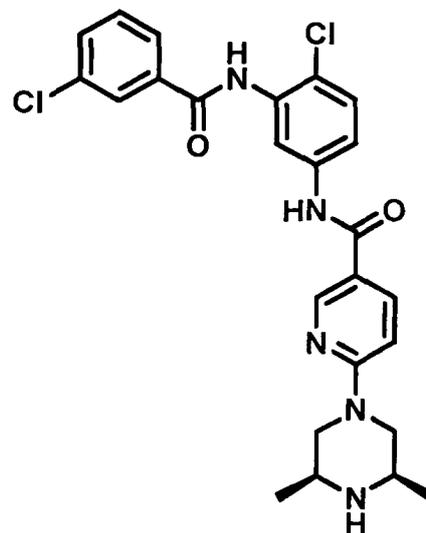
Estas moléculas pequeñas pueden identificarse mediante uno cualquiera o más de los ensayos de cribado analizados anteriormente y/o mediante cualquier otra técnica de cribado bien conocida por los expertos en la
20 materia. Los ejemplos de moléculas pequeñas que pueden usarse como antagonistas de SMO mutante son compuestos que tienen las siguientes fórmulas estructurales:



Fórmula I



Fórmula II



Fórmula III

25 II. Proteínas

La invención proporciona proteínas SMO mutantes aisladas. La SMO humana de tipo silvestre se muestra en la SEQ ID NO: 1. La SMO humana mutante se muestra en la SEQ ID NO: 2, en la que el aminoácido 518 se muestra como "X", que, con respecto a la presente solicitud significa cualquier aminoácido distinto del glutámico ácido (E). La X es
30 alanina (A) o lisina (K). Pueden producirse SMO mutante y fragmentos de la misma en sistemas recombinantes como es bien sabido en la técnica, usando los ácidos nucleicos de SMO mutante descritos en el presente documento. Dichos ácidos nucleicos pueden incorporarse en vectores de expresión que son bien conocidos en la técnica y transfectarse en células hospedadoras, que pueden ser células procariontas o eucariotas, dependiendo del uso propuesto de la proteína. Puede usarse SMO mutante de longitud completa o fragmentos de la misma (en la que
35 los fragmentos contienen al menos la porción carboxi-terminal del dominio 7 transmembrana y el aminoácidos 518 de la SEQ ID NO: 2) como inmunógenos para producir anticuerpos de la invención o para purificar anticuerpos de la invención, por ejemplo.

40 III. Anticuerpos

A. Anticuerpos anti-SMO mutante

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que se unen a SMO, particularmente a SMO mutante. En una realización, un anticuerpo anti-SMO es un anticuerpo monoclonal. En una realización, un anticuerpo anti-SMO es un
45 fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o (Fab')₂. En una realización, un

anticuerpo anti-SMO mutante es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una realización, se purifica un anticuerpo anti-SMO. En ciertas realizaciones, una composición es una formulación farmacéutica para el tratamiento del cáncer.

5 1. Fragmentos de anticuerpo

La presente invención abarca fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos pueden generarse mediante medios tradicionales, tales como la digestión enzimática o mediante técnicas recombinantes. En ciertas circunstancias, existen ventajas al usar fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos enteros. El menor tamaño de los fragmentos permite un aclaramiento rápido y puede conducir a un mejor acceso a los tumores sólidos. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos, véase Hudson *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9: 129-134.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían a través de la digestión proteolítica de 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 ahora pueden producirse directamente por células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv pueden expresarse todos en y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de anticuerpos en fagos analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse directamente fragmentos F(ab')₂ del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Se describen fragmentos Fab y F(ab')₂ con una semivida aumentada *in vivo* que comprenden restos de epítipo de unión a receptor de rescate en la patente de los EE.UU. N.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para los expertos en la materia. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; las patentes de los EE.UU. N.º 5.571.894; y 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; por tanto, son adecuados para unión no específica reducida durante su uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión sFv para proporcionar una fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi terminal de un sFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, citado anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de los EE.UU. N.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

35 2. Anticuerpos humanizados

La invención abarca anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácido introducidos en el mismo de una fuente que es no humana. Estos restos de aminoácido no humanos con frecuencia se denominan restos de "importación", que se cogen normalmente de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536), sustituyendo secuencias de región hipervariable por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de los EE.UU. N.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto de cadena ligera como pesada, que se usan en la preparación de los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que está más cerca de la del roedor se acepta entonces como la región marco conservada humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chotia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901). Otro método usa una región marco conservada particular derivada de la secuencia consenso de anticuerpos completamente humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede usarse la misma región marco conservada para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:2623).

Además, generalmente se desea que los anticuerpos se humanicen con retención de la alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están habitualmente disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas

presentaciones permite el análisis del posible papel de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, pueden seleccionarse y combinarse restos de la región marco conservada a partir de las secuencias receptoras y de importación de modo que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como la afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de la región hipervariable están implicados directamente y muy sustancialmente en la influencia sobre la unión al antígeno.

3. Anticuerpos humanos

Los anticuerpos humanos de la invención pueden construirse combinando una o más secuencias de dominio variable de clon Fv seleccionadas entre bibliotecas de presentación en fagos derivados de seres humanos con una o más secuencias conocidas de dominio constante humano como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, los anticuerpos monodonaes humanos de la invención pueden prepararse por el método de hibridoma. Se han descrito estirpes celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

Ahora es posible producir animales transgénicos no humanos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica de la región de unión de cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

También puede usarse la redistribución génica para obtener anticuerpos humanos a partir de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este método, que también se denomina "impronta de epítipo", la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido por técnicas de presentación en fagos como se describe en el presente documento se reemplaza por un repertorio de genes de dominio V humano, creando una población de quimeras scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana/cadena humana en el que la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido tras la eliminación de la correspondiente cadena no humana en el clon de presentación en fagos primario, es decir el epítipo gobierna (imprime) la elección del compañero de cadena humana. Cuando se repite el proceso para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos FR o CDR de origen no humano.

4. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es por SMO y la otra es por cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, pueden unirse anticuerpos biespecíficos a dos epítopos diferentes de SMO. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos para células que expresan SMO. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a SMO y un brazo que se une al agente citotóxico, tal como, por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloide de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que por lo general se hace por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos de producto son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993 y en Traunecker *et al.*, *EMBOJ.*, 10: 3655 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La

fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. En ciertas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión diferentes y se co-transfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado elevados rendimientos o cuando las proporciones no son de particular importancia.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuesto por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones indeseadas de cadena de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La superficie de contacto comprende al menos una parte del dominio C_{H3} de un dominio constante de anticuerpo. En este método, se reemplaza una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácido de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensadoras de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales grandes de aminoácido con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales indeseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Se han propuesto dichos anticuerpos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células indeseadas (patente de los EE.UU. N.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documento WO 91/00360, documento WO 92/00373 y documento EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes adecuados de entrecruzamiento son bien conocidos en la técnica y se desvelan en la patente de los EE.UU. N.º 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de complejación de ditio arsenito de sodio para estabilizar ditioles vecinales e impedir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados después se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB después se vuelve a convertir en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse a células que sobre-expresaban el receptor HER2 y linfocitos T humanos normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio

variable de cadena ligera (VL) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se fuerzan los dominios VH y VL de un fragmento para que se emparejen con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Se incluyen anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

10 5. Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al cual se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente mediante la expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En ciertas realizaciones, el dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino-terminales a la región Fc. En ciertas realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho sitios de unión a antígeno. En una realización de este tipo, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (por ejemplo, dos cadenas polipeptídicas), en el que la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, en el que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender adicionalmente al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera incluidos en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden adicionalmente un dominio CL.

35 6. Anticuerpos de dominio único

En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de dominio único. Un anticuerpo de dominio único es una sola cadena polipeptídica que comprende la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.248.516 B1). En una realización, un anticuerpo de dominio único consiste en la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo.

45 7. Variantes de anticuerpo

En algunas realizaciones, se incluyen una o más modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede realizarse cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, a condición de que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en que se prepara la secuencia.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de rastreo con alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En el presente documento, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se remplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para influir en la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Las localizaciones de aminoácido que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones después se refinan introduciendo variantes adicionales o diferentes en o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminada, la naturaleza de la mutación en sí no tiene que estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el funcionamiento de una mutación en un sitio dado, se realiza mutagénesis de rastreo con Ala o aleatoria en el codón o región diana y se criban las inmunoglobulinas expresadas para la actividad deseada.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de un solo o múltiples restos de aminoácido. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N-terminal. Otras variaciones de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N- o C-terminal del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se altera para aumentar o disminuir el grado en el que el anticuerpo está glicosilado. La glicosilación de polipéptidos normalmente está ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión de un resto carbohidrato a la cadena lateral de un resto asparagina. Las secuencias de los tripéptidos asparagina X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. Glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición o delección de sitios de glicosilación en el anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que se crea o se elimina una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición, delección o sustitución de uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación ligados a O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido al mismo puede alterarse. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero comprenden normalmente un oligosacárido ramificado, biantenarico que generalmente está unido por un enlace de N con Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* (1997) *TIBTECH* 15: 26-32. El oligosacárido puede incluir diversos hidratos de carbono, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tronco" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención pueden hacerse con el fin de crear variantes de anticuerpos con ciertas propiedades mejoradas.

Por ejemplo, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de hidrato de carbono que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Dichas variantes pueden haber mejorado la función ADCC. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de los EE.UU. N.º US 2003/0157108 (Presta, L.); documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "defucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: el documento US 2003/0157108; el documento WO 2000/61739; el documento WO 2001/29246; el documento US 2003/0115614; el documento US 2002/0164328; el documento US 2004/0093621; el documento US 2004/0132140; el documento US 2004/0110704; el documento US 2004/0110282; el documento US 2004/0109865; el documento WO 2003/085119; el documento WO 2003/084570; el documento WO 2005/035586; el documento WO 2005/035778; el documento WO2005/053742; el documento WO2002/031140; Okazaki *et al.* *J. Mol. Biol.* 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de estirpes celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen las células Lec13 CHO deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al.* *Arch. Biochem. Biophys* 249:533-545 (1986); la salicitud de patente de los EE.UU. N.º 2003/0157108 A1, Presta, L. y el documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente el ejemplo 11) y estirpes celulares inactivadas, tales como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO inactivadas (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech Bioeng* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al.* *Biotech Bioeng*, 94(4):680-688 (2006) y el documento WO2003/085107).

Se proporcionan adicionalmente variantes de anticuerpos con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo es bisecado por la GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una fucosilación reducida y/o una función ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpos, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); la patente de los EE.UU. N.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel *et al.*); el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran adicionalmente la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de restos). Dichas sustituciones pueden producirse en combinación con cualquiera de las variaciones descritas anteriormente.

En ciertas realizaciones, la invención incluye una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas las funciones efectoras, lo que la convierte en una candidata deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida

del anticuerpo *in vivo* es importante aunque ciertas funciones efectoras (tales como el complemento y la ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertas realizaciones, se miden las actividades de Fc del anticuerpo para asegurar que solo se mantienen las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades ADCC y/o CDC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de la unión a FcγR (por tanto posiblemente carece de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcγRn. Las células primarias para la mediación de ADCC, los linfocitos NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Se describen ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la Patente de los EE.UU. N.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I., *et al. Proc Natl. Acad Sci USA.* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I *et al., Proc Natl. Acad Sci USA* 82: 1499-1502 (1985); documento 5.821.337 (véase Brüggemann, M. *et al., J. Exp Med* 166: 1351-1361 (1987)). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radiactivo para citometría de flujo ACTI™ (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y los linfocitos citotóxicos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se describe en Clynes *et al. Proc Natl. Acad Sci USA.* 95:652-656 (1998). También pueden realizarse ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y por tanto carece de actividad CDC. Puede realizarse un ensayo de CDC para evaluar la activación del complemento (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al., J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. *et al., Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También pueden realizarse determinaciones de unión a FcγRn y de aclaramiento/semivida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al., Intl. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Se proporcionan otras variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se incluyen las alteraciones de FR. Se muestran sustituciones conservadoras en la Tabla 1 con el encabezamiento "sustituciones preferidas". Se proporcionan cambios más sustanciales, denominados "sustituciones de ejemplo" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden introducirse en un anticuerpo de interés y los productos pueden cribarse, por ejemplo, para determinar una actividad deseada, tal como la mejora de la unión a antígeno, la disminución de la inmunogenicidad, la mejora de ADCC o CDC, etc.

TABLA 1

Resto original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
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

Pueden conseguirse modificaciones en las propiedades biológicas de un anticuerpo mediante la selección de sustituciones que influyen en (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana o (c) el grueso de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo a las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A.L. Lehninger, en *Biochemistry*, segunda ed., págs. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

(1) apolares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

Como alternativa, los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basados en propiedades comunes de las cadenas laterales:

(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) restos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservadora o, en los sitios restantes (no conservados).

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para su desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) respecto al anticuerpo parental a partir del cual se generan. Una variante de sustitución de ejemplo es un anticuerpo de afinidad madurada, que puede generarse convenientemente usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en la presentación en fagos. En resumen, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las sustituciones de aminoácido posibles en cada sitio. Los anticuerpos generados de este modo se presentan a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con al menos parte de una proteína de envuelta de fagos (por ejemplo, el producto del gen III de M13) empaquetada en cada partícula. Las variantes presentadas en fago después se criban para determinar su actividad biológica (por ejemplo, la afinidad de unión). Con el fin de identificar sitios de región hipervariable candidatos para la modificación, puede realizarse la mutagénesis de rastreo (por ejemplo, de rastreo con alanina) para identificar restos de región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión a antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y los restos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas conocidas en materia, incluyendo las elaboradas en el presente documento. Una vez generadas dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado usando técnicas conocidas en materia, incluyendo las elaboradas en el presente documento, y pueden seleccionarse variantes con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para su desarrollo adicional.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de una variante previamente preparada o una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácido en una región Fc de los anticuerpos de la invención, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido incluyendo la de una cisteína bisagra.

De acuerdo con la presente descripción y los contenidos de la técnica, se considera que en algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo equivalente de tipo silvestre, por ejemplo en la región Fc. Estos anticuerpos no obstante conservarían sustancialmente las mismas características necesarias para su utilidad terapéutica en comparación con su equivalente de tipo silvestre. Por ejemplo, se cree que pueden hacerse ciertas alteraciones en la región Fc que darían como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alterada (es decir, mejorada o disminuida), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan y Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); la patente de los EE.UU. N.º 5.648.260; la patente de los EE.UU. N.º 5.624.821; y el documento WO94/29351 concerniente a otros ejemplos de variantes de región Fc. El documento WO00/42072 (Presta) y el documento WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a FcR. Véase, también, Shields *et al.* *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). Se describen anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), en el documento US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con uno o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Se describen variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida en la patente de los EE.UU. N.º 6.194.551B1, el documento WO99/51642. Véase, también, Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en la superficie de contacto de los polipéptidos Fc que comprenden la región Fc, en los que las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido Fc y una cavidad en un segundo polipéptido Fc, en las que la protuberancia es se puede ubicar en la cavidad de manera que se promueva la complejación de los polipéptidos de Fc primero y segundo. Los métodos de generación de anticuerpos con estas modificaciones son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describen en la patente de los EE.UU. N.º 5.731.168.

En otro aspecto más, puede ser deseable crear anticuerpos modificados por ingeniería con cisteína, por ejemplo, "thioMAbs", en los que uno o más restos de un anticuerpo se sustituyen por restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos se producen en los sitios accesibles del anticuerpo. Mediante la sustitución de los restos con cisteína, grupos tiol reactivos se ubican de este modo en los sitios accesibles del anticuerpo y pueden usarse para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos de fármacos o restos enlazador-fármaco, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, uno o más de los siguientes restos puede sustituirse por cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada.

8. Derivados de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para contener motivos no proteicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los motivos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de propileno/óxido de etileno, polioles polioxitilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede estar ramificado o sin ramificar. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, pueden ser las mismas o diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización puede determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se mejora, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteico que puede calentarse selectivamente mediante exposición a radiación. En una realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero no se limita a, las longitudes de onda que no dañan células normales, pero que calientan el resto no proteico a una temperatura a la que las células proximales al resto de anticuerpo no proteico son destruidas.

B. Ciertos métodos de preparación de anticuerpos

1. Ciertos métodos basados en el hibridoma

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales de la invención usando el método del hibridoma descrito primero por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975) y descrito adicionalmente, por ejemplo, en Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3):

253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, segunda ed., 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) y Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) con respecto a los hibridomas humano-humano.

5 Los métodos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. N.º 7.189.826 con respecto a la producción de anticuerpos IgM naturales humanos monoclonales a partir de estirpes celulares de hibridoma. Se describe una tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185- 91 (2005).

10 Para varias otras técnicas de hibridoma, véase, por ejemplo, el documento US 2006/258841; el documento US 2006/183887 (anticuerpos completamente humanos), el documento US 2006/059575; el documento US 2005/287149; el documento US 2005/100546; el documento US 2005/026229; y las patentes de los EE.UU. N.º 7.078.492 y 7.153.507. Un protocolo de ejemplo para la producción de anticuerpos monoclonales usando el método del hibridoma se describe como se indica a continuación. En una realización, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, es inmunizado para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización.

15 Se crean anticuerpos en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de un polipéptido que comprende SMO mutante o un fragmento del mismo y un adyuvante, tal como monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT). Un polipéptido que comprende SMO mutante o un fragmento del mismo pueden prepararse usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como métodos recombinantes, algunos de los cuales se describen adicionalmente en el presente documento. El suero de los animales inmunizados se ensaya para determinar anticuerpos anti-SMO mutante se administran opcionalmente inmunizaciones de refuerzo. Se aíslan linfocitos de los animales que producen

20 anticuerpos anti-SMO mutante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

Los linfocitos después se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Véase, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986). Pueden usarse células de mieloma que se fusionen de forma eficaz, que soporten una producción estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y que sean sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las células de mieloma de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, estirpes murinas de mieloma, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU. También se han descrito estirpes celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

40 Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), que son sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT. Preferentemente, se usan métodos de cultivo de células de hibridoma exentos de suero para reducir el uso de suero de origen animal, tal como el suero fetal bovino, como se describe, por ejemplo, en Even *et al.*, *Trends in Biotechnology*, 24 (3), 105-108 (2006).

Los oligopéptidos como herramientas para mejorar la productividad de los cultivos celulares de hibridoma se describen en Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005). Específicamente, los medios de cultivo convencionales se enriquecen con ciertos aminoácidos (alanina, serina, asparagina, prolina) o con fracciones de hidrolizado de proteína y la apoptosis puede ser suprimida significativamente mediante oligopéptidos sintéticos, constituidos por tres a seis restos de aminoácidos. Los péptidos están presentes en concentraciones milimolares o mayores.

55 El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales que se unen a SMO mutante. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma puede determinarse mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard. Véase, por ejemplo, Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

60 Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad, y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos convencionales. Véase, por ejemplo Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los

anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina tales como, por ejemplo, cromatografía en proteína A-Sefarosa y en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. Un procedimiento para el aislamiento de proteínas a partir de células de hibridoma se describe en el documento US 2005/176122 y la Patente de los EE.UU. N.º 6.919.436. El método incluye el uso mínimo de sales, tales como sales liotrópicas, en el proceso de unión y preferentemente también el uso de pequeñas cantidades de disolventes orgánicos en el proceso de elución.

2. Ciertos métodos de exploración de bibliotecas

Pueden prepararse anticuerpos de la invención usando bibliotecas combinatorias para cribar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, son conocidos diversos métodos en la técnica para generar bibliotecas de presentación en fagos y cribar dichas bibliotecas para detectar anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos métodos se describen en general en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001). Por ejemplo, un método de generación de anticuerpos de interés es a través del uso de una biblioteca de anticuerpos de fagos como se describe en Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-1093.

En principio, los clones de anticuerpo sintéticos se cribaron por exploración de bibliotecas de fagos que contienen fagos que presentan diversos fragmentos de la región variable de anticuerpo (Fv) fusionados a la proteína de envuelta del fago. Dichas bibliotecas de fagos se distribuyen mediante cromatografía de afinidad frente al antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y por tanto se separan de los clones sin unir en la biblioteca. Los clones de unión después se eluyen del antígeno y pueden enriquecerse adicionalmente mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. Cualquiera de los anticuerpos de la invención puede obtenerse diseñando un procedimiento de cribado de antígeno adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo de longitud completa usando las secuencias Fv del clon de fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, publicación NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3.

En ciertas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, una de cada una de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH), que ambas presentan tres bucles hipervariables (HVR) o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los dominios variables pueden presentarse de forma funcional en el fago, ya sea como fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), en los que VH y VL están unidas covalentemente a través de un péptido corto flexible o como fragmentos Fab, en los que están cada uno fusionados a un dominio constante e interactúan no covalentemente, como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como se usa en el presente documento, los clones de fago que codifican scFv y los clones de fago que codifican Fab se denominan colectivamente "clones de fago Fv" o "clones Fv".

Pueden clonarse por separado repertorios de genes VH y VL mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que después pueden explorarse para detectar clones de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad contra el inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. Como alternativa, puede clonarse el repertorio no tratado previamente para proporcionar una sola fuente de anticuerpos humanos contra una amplia gama de no auto-antígenos y también auto-antígenos sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también pueden prepararse bibliotecas no tratadas previamente de forma sintética clonando los segmentos del gen V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para conseguir el reordenamiento *in vitro* como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

En ciertas realizaciones, se usa fago filamentosos para presentar fragmentos de anticuerpo por fusión con la proteína de envuelta minoritaria pIII. Los fragmentos de anticuerpo pueden presentarse como fragmentos Fv monocatenarios, en que los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena polipeptídica por un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, como se describe por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) o como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona con pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula hospedadora bacteriana donde se ensambla una estructura Fab-proteína de envuelta que se presenta en la superficie del fago desplazando algunas proteínas de envuelta de tipo silvestre, por ejemplo como se describe en Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpo se obtienen de células inmunitarias recogidas de seres humanos o animales. Si se desea una biblioteca sesgada en favor de clones anti-SMO mutante, el sujeto se inmuniza con SMO para generar una respuesta de anticuerpos y se recuperan las células esplénicas y/o las células B circulantes u otros los linfocitos de sangre periférica (PBL) para la construcción de la biblioteca. En una realización preferida, se obtiene una biblioteca de fragmentos génicos de anticuerpo humano

sesgada en favor de dones anti-SMO mutante generando una respuesta de anticuerpos anti-SMO mutante en ratones transgénicos que llevan una serie funcional de genes de inmunoglobulina humana (y que carece de un sistema de producción de anticuerpos funcional endógeno) de modo que la inmunización con SMO da origen a células B que producen anticuerpos humanos contra SMO. La generación de ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos se describe a continuación.

Puede obtenerse enriquecimiento adicional para poblaciones celulares reactivas anti-SMO mutante usando un procedimiento de cribado adecuado para aislar células B que expresan anticuerpo unido a membrana específico de SMO mutante, por ejemplo, mediante separación celular con cromatografía de afinidad por SMO mutante o adsorción de células a SMO mutante marcado con fluorocromo seguido de clasificación celular activada por flujo (FACS).

Como alternativa, el uso de células esplénicas y/o células B u otras PBL de un donante sin inmunizar proporciona una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que SMO mutante no es antigénico. Para bibliotecas que incorporan la construcción de genes de anticuerpo *in vitro*, se recogen células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos de anticuerpo no reordenados. Las células inmunes de interés pueden obtenerse a partir de diversas especies animales, tales como seres humanos, ratones, ratas, lagomorfos, especies lupinas, caninas, felinas, porcinas, bovinas, equinas y aviáres, etc.

Se recuperan ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos variables de anticuerpo (incluyendo segmentos VH y VL) de las células de interés y se amplifican. En el caso de bibliotecas génicas de VH y VL reordenados, el ADN deseado puede obtenerse aislado el ADN genómico o ARNm de linfocitos seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que coinciden con los extremos 5' y 3' de los genes VH y VL reordenados como se describe en Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), haciendo de este modo diversos repertorios de gen V para su expresión. Los genes V pueden amplificarse a partir del ADNc y ADN genómico, con cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores directos basados en el segmento J como se describe en Orlandi *et al.* (1989) y en Ward *et al.*, *Nature*, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir de ADNc, los cebadores inversos también pueden basarse en el exón líder como se describe en Jones *et al.*, *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991) y los cebadores directos dentro de la región constante como se describe en Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, puede incorporarse degeneración en los cebadores como se describe en Orlandi *et al.* (1989) o Sastry *et al.* (1989). En ciertas realizaciones, la diversidad de la biblioteca se maximiza usando cebadores de PCR dirigidos a cada familia de gen V para amplificar todos los ordenamientos VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de la célula inmunitaria, por ejemplo como se describe en el método de Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Para clonar el ADN amplificado en vectores de expresión, pueden introducirse sitios de restricción raros dentro del cebador de PCR como una marca en un extremo como se describe en Orlandi *et al.* (1989) o por amplificación adicional por PCR con un cebador marcado como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

Pueden obtenerse repertorios de genes V reordenados sintéticamente *in vitro* a partir de segmentos génicos V. La mayoría de los segmentos génicos de VH humanos se han clonado y secuenciado (notificado en Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)) y cartografiado (notificado en Matsuda *et al.*, *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993)); estos segmentos donados (incluyendo todas las conformaciones principales del bucle H1 y H2) pueden usarse para generar diversos repertorios génicos de VH con cebadores de PCR que codifican bucles H3 de diversa secuencia y longitud como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). También pueden prepararse repertorios de VH con toda la diversidad de secuencia centrada en un largo bucle H3 de una única longitud como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos humanos V_k y v_l se han donado y secuenciado (notificado en Williams y Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) y pueden usarse para preparar repertorios sintéticos de cadena ligera. Los repertorios sintéticos de gen V, basados en un intervalo de pliegues VH y VL y longitudes L3 y H3, codificarán anticuerpos de diversidad estructural considerable. Después de la amplificación del ADN que codifica el gen V, pueden reordenarse segmentos de gen V de la línea germinal *in vitro* de acuerdo con los métodos de Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Pueden construirse repertorios de fragmentos de anticuerpo combinando repertorios génicos de VH y VL juntos de varios modos. Cada repertorio puede crearse en diferentes vectores y los vectores pueden recombinarse *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128: 119-126 (1993) o *in vivo* por infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). El enfoque de recombinación *in vivo* aprovecha la naturaleza de dos cadenas de los fragmentos Fab para superar el límite en el tamaño de la biblioteca impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Se clonan repertorios de VH y VL no tratados previamente por separado, uno en un fagómido y el otro en un vector fágico. Las dos bibliotecas después se combinan por infección con fago de las bacterias que contienen fagómido de modo que cada célula contenga una combinación diferente y el tamaño de la biblioteca esté limitado solamente por la cantidad de células presentes (aproximadamente 10¹² clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de modo que los genes VH y VL se recombinen en un único replicón y se co-empaqueten en viriones fágicos. Estas enormes bibliotecas proporcionan grandes cantidades de anticuerpos diversos de buena afinidad (Kd⁻¹ de aproximadamente

10^{-8} M).

Como alternativa, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991) o ensamblarse juntos mediante PCR y después clonarse, por ejemplo como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). El ensamblaje mediante PCR también puede usarse para unir ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv de cadena sencilla (scFv). En otra técnica más, se usa "ensamblaje mediante PCR en célula" para combinar genes VH y VL dentro de linfocitos mediante PCR y después se clonan los repertorios de genes ligados como se describe en Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

Los anticuerpos producidos por bibliotecas no tratadas previamente (naturales o sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (Kd^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M^{-1}), pero la maduración de afinidad también puede imitarse *in vitro* construyendo y reseleccionando a partir de bibliotecas secundarias como se describe en Winter *et al.* (1994), citado anteriormente. Por ejemplo, puede introducirse una mutación aleatoria *in vitro* usando polimerasa propensa a errores (notificado en Leung *et al.*, *Technique*, 1: 11-15 (1989)) en el método de Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992). Además, la maduración de afinidad puede realizarse por mutación aleatoria de una o más CDR, por ejemplo usando PCR con cebadores que portan secuencia aleatoria que abarca la CDR de interés, en clones Fv individuales seleccionados y cribando para detectar clones de mayor afinidad. El documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describía un método para inducir mutagénesis en una región determinante de complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de cadena ligera. Otro enfoque eficaz es recombinar los dominios VH o VL seleccionados por presentación en fagos con repertorios de variantes de dominio V de origen natural obtenidas de donantes no inmunizados y cribar en busca de mayor afinidad en varias rondas de redistribución de cadenas como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades de aproximadamente 10^{-9} M o menos.

La exploración de las bibliotecas puede lograrse mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede usarse SMO mutante para recubrir los pocillos de placas de adsorción, expresarse en células hospedadoras fijadas a placas de adsorción o usarse en clasificación celular o conjugarse a biotina para captura con perlas recubiertas con estreptavidina o usarse en cualquier otro método para exponer bibliotecas de presentación en fagos.

Las muestras de biblioteca de fagos se ponen en contacto con SMO mutante inmovilizado en condiciones adecuadas para la unión de al menos una porción de las partículas fágicas con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo el pH, la fuerza iónica, la temperatura y similares se seleccionan para imitar las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y después se eluyen mediante ácido, por ejemplo como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991) o mediante álcali, por ejemplo como se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) o mediante competición del antígeno SMO mutante, por ejemplo en un procedimiento similar al método de competición de antígeno de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Los fagos pueden enriquecerse 20-1000 veces en una única ronda de selección. Además, los fagos enriquecidos pueden cultivarse en cultivo bacteriano y someterse a rondas adicionales de selección.

La eficacia de selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado y si múltiples fragmentos de anticuerpo en un único fago puede acoplar simultáneamente con antígeno. Los anticuerpos con cinética rápida de disociación (y débiles afinidades de unión) pueden retenerse mediante el uso de lavados cortos, presentación en fagos multivalentes y alta densidad de recubrimiento de antígeno en fase sólida. La alta densidad no solamente estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, sino que favorece la re-unión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con lenta cinética de disociación (y buenas afinidades de unión) puede promoverse mediante el uso de lavados largos y presentación en fagos monovalentes como se describe en Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690 y una baja densidad de recubrimiento de antígeno como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

Es posible seleccionar entre anticuerpos fágicos de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, por SMO mutante. Sin embargo, la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como se realiza en algunas de las técnicas de maduración de afinidad) probablemente da origen a muchos mutantes, uniéndose la mayoría al antígeno y unos pocos con mayor afinidad. Limitando la SMO mutante, podrían eliminarse por competición los fagos raros de alta afinidad. Para retener todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos pueden incubarse con exceso de SMO mutante biotinilado, pero con el SMO mutante biotinilado a una concentración de molaridad inferior que la constante de afinidad molar diana para la SMO mutante. Los fagos de unión de alta afinidad después pueden capturarse por perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite seleccionar los anticuerpos de acuerdo con sus afinidades de unión, con sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con una afinidad tan solo dos veces mayor a partir de un gran exceso de fagos con menor afinidad. Las condiciones usadas en el lado de fagos unidos a una fase sólida también pueden manipularse para discriminar basándose en la cinética de disociación.

Los clones anti-SMO mutante pueden seleccionarse por actividad. En ciertas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos anti-SMO mutante que se unen a células vivas que expresan de forma natural SMO mutante, tal como

células tumorales resistente a GDC-0449. En una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-SMO mutante que se unen a la misma región a la que se une el GDC-0449 en la SMO de tipo silvestre. Los clones Fv correspondientes a dichos anticuerpos anti-SMO mutante pueden seleccionarse por (1) aislamiento de clones anti-SMO mutante a partir de una biblioteca de fagos como se ha descrito anteriormente y opcionalmente amplificación de la población aislada de clones fágicos por crecimiento de la población en un hospedador bacteriano adecuado; (2) selección de SMO mutante y una segunda proteína frente a los cuales se desea actividad de bloqueo y de no bloqueo, respectivamente; (3) adsorción de los clones fágicos anti-SMO mutante en SMO mutante inmovilizado; (4) uso de un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier don no deseado que reconozca determinantes de unión a SMO mutante que solapan o están compartidos con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) elución de los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades deseadas de bloqueo/no bloqueo pueden enriquecerse adicionalmente repitiendo los procedimientos de selección descritos en el presente documento una o más veces.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o los clones Fv de presentación en fagos de la invención se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de cadena pesada y ligera de interés del molde de ADN del hibridoma o fago). Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras tales como células *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) y Pluckthun, *Immunol Revs*, 130: 151 (1992).

El ADN que codifica los clones Fv de la invención puede combinarse con secuencias conocidas de ADN que codifican regiones constantes de cadena pesada y/o cadena ligera (por ejemplo, las secuencias apropiadas de ADN pueden obtenerse de Kabat *et al.*, citado anteriormente) para formar clones que codifican cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa o parcial. Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal. Un clon Fv derivado del ADN de dominio variable de una especie animal (tal como el ser humano) y después fusionado al ADN de región constante de otra especie animal para formar una o más secuencias codificantes para cadena pesada y/o cadena ligera "híbrida", de longitud completa se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" como se usa en el presente documento. En ciertas realizaciones, un clon Fv derivado de ADN variable humano se fusiona con ADN de región constante humana para formar una o más secuencias codificantes para cadenas pesadas y/o ligeras completamente humanas, de longitud completa o parcial.

El ADN que codifica el anticuerpo anti-SMO mutante derivado de un hibridoma de la invención también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para dominio constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el método de Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado de hibridoma o clon Fv puede modificarse adicionalmente por unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de todo o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no de inmunoglobulina. De este modo, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de los anticuerpos derivados del clon de Fv del o clon de hibridoma de la invención.

3. Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

También pueden producirse anticuerpos usando métodos recombinantes. Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-SMO mutante, se aísla ácido nucleico que codifica el anticuerpo y se inserta en un vector replicable para su clonación adicional (amplificación del ADN) o para su expresión. El ADN que codifica el anticuerpo puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Hay disponibles muchos vectores. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

a) Componente de secuencia señal

Un anticuerpo de la invención puede producirse de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína o el polipéptido maduros. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferentemente una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariontas que no reconocen y procesan una secuencia señal de anticuerpo nativo, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procarionta seleccionada, por ejemplo, entre el grupo de los líderes de la fosfatasa alcalina, la penicilinasasa, lpp o la enterotoxina II estable al calor. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal nativa puede sustituirse por,

por ejemplo, el líder de la invertasa de levadura, el líder del factor (incluyendo los líderes del factor de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de células de mamífero, las secuencias señal de mamíferos, así como líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple, están disponibles.

5 b) Origen de replicación

10 Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células hospedadoras seleccionadas. En general, en vectores de donación esta secuencia es una que permita al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico del hospedador, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. 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 Gram-negativas, el origen del plásmido 2μ es adecuado para levaduras y varios orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, no se necesita el componente origen de replicación para vectores de expresión en mamíferos (el origen SV40 normalmente puede usarse solo porque contiene el promotor temprano).

15 c) Selección del componente génico

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

25 Un ejemplo de un esquema de selección usa un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Esas células que se transforman satisfactoriamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por tanto sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

30 Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son los que posibilitan la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico de anticuerpo, tales como DHFR, glutamina sintetasa (GS), timidina cinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc, etc.

35 Por ejemplo, las células transformadas con el gen DHFR se identifican cultivando los transformantes en un medio de cultivo que contenga metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. En estas condiciones, el gen DHFR se amplifica junto con cualquier otro ácido nucleico co-transformado. Puede usarse una estirpe celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

40 Como alternativa, las células transformadas con el gen GS se identifican mediante el cultivo de los transformantes en un medio de cultivo que contenga L-metionin sulfoximina (MSX), un inhibidor de la GS. En estas condiciones, el gen GS se amplifica junto con cualquier otro ácido nucleico co-transformado. El sistema de selección/amplificación de GS puede usarse en combinación con el sistema de selección/amplificación de DHFR descrito anteriormente.

45 Como alternativa, las células hospedadoras (particularmente hospedadoras de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de interés, gen DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable, tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse mediante el crecimiento celular en un medio que contenga un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente de los EE.UU. N.º 4.965.199.

50 Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, 282: 39 (1979)). 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.º 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación mediante el crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos que llevan el gen *Leu2*.

60 Además, los vectores derivados de los plásmido circular pKD1 de 1,6 μ m pueden usarse para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Como alternativa, se informó de un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternera recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990). También se han desvelado vectores de expresión multicopia estables para la secreción de albúmina sérica humana recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer et al., *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991).

d) Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen generalmente un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y está unido operativamente al ácido nucleico que codifica un anticuerpo. Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor *phoA*, los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, el promotor de la fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, otros promotores bacterianos conocidos son adecuados. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (SD) unida operativamente al ADN que codifica un anticuerpo.

Las secuencias promotoras son conocidas para eucariotas. Virtualmente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT ubicada aproximadamente 25 a 30 bases corriente arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia que se encuentra 70 a 80 bases corriente arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de forma adecuada en vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como la enolasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la hexocinasa, la piruvato descarboxilasa, la fosfofructocinasa, la glucosa-6-fosfato isomerasa, la 3-fosfoglicerato mutasa, la piruvato cinasa, la triosafosfato isomerasa, la fosfoglucosa isomerasa y la glucocinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas al metabolismo del nitrógeno, la metalotioneína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Se describen adicionalmente vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levaduras en el documento EP 73.657. Los potenciadores de levadura también se usan ventajosamente con promotores de levadura.

La transcripción de anticuerpos a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero puede controlarse, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del poliovirus, el virus de la viruela aviar, el adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B, el virus de simio 40 (SV40) o a partir de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, a partir de promotores de choque térmico, a condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células hospedadoras.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Se desvela un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos usando el virus del papiloma bovino como un vector en la patente de los EE.UU. N.º 4.419.446. Se desvela una modificación de este sistema en la patente de los EE.UU. N.º 4.601.978. Véase también, Reyes et al., *Nature* 297:598-601 (1982) acerca de la expresión de ADNc de interferón β humano en células de ratón con el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, puede usarse la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

e) Componente elemento potenciador

La transcripción de ADN que codifica el polipéptido de anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores con frecuencia se aumenta insertando una secuencia potenciadora en el vector. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) acerca de elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede sufrir corte y ajuste en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia que codifica el polipéptido de anticuerpo, pero se localiza preferentemente en un sitio 5' desde el promotor.

f) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células hospedadora eucariotas (levadura, hongo, insecto, planta, animal, ser humano o células nudeadas de otros microorganismos multicelulares) normalmente también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están

habitualmente disponibles a partir de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región poliadenilación de la hormona bovina del crecimiento. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

g) Selección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores del presente documento son las células procariotas, levaduras o células eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen las eubacterias, como los organismos Gramnegativos o Grampositivos, por ejemplo, Enterobacterias 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, *B. licheniformis* 41P desvelado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son adecuados. Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes.

Un anticuerpo de longitud completa, proteínas de fusión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pueden producirse en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glicosilación ni la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) que por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen una mayor semivida en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, el documento US 5.648.237 (Carter *et al.*), el documento US 5.789.199 (Joly *et al.*), el documento US 5.840.523 (Simmons *et al.*), que describe secuencias de la región de iniciación de la traducción (TIR) y secuencias señal para optimizar la expresión y la secreción. Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), págs. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*. Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y puede purificarse por medio de, por ejemplo, una proteína A o una columna G dependiendo del isotipo. La purificación final puede realizarse de forma similar al proceso para purificar el anticuerpo expresado por ejemplo, en células CHO.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o levaduras son hospedadores de donación o expresión adecuados para los vectores que codifican el anticuerpo. *Saccharomyces cerevisiae* o la levadura del pan, es el más habitualmente utilizado entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, varios otros géneros, especies y cepas están habitualmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces* hospedadores tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyopcladium* y *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Para una revisión que analice el uso de levaduras y hongos filamentosos para la producción de proteínas terapéuticas, véase, por ejemplo, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004).

Pueden seleccionarse ciertos hongos y cepas de levadura en los que las vías de glicosilación han sido "humanizadas", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o totalmente humano. Véase, por ejemplo, Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) (que describe la humanización de la vía de glicosilación en *Pichia pastoris*); y Gerngross *et al.*, citado anteriormente).

También se obtienen células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo glicosilado a partir de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen las células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células hospedadoras de insectos permisivas de hospedadores tales como, *Spodoptera frugiperda* (oruga) *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Una diversidad de cepas virales para la transfección están disponibles públicamente, 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 de acuerdo con la presente invención, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, lenteja de agua (*Lemnaceae*), alfalfa (*M. truncatula*) y tabaco como hospedadores. Véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describe la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Pueden usarse células de vertebrados como hospedadores y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento habitual. Son ejemplos de estirpes celulares hospedadoras de mamíferos útiles la estirpe CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la estirpe de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); 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 cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado 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 mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals NY Acad Sci* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una estirpe de hepatoma humano (Hep G2). Otras estirpes celulares hospedadoras de mamíferos útiles incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo las células DHFR- CHO (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); y estirpes celulares de mieloma tales como NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas estirpes celulares hospedadoras de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), págs. 255-268.

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o donación anteriormente descritos para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para la inducción de promotores, la selección de transformantes o la amplificación de los genes que codifican las secuencias deseadas.

h) Cultivo de células hospedadoras

Las células hospedadoras utilizadas para producir un anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en diversos medios. Son adecuados medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), las patentes de los EE.UU. N.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; el documento WO 90/03430; el documento WO 87/00195; o la patente de los EE.UU. Re. 30.985 puede usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse 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, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco GENTAMICINA™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas para los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para expresión y serán evidentes para los especialistas en la técnica.

i) Purificación de anticuerpo

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como una primera etapa, los desechos particulados, células hospedadoras o fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico desde *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 residuos celulares pueden eliminarse mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, generalmente primero se concentran los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión usando un filtro de concentración de proteína disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

La composición de anticuerpo preparada a partir de estas células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis en gel, diálisis y 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 es isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Puede usarse proteína A para purificar anticuerpos que se basan en las cadena pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Gusset *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad es muy habitualmente agarosa, pero hay disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como el vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que 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 proteína tales como fraccionamiento en

columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poliácido aspártico), cromatofluoreografía, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio dependiendo del anticuerpo que se recupere.

Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferentemente realizada a bajas concentraciones salinas (por ejemplo, de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

En general, diversas metodologías para la preparación de anticuerpos para su uso en investigación, ensayos y clínica están bien establecidos en la técnica, son coherentes con las metodologías descritas anteriormente y/o como son consideradas apropiadas por un experto en la materia para un anticuerpo particular de interés.

15 C. Inmunoconjugados

La divulgación también proporciona inmunoconjugados (denominados indistintamente "conjugados anticuerpo-fármaco" o "ADC" (del inglés *antibody-drug conjugates*)), que comprenden un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como un agente quimioterápico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Se han usado inmunoconjugados para el suministro local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos que destruyen o inhiben el crecimiento o proliferación de las células, en el tratamiento del cáncer (Lambert, J. (2005) *Curr. Opin. in Pharmacology* 5:543-549; Wu et al (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) i 3:207-212; Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26:151-172; patente de los EE.UU. N.º 4.975.278). Los inmunoconjugados permiten el suministro dirigido del resto de fármaco a un tumor y la acumulación intracelular en los mismos, donde la administración sistémica de estos fármacos no conjugados puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad a células normales así como a las células tumorales que se intentan eliminar (Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (15 de Mar. de 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (eds.), págs. 475-506). Tanto los anticuerpos polidionales como los anticuerpos monoclonales han sido notificados como útiles en estas estrategias (Rowland et al., (1986). *Cancer Immunol Immunother* 21:183-87). Los fármacos utilizados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland et al., (1986) citado anteriormente). Las toxinas utilizadas en los conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina de la difteria, toxinas de plantas tales como ricina, toxinas de molécula pequeña, tales como geldanamicina (Mandler et al. (2000) *J. Nat. Cancer Inst.* 92 (19): 1573-1581; Mandler et al. (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028; Mandler et al. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu et al., (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623) y caliqueamicina (Lode et al. (1998) *Cancer Res* 58: 2928; Hinman et al. (1993) *Cancer Res* 53: 3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos a través de mecanismos que incluyen la unión a la tubulina, la unión al ADN o la inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con grandes anticuerpos o ligandos de receptores proteicos.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetano, Biogen/Idec) es un conjugado anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra el antígeno CD20 descubierto en la superficie de linfocitos B normales y malignos y el radioisótopo ¹¹¹In o ⁹⁰Y unido por enlazador-quelante tiourea (Wiseman et al (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra el linfoma no Hodgkin de células B (LNH), la administración provoca citopenias severas y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo contra huCD33 unido a caliqueamicina, se aprobó en el año 2000 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda mediante inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; patentes de los EE.UU. N.º 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo contra huC242 unido mediante el enlace disulfuro SPP al resto de fármaco maitansinoide, DM1, está avanzando en ensayos de fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tal como de colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal anti-antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) unido al resto de fármaco maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el tratamiento potencial de tumores de próstata. Los péptidos auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron con anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específicos para CD30 en neoplasias hematológicas) (Doronina et al (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784) y están en desarrollo terapéutico.

En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo y un agente quimioterápico u otra toxina. Los agentes quimioterápicos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen en el presente documento (por ejemplo, anteriormente). Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos no de unión de toxina diftérica, cadena de exotoxina A (de Pseudomonas aeruginosa), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modicina A, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas diantina, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Hay disponible diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se preparan usando diversos agentes bifuncionales de acoplamiento de proteína tales como de N-succinimidil-3-(2-piridilditiolo) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p- azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazonio-benzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de flúor (tales como 1,5-difluoro-2,4- dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de un radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

También se incluyen en el presente documento conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteceno y CC1065 y los derivados de estas toxinas que tienen actividad toxina.

25 1. Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) de la invención conjugado con una o más moléculas de maitansinoide.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente de los EE.UU. N.º 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de los EE.UU. N.º 4.151.042). Se desvelan maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo, por ejemplo, en las patentes de los EE.UU. N.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Los restos de fármaco maitansinoide son restos atractivos de fármaco en conjugados anticuerpo-fármaco porque son: (i) relativamente accesibles de preparar por fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) susceptibles de derivatización con grupos funcionales adecuados para conjugación a través de los enlazadores no disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma y (iv) eficaces contra diversas estirpes celulares tumorales.

Se desvelan inmunoconjugados que contienen maitansinoides, métodos para preparar los mismos y su uso terapéutico, por ejemplo, en las patentes de los EE.UU. N.º 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1. Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM 1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico hacia células cancerosas de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral in vivo. Chari *et al.*, *Cancer Research* 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en que se conjugó un maitansinoide mediante un enlazador disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas de células cancerosas de colon humano o a con otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une a HER-2/oncogén neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se ensayó in vitro en la línea de células cancerosas de mama humana SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco consiguió un grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando la cantidad de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Los conjugados anticuerpo-maitansinoide se preparan por enlace químico de un anticuerpo con una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 5.208.020. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha demostrado eficacia en la potenciación de la citotoxicidad de células diana sin afectar de forma negativa a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de la toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad sobre el uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y pueden sintetizarse mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se desvelan, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. N.º 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones no de patente referidas anteriormente en el presente documento. Los maitansinoides

preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tal como diversos ésteres de maitansinol.

Existen muchos grupos de unión conocidos en la técnica para preparar conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los desvelados en la patente de los EE.UU. N.º 5.208.020 o la patente EP 0 425 235 B1, Chari *et al.*, *Cancer Research* 52:127-131 (1992) y la solicitud de patente de los EE.UU. N.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los conjugados anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazador SMCC pueden prepararse como se describe en la solicitud de patente de los EE.UU. N.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los grupos de unión incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos inestables en ácido, grupos fotoinestables, grupos inestables en peptidasa o grupos inestables en esterasa, como se desvela en las patentes identificadas anteriormente, prefiriéndose grupos disulfuro y tioéter. Se describen y ejemplifican en el presente documento grupos de unión adicionales.

Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide pueden prepararse usando diversos agentes bifuncionales de acoplamiento de proteína tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), di-isocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de flúor (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, *Biochem. J.* 173:723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El enlazador puede unirse a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace éster puede formarse por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas convencionales de acoplamiento. La reacción puede suceder en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o un análogo de maitansinol.

2. Auristatinas y dolastatinas

En algunas realizaciones, el inmunoc conjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con dolastatinas o análogos peptídicos y derivados de dolostatina, las auristatinas (patentes de los EE.UU. N.º 5635483; 5780588). Las dolastatinas y auristatinas han demostrado que impiden la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke *et al.* (2001) *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(12):3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (documento US 5663149) y antifúngica (Pettit *et al.* (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). El resto de fármaco dolostatina o auristatina puede unirse al anticuerpo a través del extremo N (amino) o el extremo C (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

Las realizaciones de ejemplo de auristatina incluyen los restos de fármaco monometilauristatina unidos a extremo N DE y DF, descritos en "*Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands*", documento de los EE.UU. N.º Ser. 10/983.340, presentado el 5 de noviembre de 2004.

Normalmente, los restos de fármaco basados en péptido puede prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlace peptídicos puede prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "*The Peptides*", volumen 1, pág. 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los restos de fármaco auristatina/dolostatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos de los documentos: US 5635483; US 5780588; Pettit *et al.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit *et al.* (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., *et al.* *Synthesis*, 1996, 719-725; y Pettit *et al.* (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863. Véase también Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21(7):778-784; "*Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands*", documento de los EE.UU. N.º Ser. 10/983.340, presentado el 5 de noviembre de 2004, (que describe, por ejemplo, enlazadores y métodos para preparar compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados con enlazadores).

3. Caliqueamicina

En otras realizaciones, el inmunoc conjugado comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas del ADN bicatenario en concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia caliqueamicina, véanse las patentes de los EE.UU. 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, US 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (todo para American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, γ 11, α 21, α 31, N-acetil- γ 11, PSAG y θ 11 (Hinman *et al.*, *Cancer Research* 53: 3.336-3.342 (1993), Lode *et al.*, *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Los EE.UU. mencionadas anteriormente para American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral que el anticuerpo puede conjugarse es QFA que

es un antifolato. Tanto caliqueamicina y QFA tienen sitios de acción intracelulares y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por tanto, la captación celular de estos agentes a través de internalización mediada por anticuerpo mejora en gran medida sus efectos citotóxicos.

5 4. Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las patentes de Estados Unidos 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos no de unión de toxina diftérica, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modicina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricoteenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente divulgación incluye adicionalmente un inmunoc conjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nudeolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Hay disponible diversos isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios de centelleografía, por ejemplo Tc^{99m} o I^{123} o un marcador de espín para imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, MRI), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcadores u otros marcadores pueden incorporarse en el conjugado de modos conocidos. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis química de aminoácidos usando precursores adecuados de aminoácido que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcadores tales como Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} pueden unirse a través de un resto de cisterna en el péptido. El itrio-90 puede unirse a través de un resto de lisina. El método IODOGEN (Fraker *et al.* (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) puede usarse para incorporar yodo-123. "*Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy*" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando diversos agentes bifuncionales de acoplamiento de proteína tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), di-isocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de flúor (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento W094/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador inestable en ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotoestable, un enlazador dimetilo o un enlazador que contenga disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Research* 52:127-131 (1992); patente de los EE.UU. N.º 5.208.020).

Los compuestos de la invención incluyen expresamente, aunque no se limitan a, ADC preparado con reactivos de entrecruzamiento: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles en el mercado (por ejemplo, en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EEUU). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 *Applications Handbook and Catalog*.

60 5. Preparación de conjugados anticuerpo-fármaco

En los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención, un anticuerpo (Ab) se conjuga con uno o más restos de fármaco (D), por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo ($p = 1$ a aproximadamente 20), a través de un enlazador (L). El ADC de la fórmula que se muestra a continuación puede prepararse mediante varias vías, empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo

enlazador bivalente, para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Se describen en el presente documento métodos adicionales para preparar ADC.

5
Ab-(L-D)p

El enlazador puede estar compuesto por uno o más componentes enlazadores. Los componentes enlazadores de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrullina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxycarbonilo ("PAB"), N-succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato ("SMCC") y N-succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"). Se conocen en la técnica componentes enlazadores adicionales y algunos se describen en el presente documento. Véase también "*Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands*", documento de los EE.UU. N.º Ser. 10/983.340, presentado el 5, de noviembre de 2004.

En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender restos de aminoácido. Los componentes enlazadores de aminoácido de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos de ejemplo incluyen: valina-citrullina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Tripéptidos de ejemplo incluyen: glicina-valina-citrullina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los restos de aminoácido que comprenden un componente enlazador de aminoácido incluyen los de origen natural, así como aminoácidos minoritarios y análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como citrulina. Pueden diseñarse componentes enlazadores de aminoácido y optimizarse en sus selectividad para escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, cathepsina B, C y D o una plasmina proteasa.

Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina N-terminales, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcar donde el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol, e hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en motivos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformiatos y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los antibióticos pueden hacerse reactivos para su conjugación con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Cada puente de cisteína formará de este modo, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos a través de la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo (o fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprendan uno o más restos de aminoácido cisteína no nativos).

Los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención también pueden producirse por modificación del anticuerpo para introducir motivos electrófilos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo enlazador o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con agentes oxidantes peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos enlazadores o restos de fármaco. Los grupos de base de Schiff imina resultantes pueden formar un enlace estable o pueden reducirse, por ejemplo, por reactivos de boro hidruro para formar enlaces amina estables. En una realización, la reacción de la porción hidrato de carbono de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o meta-peryodato de sodio pueden producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hemanson, *Bioconjugate Techniques*). En otra realización, proteínas que contienen restos de serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; documento US 5362852). Dicho aldehído puede hacerse reaccionar con un resto de fármaco o nucleófilo enlazador.

Análogamente, los grupos nucleófilos en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en motivos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformiatos y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimida.

Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado ya sea adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en la pre-dirección a tumores en la que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de aclaramiento y después la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

IV. Métodos

A. Métodos diagnósticos y métodos de detección de SMO mutante con anticuerpos

En un aspecto, los anticuerpos de la invención son útiles para detectar la presencia de SMO mutante en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en el presente documento abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como tejido tumoral.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para detectar la presencia de SMO mutante en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-SMO mutante en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-SMO mutante a la SMO mutante y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-SMO mutante y la SMO mutante.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para diagnosticar un trastorno asociado a la expresión de la SMO mutante. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula de ensayo con un anticuerpo anti-SMO mutante; determinar el nivel de expresión (ya sea cuantitativa o cualitativamente) de SMO mutante por la célula de ensayo mediante la detección de la unión del anticuerpo anti-SMO mutante a la SMO mutante; y comparar el nivel de expresión de la SMO mutante por la célula de ensayo con el nivel de expresión de la SMO mutante por una célula de control (por ejemplo, una célula normal del mismo origen tisular que la célula de ensayo o una célula que exprese SMO de tipo silvestre en niveles comparables a dicha célula normal), en el que un nivel más alto de expresión de la SMO mutante por la célula de ensayo en comparación con la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado a la expresión aumentada de SMO mutante. En ciertas realizaciones, la célula de ensayo se obtiene de un individuo sospechoso de tener un trastorno asociado a la expresión aumentada de SMO mutante. En ciertas realizaciones, el trastorno es un trastorno proliferativo celular, tal como un cáncer o un tumor.

Los trastornos de ejemplo que pueden diagnosticarse usando un anticuerpo de la invención incluyen, pero no se limitan a, el meduloblastoma, el cáncer de páncreas y el carcinoma de células basales.

Pueden usarse otros métodos determinados para detectar la unión de anticuerpos a SMO mutante. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión a antígeno que son bien conocidos en la técnica, tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoenzimático), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A e inmunohistoquímica (IHC).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos están marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, etiquetas o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, densos en electrones, quimioluminiscentes y radiactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciémaga y luciferasa bacteriana (patente de los EE.UU. N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina, β galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos se inmovilizan sobre una matriz insoluble. La inmovilización puede implicar la separación de un anticuerpo anti-SMO mutante desde cualquier SMO mutante que permanezca libre en solución. Esto se consigue convencionalmente ya sea mediante la insolubilización del anticuerpo anti-SMO mutante antes del procedimiento de ensayo, como mediante la adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich *et al.*, documento US 3.720.760) o mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, usando entrecruzamiento con glutaraldehído) o mediante la insolubilización del anticuerpo anti-SMO mutante después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-SMO mutante y la SMO mutante, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

Se entiende que cualquiera de las realizaciones de diagnóstico o detección anteriores puede realizarse usando un inmunoconjugado de la divulgación, en lugar, o además de, un anticuerpo anti-SMO mutante.

B. Métodos de detección de SMO mutante con sondas de ácido nucleico

En un aspecto, las sondas de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para detectar la presencia de ácido nucleico de SMO mutante en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en el presente documento abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como tejido tumoral.

En un aspecto, la invención proporciona un método para detectar la presencia de ácido nucleico que codifica SMO mutante en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto el ácido nucleico de la muestra biológica con una sonda como se describe en el presente documento e hibridar la sonda con el ácido nucleico en condiciones permisivas para la hibridación en condiciones rigurosas y detectar si se forma un complejo entre la sonda y la muestra de ácido nucleico.

El ácido nucleico que codifica SMO mutante puede detectarse usando cualquier metodología conocida en la técnica incluyendo, pero no limitada a, el uso de sondas como se describe en el presente documento o mediante amplificación por PCR, secuenciación rTPCR, polimorfismo conformacional monocatenario (SSCP), digestión del ADN de restricción diferencial, hibridación o cualquier otro método conocido en la técnica.

En estos métodos, la detección de una SMO mutante como se describe en el presente documento indica la presencia de un trastorno asociado a la expresión aumentada de SMO mutante (es decir, resistencia al tratamiento con un inhibidor de Smo tal como GDC-0449). En ciertas realizaciones, la célula de ensayo se obtiene de un individuo sospechoso de tener un tumor resistente asociado a la expresión de SMO mutante.

Los trastornos de ejemplo que pueden diagnosticarse usando un anticuerpo de la invención incluyen, pero no se limitan a, el meduloblastoma, el cáncer de páncreas y el carcinoma de células basales.

C. Métodos de cribado de SMO mutante en ensayos celulares

La SMO mutante puede detectarse en ensayos celulares conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a la unión de un anticuerpo que detecta SMO mutante a la superficie de una muestra celular, tal como una tinción inmunohistoquímica *in vitro* de una muestra de tumor, de las preparaciones histológicas de muestras de tumores o tejidos sospechosos de contener SMO mutante. Pueden realizarse ensayos funcionales en los que una muestra de tejido se pone en contacto con GDC-0449 y hedgehog para determinar si se produce la señalización de Hh (por ejemplo, mediante la medición de la activación de componentes de la vía, la expresión de Gli y similares). Cualquier ensayo funcional que use la vía de señalización Hh que pueda ser interrumpido mediante GDC-0449, puede usarse en el método de la invención para determinar la presencia de una SMO mutante.

D. Métodos de cribado de compuestos que se unen a SMO mutante

La invención proporciona un método para cribar compuestos que se unen a la SMO mutante. Sin quedar ligado a ningún modo particular de funcionamiento, se espera en gran medida por la manera en que GDC-0449 se une a SMO de tipo silvestre y no se une a SMO mutante, un compuesto que actúa como un inhibidor de la SMO mutante se una a la SMO mutante en la misma región dentro de la porción carboxi-terminal del dominio transmembrana N.º 6 (TM6). Por tanto, se puede expresar esta región de la proteína SMO mutante y realizar ensayos de unión usando una biblioteca de compuestos mediante cualquier medio conocido en la técnica. También puede usarse una biblioteca más pequeña de compuestos representados por las variaciones de GDC-0449 usando un enfoque basado en el modelado de puntos de contacto potenciales de GDC-0449 y después, modelando puntos de contacto similares para la SMO mutante y variaciones de GDC-0449. Dichos programas de modelado y algoritmos pueden ser cualquiera que se conozca en la técnica. Los compuestos que se unen a SMO mutante y SMO de tipo silvestre pueden identificarse como inhibidores de la SMO tanto de tipo silvestre como mutante. Como alternativa, pueden descubrirse compuestos que se unen a la SMO mutante, pero que no se unen a la SMO de tipo silvestre y por tanto sean inhibidores solamente de la SMO mutante.

En una realización, los compuestos que se criban están compuestos de moléculas pequeñas tales como variantes de GDC-0449. En otras realizaciones, los compuestos que se unen a la SMO mutante son anticuerpos que reconocen específicamente un epítipo que se encuentra en la misma región que el sitio de unión de GDC-0449 de la SMO tipo silvestre. En una realización, el anticuerpo se une a una región en la porción carboxi-terminal de TM6 de la SMO mutante e inhibe la actividad de la SMO mutante.

Pueden cribarse compuestos, como alternativa o adicionalmente, para determinar su capacidad para inhibir la actividad de la SMO mutante. En estas realizaciones, puede evaluarse la capacidad de estos compuestos para inhibir la señalización de hedgehog en células que expresan la SMO mutante. Estos ensayos pueden realizarse en células que tengan una vía de señalización hedgehog intacta, pero que expresen una SMO recombinantes que lleva la mutación en lugar de, o además de, la SMO de tipo silvestre. En estos ensayos se determina la capacidad de la célula para tener la señalización hedgehog activa cuando se incubaba con hedgehog en presencia o ausencia del inhibidor candidato. Si la señalización de hedgehog se inhibe en presencia del compuesto candidato, dicho

compuesto es un inhibidor de hedgehog. En algunas realizaciones las células expresan tanto la SMO de tipo silvestre como la mutante y se incuban con GDC-0449 y un inhibidor candidato. En otras realizaciones, las células expresan solamente SMO mutante y pueden incubarse con Hh y el inhibidor candidato solo (es decir, en ausencia de GDC-0449). El compuesto es un inhibidor de la SMO mutante si la señalización de Hh se reduce o se inhibe en dichas células.

E. Métodos terapéuticos que usan compuestos que se unen a SMO mutante

La invención proporciona métodos de tratamiento de un paciente que tenga un tumor dependiente de la señalización de Hedgehog que sea resistente a compuestos quimioterápicos tales como GDC-0449, con un compuesto que se une a una SMO mutante.

1. Métodos terapéuticos

Un anticuerpo de la invención puede usarse en, por ejemplo, en métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar el cáncer, inhibir la proliferación celular no deseada, inhibir la metástasis del cáncer e inducir la apoptosis de las células tumorales *in vivo* o *in vitro*, comprendiendo el método exponer una célula a un anticuerpo de la invención en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo a la SMO mutante. En ciertas realizaciones, la célula es una célula de leucemia mieloide, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer gástrico, una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de células renales y una célula de glioblastoma. En una realización, un anticuerpo de la invención puede usarse para inhibir una actividad de la SMO mutante, comprendiendo el método exponer la SMO mutante a un anticuerpo de la invención de manera que la actividad de la SMO mutante se inhiba.

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer que comprenden administrar a un individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención. En ciertas realizaciones, un método para tratar el cáncer que comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional, tal como los que se proporcionan a continuación.

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse solos o en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede coadministrarse con al menos un agente terapéutico y/o adyuvante adicionales. En ciertas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-VEGF.

Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente abarcan la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración por separado, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede producirse antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico y/o adyuvante adicionales. Los anticuerpos de la invención también pueden usarse en combinación con radioterapia.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede usarse en un método de unión de la SMO mutante en un individuo que padece un trastorno asociado al aumento de la expresión y/o la actividad de la SMO mutante, comprendiendo el método administrar al individuo el anticuerpo de manera que la SMO mutante en el individuo quede unida. En una realización, la SMO mutante es una SMO mutante humana y el individuo es humano.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico o adyuvante adicionales) puede administrarse por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración por vía parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, por vía intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra de forma adecuada mediante infusión pulsada, particularmente con dosis decrecientes de anticuerpo. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

La ubicación de la diana de unión de un anticuerpo de la invención puede tomarse en consideración en la preparación y la administración del anticuerpo. Cuando la diana de unión es una molécula intracelular, ciertas realizaciones de la invención prevén que el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo se introduzcan en la célula donde se encuentra la diana de unión. En una realización, un anticuerpo de la invención puede expresarse intracelularmente como un intracuerpo. El término "intracuerpo" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo que se expresa intracelularmente y que es capaz de unirse selectivamente a una molécula diana, como se describe, por ejemplo, en Marasco, *Gene Therapy* 4: 11-15 (1997); Kontemann, *Methods* 34: 163-170 (2004); las patentes de los EE.UU. N.º 6.004.940 y 6.329.173.; la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 2003/0104402 y la publicación PCT N.º WO2003/077945. Véase también, por ejemplo, el documento WO96/07321 publicado el 14 de marzo 1996, relativo a la utilización de la terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

La expresión intracelular de un intracuerpo puede efectuarse mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica el anticuerpo deseado o la parte de unión a antígeno del mismo (que carece de la secuencia líder de tipo silvestre y de señales secretoras normalmente asociados al gen que codifica ese anticuerpo o fragmento de unión al antígeno) en una célula diana. Uno o más ácidos nucleicos que codifican todo o una porción de un anticuerpo de la invención pueden entregarse a una célula diana, de manera que se expresen uno o más intracuerpos que son capaces de unirse a un polipéptido diana intracelular y modular la actividad del polipéptido diana. Puede usarse cualquier método convencional de introducción de ácidos nucleicos en una célula, incluyendo, pero no limitado a, microinyección, inyección balística, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, liposomas y transfección con vectores retrovirales, adenovirales, virales adeno-asociados y de vacuna que llevan el ácido nucleico de interés.

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) puede introducirse en células de un paciente mediante métodos *in vivo* y *ex vivo*. En un ejemplo de entrega *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, por ejemplo, en el sitio donde se requiere la intervención terapéutica. En un ejemplo adicional de entrega *in vivo*, el ácido nucleico se introduce en una célula usando la transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus del Herpes simple I o virus adeno-asociados) y sistemas basados en lípidos (son lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen: DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). Para una revisión de ciertos protocolos de marcado de genes y terapia génica, véase Anderson *et al.*, *Science* 256: 808-813 (1992) y el documento WO 93/25673 y las referencias citadas en el mismo. En un ejemplo de tratamiento *ex vivo*, se extraen células de un paciente, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas se administran al paciente directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 4.892.538 y 5.283.187). Un vector utilizado habitualmente para la entrega *ex vivo* de un ácido nucleico es un vector retroviral.

En otra realización, se proporcionan anticuerpos de internalización. Los anticuerpos pueden poseer ciertas características que potencian la entrega de anticuerpos a las células o que pueden modificarse para poseer estas características. Las técnicas para conseguir esto son conocidas en la técnica. Por ejemplo, se sabe que la cationización de un anticuerpo facilita su absorción en las células (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.703.019). También pueden usarse lipofecciones o liposomas para entregar el anticuerpo a las células. Cuando se usan fragmentos de anticuerpo, el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente a la proteína diana puede ser ventajoso. Por ejemplo, basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas de péptidos que retengan la capacidad de unirse a la secuencia proteína diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893 (1993).

La entrada de los anticuerpos en las células diana puede potenciarse mediante otros métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, ciertas secuencias, tales como las derivadas del Tat del VIH o la proteína de homodominio Antennapedia son capaces de dirigir la captación eficiente de proteínas heterólogas a través de las membranas celulares. Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999), 96: 4325-4329.

Cuando la diana de unión de un anticuerpo se encuentra en el cerebro, ciertas realizaciones de la invención previenen que el anticuerpo atraviese la barrera hematoencefálica. Existen varios enfoques conocidos en la técnica para el transporte de moléculas a través de la barrera hematoencefálica, incluyendo, pero no limitados a, métodos físicos, métodos basados en lípidos, métodos basados en células madre y métodos basados en receptores y canales.

Los métodos físicos de transporte de un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, eludir la barrera hematoencefálica en su totalidad o mediante la creación de aberturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos de elusión incluyen, pero no se limitan a, la inyección directa en el cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou *et al.*, *Gene Therapy* 9: 398-406 (2002)), la infusión intersticial/administración potenciada por convección (véase, por ejemplo, Bobo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2076-2080 (1994)) y la implantación de un dispositivo de administración en el cerebro (véase, por ejemplo, Gill *et al.*, *Nature Med.* 9: 589-595 (2003); y obleas Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos de creación de aberturas en la barrera incluyen, pero no se limitan a, los ultrasonidos (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de los EE.UU. N.º 2002/0038086), la presión osmótica (por ejemplo, mediante la administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, Vols 1 y 2, Plenum Press, N.Y. (1989)), la permeabilización mediante, por ejemplo, bradiquinina o permeabilizador A-7 (véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206 y 5.686.416) y la transfección de las neuronas que se sitúan en la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación de Patente de los EE.UU. N.º 2003/0083299).

Los métodos de transporte de un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica basados en lípidos incluyen, pero no se limitan a, la encapsulación del anticuerpo en liposomas que se acoplan a fragmentos de unión a anticuerpo que se unen a receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. N.º 20020025313) y el recubrimiento del anticuerpo en partículas de lipoproteínas de baja densidad (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. N.º 20040204354) o apolipoproteína E (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. N.º 20040131692).

Los métodos de transporte de un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica basados en células madre implican células progenitoras neurales (CPN) modificadas mediante ingeniería genética para expresar el anticuerpo de interés y después implantar las células madre en el cerebro del individuo que se trata. Véase Behrstock *et al.* (2005) *Gene Ther.* 15 de diciembre 2005 publicación en línea avanzada (que notifica que las CPN modificadas mediante ingeniería genética para expresar el factor neurotrófico GDNF redujeron los síntomas de la enfermedad de Parkinson cuando se implantaron en el cerebro de modelos de roedores y primates).

Los métodos de transporte de un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica basados en receptores y canales incluyen, pero no se limitan a, el uso de bloqueantes de glucocorticoides para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de los EE.UU. N.º 2002/0065259, 2003/0162695 y 2005/0124533); la activación de los canales de potasio (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. N.º 2005/0089473), la inhibición de transportadores de fármacos ABC (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. N.º 2003/0073713); el recubrimiento de anticuerpos con una transferrina y la modulación de la actividad de uno o más de los receptores de transferrina (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. N.º 2003/0129186) y la cationización de los anticuerpos (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.004.697).

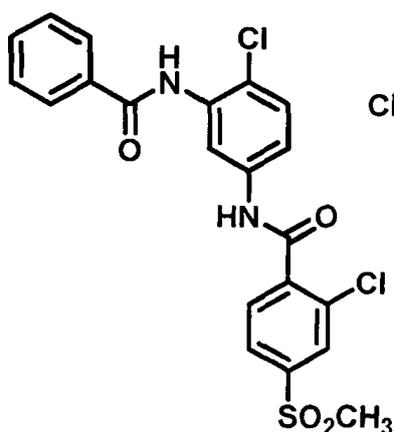
Los anticuerpos de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de forma coherente con la buena práctica médica. Los factores que hay que considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de entrega del agente, el método de administración, la pauta de la administración y otros factores conocidos por los médicos. Aunque no es necesario, el anticuerpo está opcionalmente formulado con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan generalmente en las mismas dosis y con vías de administración descritas en el presente documento, o aproximadamente del 1 al 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que son apropiadas.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo y el criterio del médico. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria habitual podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento generalmente se mantendría hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis de ejemplo del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, puede administrarse una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) al paciente. Dichas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de manera que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o, por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis bajas. Un régimen de dosificación de ejemplo comprende la administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

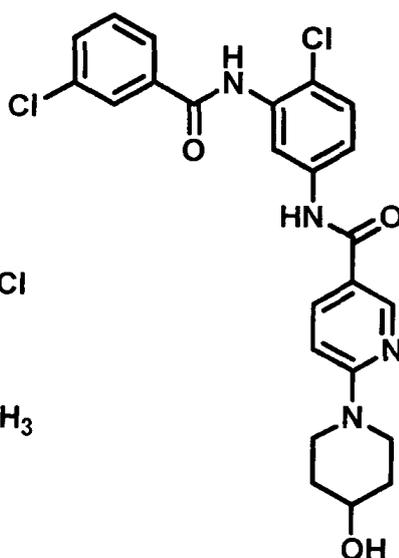
Se entiende que cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores puede realizarse usando un inmunocombinado de la divulgación en lugar de, o además de, un anticuerpo anti-SMO mutante.

V. Compuestos para el tratamiento de tumores resistentes a GDC-0449

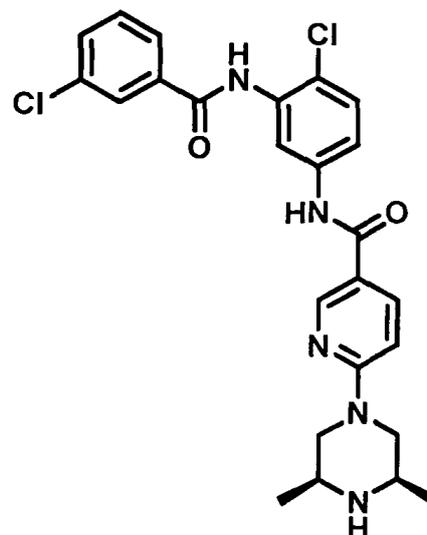
Entre los compuestos de moléculas pequeñas que pueden usarse para tratar tumores resistentes a GDC-0449 debido a una mutación en Smoothed en la posición de aminoácido 518 están los siguientes:



Fórmula I



Fórmula II



Fórmula III

La molécula pequeña se proporciona en una cantidad eficaz para inhibir actividad de la SMO mutante sin provocar efectos adversos en el sujeto al que se administra el compuesto. El compuesto puede administrarse por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración por vía parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, por vía intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

Los compuestos de la invención también pueden administrarse con un inhibidor de PI3K. La administración del inhibidor de PI3K previene o retrasa la mutagénesis adicional de la proteína SMO y la resistencia adquirida a los inhibidores de Smo. Los inhibidores de PI3K adecuados incluyen cualquiera de los conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, los descritos en Maira S.M. *et al.* (2009) "PI3K Inhibitors for Cancer Treatment: Where Do We Stand?" *Biochem. Soc. Trans.* 37: 265-272.

Ejemplos

Introducción

Recientemente se ha demostrado que el tratamiento de un paciente que padece meduloblastoma que alberga una enfermedad metastásica generalizada con el inhibidor de la vía Hh, GDC-0449, dio como resultado una respuesta espectacular y rápida al tratamiento (Charles M. Rudin *et al.* (2009) *N. Engl J Med* 361:1173-1178). GDC-0449 se dirige al receptor similar al acoplado a proteína G, Smoothened (SMO), que se activa después de la pérdida de PTCH1 (Charles M. Rudin *et al.* (2009) *N. Engl J Med* 361:1173-1178; Molckovsky, A. y L.L. Siu (2008) *J. Hematol. Oncol.* 1:20).

El perfil molecular del tumor primario y metastásico de este paciente que padece meduloblastoma tomado antes del tratamiento con GDC-0449 reveló una mutación somática subyacente en PTCH1 (PTCH1-W844C), así como la expresión regulada positivamente de los genes de la diana de la vía de Hh, lo que apoyan la hipótesis de que el tumor fue impulsado por la señalización de Hh desregulada (C.M. Rudin *et al.* (2009) *N. Engl J. Med* 361:1173-1178). La mutación PTCH1-W844C no era capaz de suprimir la actividad de la SMO en una estirpe celular de indicador GLI-luciferasa sensible a Hh (fibroblastos C3H10T^{1/2}) cuando se cotransfectaba conjuntamente con la SMO de tipo silvestre (TS), lo que indica que esta mutación específica puede inhibir la capacidad de PTCH1 para reprimir la SMO, conduciendo por tanto a la activación aberrante, ligando-independiente de la vía de Hh. A pesar de la notable reducción del tumor inicialmente observada en este paciente, las exploraciones por PET tomadas ~ 3 meses tras el inicio del tratamiento indicaron la progresión de la enfermedad. Se obtuvo un aspirado con aguja fina de la lesión que progresaba para la confirmación de la reaparición de la enfermedad y para los perfiles moleculares posteriores para explorar los mecanismos de resistencia adquirida a la GDC-0449. La secuenciación de PTCH1 confirmó la presencia de la mutación PTCH1-W844C homocigótica detectada previamente, acompañada de la pérdida de la heterocigosidad.

Para caracterizar el mecanismo de la recaída, en la presente solicitud, se evaluó el estado de los componentes conocidos de la vía de Hh, incluyendo la SMO, la diana directa de GDC-0449.

Materiales y Métodos

Reactivos y construcciones. Se adquirió KAAD-ciclopamina de Toronto Research Chemicals Inc. (número del cat. K171000). Se preparó GDC-0449 en Genentech (A. Molckovsky y L.L. Siu (2008) *J. Hematol. Oncol.* 1:20). Todos los inhibidores de Hh se almacenaron como soluciones madre 30 mM en DMSO al 100 % (Sigma) a -20 °C. Se clonaron SMO humana, PTCH1 humana (variante de transcripción 1b, GenBank NM_000264.3) y eGFP en pRK5 (BD Biosciences) y se expresaron a partir del promotor de CMV. Se introdujeron mutaciones puntuales con el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange II de Stratagene (número del cat. 200524) y se introdujo un marcador FLAG en los extremos carboxi de la SMO humana de tipo silvestre y mutante mediante PCR usando ADN polimerasa de alta fidelidad Platinum Taq de Invitrogen (número del catálogo 11304-011) (Murone *et al.* (1999) *Curr Biol.* 9:76-84). El indicador de luciferasa de Hh Gli-BS descrito previamente y el plásmido de control de transfección de Renilla (pRL-TK) son de Promega (número del catálogo E2241). Todas las construcciones se confirmaron mediante secuenciación.

Mutagénesis de rastreo con alanina. Se generaron mutantes de SMO a partir pRK5-SMO como se ha descrito anteriormente. Las alaninas se mutaron a leucina (CTG), mientras que todos los demás restos mutaron a alanina (GCA).

Ensayos de indicador Gli-luciferasa. Se realizaron ensayos de indicador Gli-luciferasa como se ha descrito (Rudin, C.M. *et al.* (2009) *N. Engl J. Med* 361:1173-1178) con las siguientes modificaciones; se sembraron células C3H10T1/2 (ATCC, CCL-226) en placas de seis pocillos a $1,85 \times 10^5$ células/pocillo y los valores mostrados son la media de cuatro experimentos separados ± 1 desviación estándar (DE).

Ensayos de unión a [³H]-GDC-0449. Se transfectaron células HEK-293 con construcciones de expresión de SMO, se recogieron, se lavaron y se fijaron como se ha descrito anteriormente. Las células se resuspendieron en PBS, se sembraron en placas de 96 pocillos (2×10^6 células/pocillo) y se incubaron durante 1 h a 37 °C con [³H]-GDC-0449 5 nM (0,05 μ Ci/pocillo; Tritec, Teufen, Suiza) en presencia o ausencia de GDC-0449 5 μ M sin marcar. Las células se transfirieron a placas de filtro (Perkin Elmer número 6005174) usando un recolector de células (Wallac) y se lavaron 5 veces con agua. Las placas se secaron y la radiactividad unida se midió usando un contador de centelleo Topcount y el cóctel de centelleo Microscint-20 (ambos de Perkin Elmer). Los datos se presentaron como conteos en bruto o se normalizaron a SMO-WT después de restar los valores de fondo (obtenidos a partir de células no transfectadas).

Análisis por FACS de mutantes de SMO. Se realizó un análisis por FACS para determinar la expresión en la superficie celular de los mutantes de SMO como se ha descrito anteriormente. El porcentaje de células positivas a SMO se normalizó a los controles SMO-TS.

Ejemplo 1

E518 es importante para la inhibición de SMO por GDC-0449. Los inventores han informado anteriormente de dos mutaciones de un resto de ácido aspártico conservado en SMO que interfieren con la unión de GDC-0449 y su capacidad para suprimir el crecimiento tumoral, sin alterar drásticamente la actividad de señalización de esta proteína (Yauch R.L. *et al.* (2009), *Science* 326:572-574). Se usó un enfoque de mutagénesis de rastreo con alanina para identificar restos adicionales en SMO críticos para la unión GDC-0449 (**Fig. 1A**). Suponiendo que GDC-0449 se une a SMO en una forma que recuerda a la unión de los GPCR a sus ligandos, se mutaron regiones que sabe que son importantes para dichas interacciones (Rosenbaum D.M. *et al.* (2009) *Nature* 459:356-363). Éstas incluyen hélices transmembrana (TM) 3, TM5, TM6 y TM7, así como aminoácidos adyacentes en los bucles extracelulares. También se incluyó todo el tercer bucle extracelular de SMO en la exploración, ya que contiene D473 en su inicio. Se analizaron un total de 102 mutantes de SMO, usando la pérdida de unión a fármaco como una lectura primaria (datos no mostrados). La mayor parte de los 21 nuevos mutantes de SMO que se encontró que eran deficientes en la unión a GDC-0449 estaban inactivos y/o no se expresaban en la superficie celular. SMO-E518A mostró una actividad de señalización significativa a pesar de la presencia de GDC-0449 $1^{\circ}\mu$ M y demostró ser parcialmente resistente a GDC-0449 (**Fig 1B**; datos no presentados). Después, se introdujo una sustitución de aminoácidos más drástica que invierte la carga en esta posición y que puede lograrse a través de un cambio de un único nucleótido. Este mutante SMO-E518K tiene una actividad comparable a la SMO-TS, sin embargo, es completamente resistente a GDC-0449 hasta $1^{\circ}\mu$ M (datos no mostrados; **Fig. 1B**). Por tanto, se ha identificado el E518 como un sitio de mutación novedoso prospectivo en SMO que puede conferir resistencia a GDC-0449.

Ejemplo 2

Un cribado de IPH químicamente diversos identificó varios antagonistas de SMOE518K. Para identificar inhibidores de mutantes de SMO como agentes terapéuticos potenciales para tumores resistentes a GDC 0449, se cribó un panel de 53 antagonistas (se muestran compuestos representativos en la **Fig. 2A**), con una potente actividad frente a la proteína de tipo silvestre (**Fig. 2B**). Estos compuestos se identificaron, ya sea en cribados de alto rendimiento (tanto internas como por otros) o se generaron mediante optimización de detección de candidatos terapéuticos de candidatos de cribado usando métodos tradicionales de la química médica. Se cotransfectaron

células C3H10T1/2 con vectores de expresión de SMO de tipo silvestre o mutante junto con una construcción de indicador *Gli-luciferasa* (Murone M. *et al.* (1999) *Curr Biol* 9 (2):76-84) y la activación de la vía se midió en presencia o ausencia de compuesto 1^o μM. Curiosamente, el HhAntag de bencimidazol (Romer J.T. *et al.* (2004) *Cancer Cell*. 6: 229-240) era esencialmente equipotente contra todos los alelos de SMO a pesar de las varias similitudes estructurales con GDC-0449, lo que indica diferencias sutiles en la relación estructura-actividad (SAR) entre estos dos compuestos. Diversos derivados de amida de anillo C de GDC-0449 mostraron una potencia débil contra SMOD473H, como se ejemplifica en el compuesto 1 (véase la **Fig. 2A** para la nomenclatura del anillo A, B y C). Por el contrario, muchos derivados de amida de anillo C de HhAntag conservaron la potencia (datos no mostrados), lo que demuestra que el anillo A de bencimidazol que se encuentra en HhAntag es superior al anillo A de 2-piridilo que se encuentra en GDC-0449 en la inhibición de este mutante de SMO. En cuanto a otras sustituciones del anillo A, se encontró que las quinazolininas (representadas por el compuesto 2) eran inactivas, mientras que el compuesto de bis-amida 3 mostró actividad medible a pesar de tener un anillo C idéntico al de GDC-0449. Esta clase general de bis-amidas mostró potencias mejoradas contra SMO-D473H una vez que se descubrió el patrón de sustitución óptimo, ejemplificado por los compuestos 4 y 5. Aunque el anillo C contribuye claramente a la inhibición de SMO-D473H, las observaciones de la SAR implican que las sustituciones del anillo A pueden mejorar la potencia más drásticamente. Específicamente, un anillo A con un donador y un aceptor de enlaces de hidrógeno, como se encuentra en el HhAntag de bencimidazol y los compuestos de bis-amida 3-5, se prefiere cuando se une a SMO-D473H en relación con un aceptor de enlace de hidrógeno solo. A la inversa, la inhibición eficaz de SMO-E518K puede conseguirse mediante la sustitución del anillo C de GDC-0449, ya que el compuesto 1 muestra una potencia sólida frente a este mutante. Además, SMO-E518K es completamente resistente al alcaloide natural de planta ciclopamina pero sensible a la hirazinoimine SANT-1 (Chen J.K. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 14071-14076), mientras que SMO-D473H es parcialmente resistente a ambos compuestos, lo que corrobora el hallazgo de que existen diferentes requisitos para la inhibición de estos dos mutantes resistentes a GDC-0449. A pesar de que habitualmente se usa HhAntag como un compuesto herramienta para bloquear la señalización de Hh en ratones, este inhibidor es metabolizado rápidamente por los hepatocitos humanos y por tanto no es adecuado como agente terapéutico (SEG, observación no publicada). Como el objetivo era identificar un antagonista de SMO que pudiera ser capaz de superar la resistencia adquirida a GDC-0449 en la clínica, los esfuerzos se centraron en la clase bis-amida de inhibidores. Solo tres de los catorce candidatos farmacológicos de este grupo mostraron buenas propiedades farmacocinéticas en ratones (datos no mostrados).

Los ejemplos anteriores son solo para fines ilustrativos y no deben interpretarse que limitan el alcance de la invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas.

Listado de Secuencias

<110> GENENTECH, INC. *et al.*

<120> SMOOTHENED MUTANTE Y MÉTODOS DE USO DE LA MISMA

<130> P4512R1-WO

<141> 05-10-2011

<150> US 61/389.995

<151> 05-10-2011

<160> 3

<210> 1

<211> 787

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 588 981 T3

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

Glu His Gln Asp Met His Ser Tyr Ile Ala Ala Phe Gly Ala Val
 230 235 240
 Thr Gly Leu Cys Thr Leu Phe Thr Leu Ala Thr Phe Val Ala Asp
 245 250 255
 Trp Arg Asn Ser Asn Arg Tyr Pro Ala Val Ile Leu Phe Tyr Val
 260 265 270
 Asn Ala Cys Phe Phe Val Gly Ser Ile Gly Trp Leu Ala Gln Phe
 275 280 285
 Met Asp Gly Ala Arg Arg Glu Ile Val Cys Arg Ala Asp Gly Thr
 290 295 300
 Met Arg Leu Gly Glu Pro Thr Ser Asn Glu Thr Leu Ser Cys Val
 305 310 315
 Ile Ile Phe Val Ile Val Tyr Tyr Ala Leu Met Ala Gly Val Val
 320 325 330
 Trp Phe Val Val Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala
 335 340 345
 Leu Gly Thr Thr Tyr Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr Phe
 350 355 360
 His Leu Leu Thr Trp Ser Leu Pro Phe Val Leu Thr Val Ala Ile
 365 370 375
 Leu Ala Val Ala Gln Val Asp Gly Asp Ser Val Ser Gly Ile Cys
 380 385 390
 Phe Val Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr Arg Ala Gly Phe Val Leu
 395 400 405
 Ala Pro Ile Gly Leu Val Leu Ile Val Gly Gly Tyr Phe Leu Ile
 410 415 420
 Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly
 425 430 435
 Leu Leu Ser Glu Lys Ala Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu
 440 445 450
 Arg Leu Gly Ile Phe Gly Phe Leu Ala Phe Gly Phe Val Leu Ile
 455 460 465
 Thr Phe Ser Cys His Phe Tyr Asp Phe Phe Asn Gln Ala Glu Trp
 470 475 480
 Glu Arg Ser Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Gln Ala Asn Val Thr
 485 490 495
 Ile Gly Leu Pro Thr Lys Gln Pro Ile Pro Asp Cys Glu Ile Lys
 500 505 510
 Asn Arg Pro Ser Leu Leu Val Glu Lys Ile Asn Leu Phe Ala Met
 515 520 525
 Phe Gly Thr Gly Ile Ala Met Ser Thr Trp Val Trp Thr Lys Ala
 530 535 540
 Thr Leu Leu Ile Trp Arg Arg Thr Trp Cys Arg Leu Thr Gly Gln

				545						550				555
Ser	Asp	Asp	Glu	Pro	Lys	Arg	Ile	Lys	Lys	Ser	Lys	Met	Ile	Ala
				560										570
Lys	Ala	Phe	Ser	Lys	Arg	His	Glu	Leu	Leu	Gln	Asn	Pro	Gly	Gln
				575										585
Glu	Leu	Ser	Phe	Ser	Met	His	Thr	Val	Ser	His	Asp	Gly	Pro	Val
				590										600
Ala	Gly	Leu	Ala	Phe	Asp	Leu	Asn	Glu	Pro	Ser	Ala	Asp	Val	Ser
				605										615
Ser	Ala	Trp	Ala	Gln	His	Val	Thr	Lys	Met	Val	Ala	Arg	Arg	Gly
				620										630
Ala	Ile	Leu	Pro	Gln	Asp	Ile	Ser	Val	Thr	Pro	Val	Ala	Thr	Pro
				635										645
Val	Pro	Pro	Glu	Glu	Gln	Ala	Asn	Leu	Trp	Leu	Val	Glu	Ala	Glu
				650										660
Ile	Ser	Pro	Glu	Leu	Gln	Lys	Arg	Leu	Gly	Arg	Lys	Lys	Lys	Arg
				665										675
Arg	Lys	Arg	Lys	Lys	Glu	Val	Cys	Pro	Leu	Ala	Pro	Pro	Pro	Glu
				680										690
Leu	His	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Thr	Ile	Pro	Arg	Leu	Pro
				695										705
Gln	Leu	Pro	Arg	Gln	Lys	Cys	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Ala	Trp	Gly
				710										720
Ala	Gly	Asp	Ser	Cys	Arg	Gln	Gly	Ala	Trp	Thr	Leu	Val	Ser	Asn
				725										735
Pro	Phe	Cys	Pro	Glu	Pro	Ser	Pro	Pro	Gln	Asp	Pro	Phe	Leu	Pro
				740										750
Ser	Ala	Pro	Ala	Pro	Val	Ala	Trp	Ala	His	Gly	Arg	Arg	Gln	Gly
				755										765
Leu	Gly	Pro	Ile	His	Ser	Arg	Thr	Asn	Leu	Met	Asp	Thr	Glu	Leu
				770										780
Met	Asp	Ala	Asp	Ser	Asp	Phe								
				785										

<210> 2
 <211> 787
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> Xaa
 10 <222> 518
 <223> Xaa se cualquier aminoácido de origen natural

<400> 2

ES 2 588 981 T3

Met Ala Ala Ala Arg Pro Ala Arg Gly Pro Glu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15
Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala

ES 2 588 981 T3

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

Leu Gly Thr Thr Tyr Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr Phe
 350 355 360
 His Leu Leu Thr Trp Ser Leu Pro Phe Val Leu Thr Val Ala Ile
 365 370 375
 Leu Ala Val Ala Gln Val Asp Gly Asp Ser Val Ser Gly Ile Cys
 380 385 390
 Phe Val Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr Arg Ala Gly Phe Val Leu
 395 400 405
 Ala Pro Ile Gly Leu Val Leu Ile Val Gly Gly Tyr Phe Leu Ile
 410 415 420
 Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly
 425 430 435
 Leu Leu Ser Glu Lys Ala Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu
 440 445 450
 Arg Leu Gly Ile Phe Gly Phe Leu Ala Phe Gly Phe Val Leu Ile
 455 460 465
 Thr Phe Ser Cys His Phe Tyr Asp Phe Phe Asn Gln Ala Glu Trp
 470 475 480
 Glu Arg Ser Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Gln Ala Asn Val Thr
 485 490 495
 Ile Gly Leu Pro Thr Lys Gln Pro Ile Pro Asp Cys Glu Ile Lys
 500 505 510
 Asn Arg Pro Ser Leu Leu Val Xaa Lys Ile Asn Leu Phe Ala Met
 515 520 525
 Phe Gly Thr Gly Ile Ala Met Ser Thr Trp Val Trp Thr Lys Ala
 530 535 540
 Thr Leu Leu Ile Trp Arg Arg Thr Trp Cys Arg Leu Thr Gly Gln
 545 550 555
 Ser Asp Asp Glu Pro Lys Arg Ile Lys Lys Ser Lys Met Ile Ala
 560 565 570
 Lys Ala Phe Ser Lys Arg His Glu Leu Leu Gln Asn Pro Gly Gln
 575 580 585
 Glu Leu Ser Phe Ser Met His Thr Val Ser His Asp Gly Pro Val
 590 595 600
 Ala Gly Leu Ala Phe Asp Leu Asn Glu Pro Ser Ala Asp Val Ser
 605 610 615
 Ser Ala Trp Ala Gln His Val Thr Lys Met Val Ala Arg Arg Gly
 620 625 630
 Ala Ile Leu Pro Gln Asp Ile Ser Val Thr Pro Val Ala Thr Pro
 635 640 645
 Val Pro Pro Glu Glu Gln Ala Asn Leu Trp Leu Val Glu Ala Glu
 650 655 660
 Ile Ser Pro Glu Leu Gln Lys Arg Leu Gly Arg Lys Lys Lys Arg
 665 670 675

ES 2 588 981 T3

Arg	Lys	Arg	Lys	Lys	Glu	Val	Cys	Pro	Leu	Ala	Pro	Pro	Pro	Glu
				680					685					690
Leu	His	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Thr	Ile	Pro	Arg	Leu	Pro
				695					700					705
Gln	Leu	Pro	Arg	Gln	Lys	Cys	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Ala	Trp	Gly
				710					715					720
Ala	Gly	Asp	Ser	Cys	Arg	Gln	Gly	Ala	Trp	Thr	Leu	Val	Ser	Asn
				725					730					735
Pro	Phe	Cys	Pro	Glu	Pro	Ser	Pro	Pro	Gln	Asp	Pro	Phe	Leu	Pro
				740					745					750
Ser	Ala	Pro	Ala	Pro	Val	Ala	Trp	Ala	His	Gly	Arg	Arg	Gln	Gly
				755					760					765
Leu	Gly	Pro	Ile	His	Ser	Arg	Thr	Asn	Leu	Met	Asp	Thr	Glu	Leu
				770					775					780
Met	Asp	Ala	Asp	Ser	Asp	Phe								
				785										

<210> 3
 <211> 2364
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

5

ES 2 588 981 T3

atggccgctg cccgccagc gcgggggccc gagctcccgc tccctggggt 50
gctgctgctg ctgctgctgg gggaccocgg cgggggggcg gcctcgagcg 100
ggaacgcgac cgggcctggg cctcggagcg cgggcgggag cgcgaggagg 150
agcgcggcgg tgactggccc tccgccgccg ctgagccact gcggccgggc 200
tgccccctgc gagccgctgc gctacaacgt gtgcctgggc tcggtgctgc 250
cctacggggc cacctccaca ctgctggccg gagactcgga ctcccaggag 300
gaagcgcacg gcaagctcgt gctctggtcg ggcctccgga atgccccccg 350
ctgctgggca gtgatccagc ccctgctgtg tgccgtatac atgcccagt 400
gtgagaatga cggggtggag ctgccagcc gtaccctctg ccaggccacc 450
cgaggcccct gtgccatcgt ggagagggag cggggctggc ctgacttcc 500
gcgctgcact cctgaccgct tccctgaagg ctgcacgaat gaggtgcaga 550
acatcaagtt caacagttca ggccagtgcg aagtgccctt ggttcggaca 600
gacaaccca agagctggta cgaggacgtg gagggctgcg gcatccagtg 650
ccagaaccg ctcttcacag aggctgagca ccaggacatg cacagctaca 700
tcgcggcctt cggggccgtc acgggcctct gcacgctctt caccctggcc 750
acattcgtgg ctgactggcg gaactcgaat cgctaccctg ctgttattct 800
cttctacgtc aatgcgtgct tctttgtggg cagcattggc tggctggccc 850

ES 2 588 981 T3

agttcatgga tgggtgccccg cgagagatcg tctgcccgtgc agatggcacc 900
 atgaggcttg gggagcccac ctccaatgag actctgtcct gcgtcatcat 950
 ctttgtcatc gtgtactacg ccctgatggc tgggtgtggtt tggtttgtgg 1000
 tcctcaccta tgccctggcac acttccttca aagccctggg caccacctac 1050
 cagcctctct cgggcaagac ctccacttc cacctgctca cctggtcact 1100
 cccctttgtc ctcaactgtgg caatccttgc tgtggcgag gtggatgggg 1150
 actctgtgag tggcatttgt tttgtgggct acaagaacta ccgataccgt 1200
 gcgggcttcg tgetggcccc aatcggcctg gtgctcatcg tgggaggcta 1250
 ctctctcatc cgaggagtca tgaactctgtt ctccatcaag agcaaccacc 1300
 ccgggctgct gagtgagaag gctgccagca agatcaacga gaccatgctg 1350
 cgctgggca tttttggctt cctggccttt ggctttgtgc tcattacctt 1400
 cagctgccac ttctacgact tcttcaacca ggctgagtgg gagcgcagct 1450
 tccgggacta tgtgctatgt caggccaatg tgaccatcgg gctgcccacc 1500
 aagcagccca tccctgactg tgagatcaag aatcgcccga gccttctggt 1550
 ggagaagatc aacctgtttg ccatgtttgg aactggcatc gccatgagca 1600
 cctgggtctg gaccaaggcc acgtgctca tctggaggcg tacctggtgc 1650
 aggttgactg ggcagagtga cgatgagcca aagcggatca agaagagcaa 1700
 gatgattgcc aaggccttct ctaagcggca cgagctcctg cagaaccag 1750
 gccaggagct gtccttcagc atgcacaactg tgtcccacga cgggcccgtg 1800
 gcgggcttgg cctttgacct caatgagccc tcagctgatg tctcctctgc 1850
 ctgggcccag catgtcacca agatggtggc tcggagagga gccatactgc 1900
 cccaggatat ttctgtcacc cctgtggcaa ctccagtgc cccagaggaa 1950
 caagccaacc tgtggtcgtt tgaggcagag atctccccag agctgcagaa 2000
 gcgcctgggc cggaagaaga agaggaggaa gaggaagaag gaggtgtgcc 2050
 cgctggcgcc gccccctgag cttcaccccc ctgcccctgc cccagttacc 2100
 attcctcgac tgctcagct gccccggcag aatgcctgg tggctgcagg 2150
 tgccctggga gctggggact cttgccgaca gggagcgtgg accctggtct 2200
 ccaaccatt ctgcccagag cccagtcccc ctccagatcc atttctgcc 2250
 agtgcaccgg cccccgtggc atgggctcat ggcccggac agggcctggg 2300
 gcctattcac tcccgcacca acctgatgga cacagaactc atggatgcag 2350
 actcggactt ctga 2364

REVINDICACIONES

1. Una proteína SMO mutante aislada, que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 95 % a la SEQ ID NO: 2, en donde dicha secuencia de aminoácidos consiste en alanina (A) o lisina (K) en la posición de aminoácido 518 de la SEQ ID NO: 2, en donde dicha mutación confiere al menos una resistencia parcial de la proteína SMO mutada a GDC-0449.
2. La proteína SMO mutante aislada de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde dicha secuencia de aminoácidos consiste en alanina (A) o lisina (K) en la posición de aminoácido 518 de la SEQ ID NO: 2.
3. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína SMO mutante que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 95 % a la SEQ ID NO: 1, en donde dicha secuencia de aminoácidos consiste en alanina (A) o lisina (K) en la posición de aminoácido 518, en donde dicha mutación confiere al menos una resistencia parcial de la proteína SMO mutada a GDC-0449.
4. Una sonda de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína SMO mutada o un fragmento de la misma que incorpora una mutación en el aminoácido 518 de la SEQ ID NO: 2, mutación que consiste en alanina (A) o lisina (K) en la posición de aminoácido 518 de la SEQ ID NO: 2, en donde dicha sonda de ácido nucleico se une de manera diferencial al ácido nucleico que codifica la proteína SMO mutada frente a un ácido nucleico que codifica una proteína SMO de tipo silvestre, en donde dicha mutación confiere al menos una resistencia parcial de la proteína SMO mutada a GDC-0449; y en donde dicha sonda tiene una longitud de 10 a 50 nucleótidos.
5. Un anticuerpo que se une específicamente a la proteína SMO mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el epítipo del anticuerpo está presente en una SMO mutante que tiene un aminoácido distinto de ácido glutámico en la posición 518, en donde el anticuerpo no se une a la SMO de tipo silvestre que tiene un ácido glutámico en la posición 518.
6. El anticuerpo de la reivindicación 5 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monodonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
7. El anticuerpo de la reivindicación 5 en donde dicho anticuerpo está conjugado con un agente citotóxico.
8. El anticuerpo de la reivindicación 5 en donde dicho anticuerpo inhibe la actividad de la SMO.
9. Un método para identificar un tumor en un sujeto humano que es al menos parcialmente resistente al tratamiento con GDC-0449, que comprende determinar la presencia de un gen SMO mutado o una proteína SMO mutada en una muestra de dicho tumor, en donde dicha mutación da como resultado alanina (A) o lisina (K) en la posición de aminoácido 518 de la SEQ ID NO: 2, en donde la presencia de dichos gen SMO mutado o proteína SMO mutada indica que dicho tumor es al menos parcialmente resistente al tratamiento con un GDC-0449, en donde dicho gen SMO mutado codifica dicha proteína SMO mutada.
10. Un método de cribado de compuestos que inhiben la señalización de la proteína SMO mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende:
- poner en contacto dicha SMO mutante con un compuesto de ensayo y detectar la unión de dicho compuesto a dicha SMO mutante por lo que la unión de dicho compuesto de ensayo a la SMO mutante indica que dicho compuesto de ensayo es un inhibidor de la SMO mutante, y/o
 - poner en contacto una célula que expresa dicha SMO mutante con un compuesto de ensayo y detectar la actividad de Gli en dicha célula por lo que la presencia de actividad de Gli indica que dicho compuesto de ensayo no es un inhibidor de la SMO mutante.

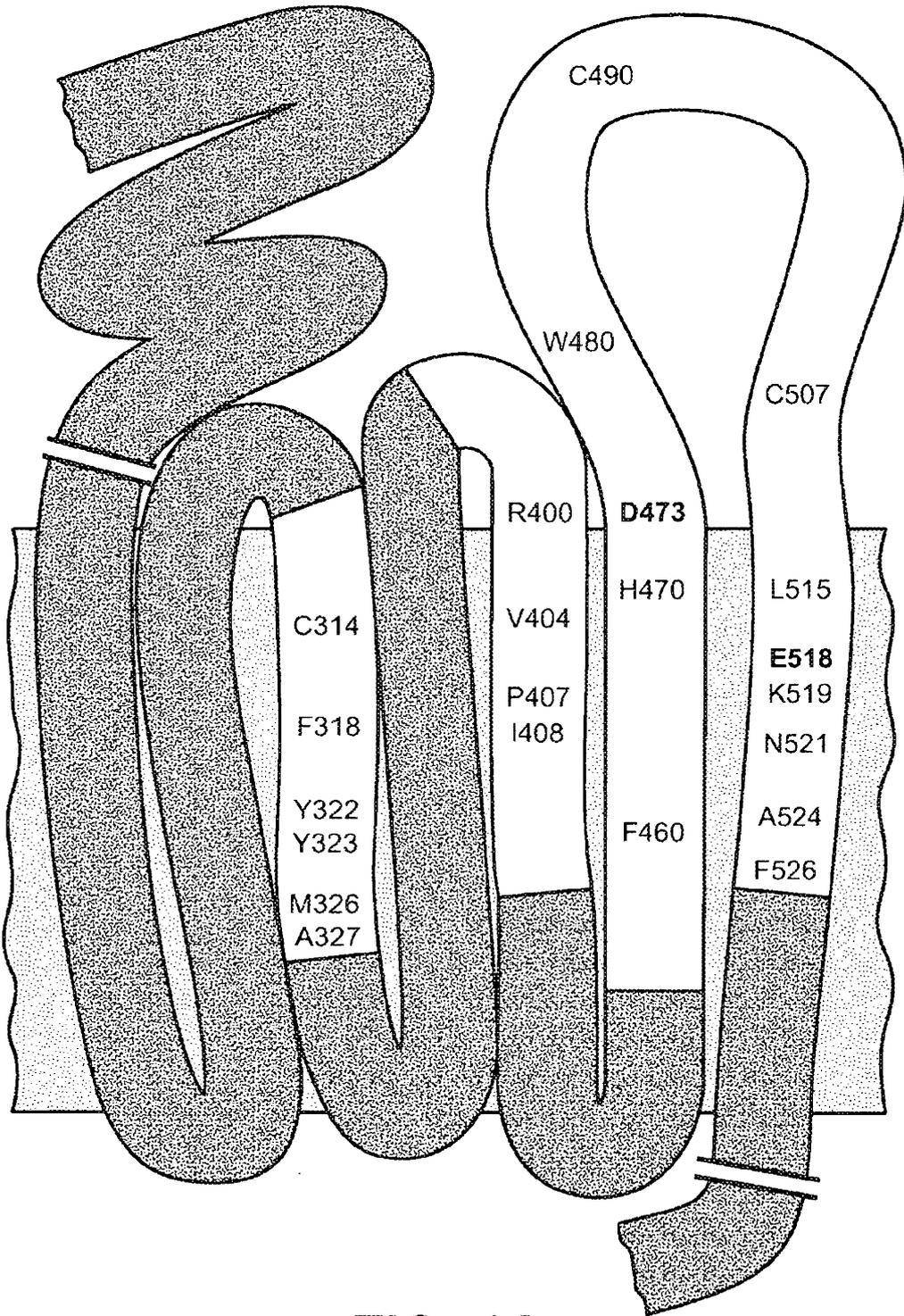


FIG. 1A

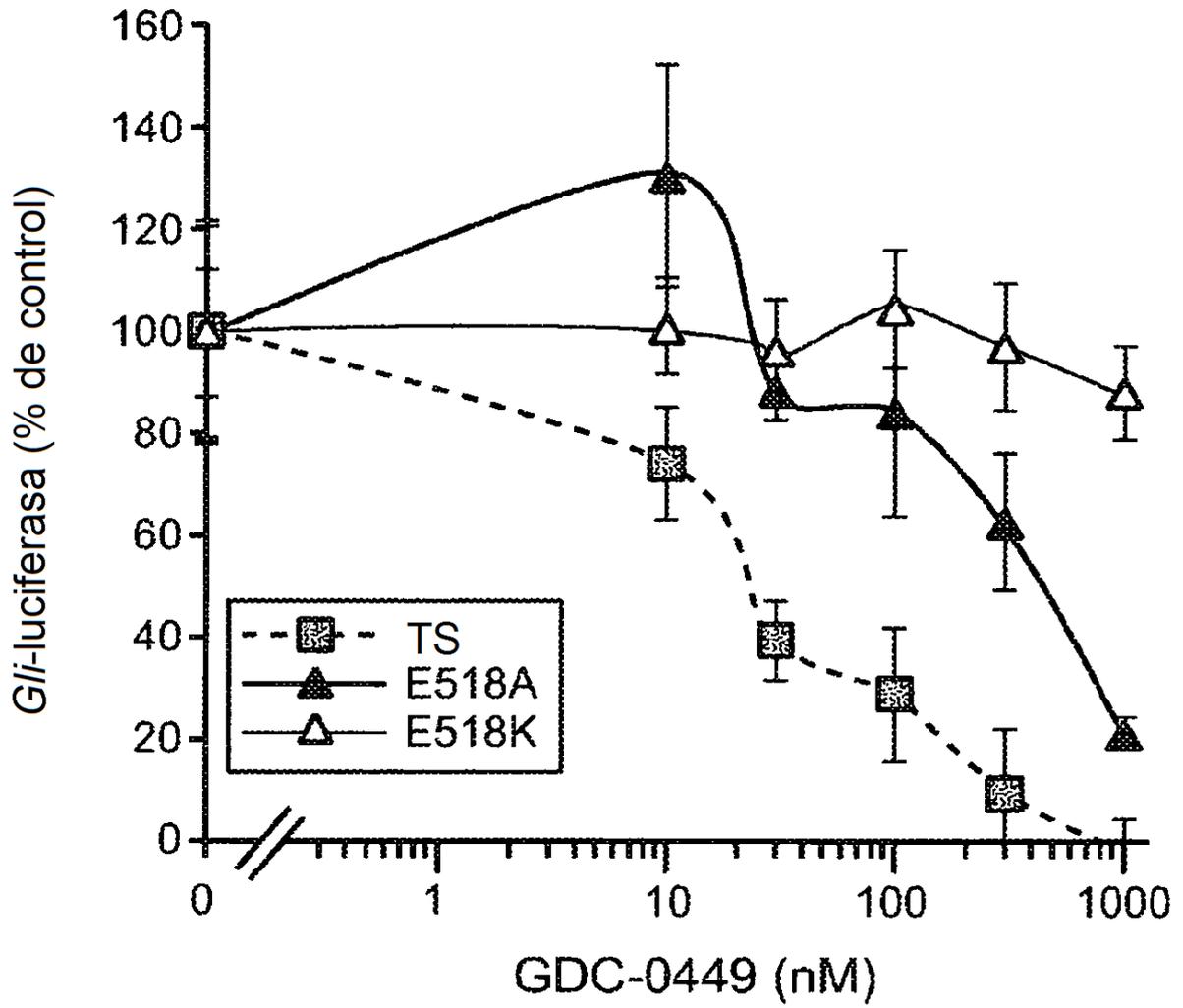
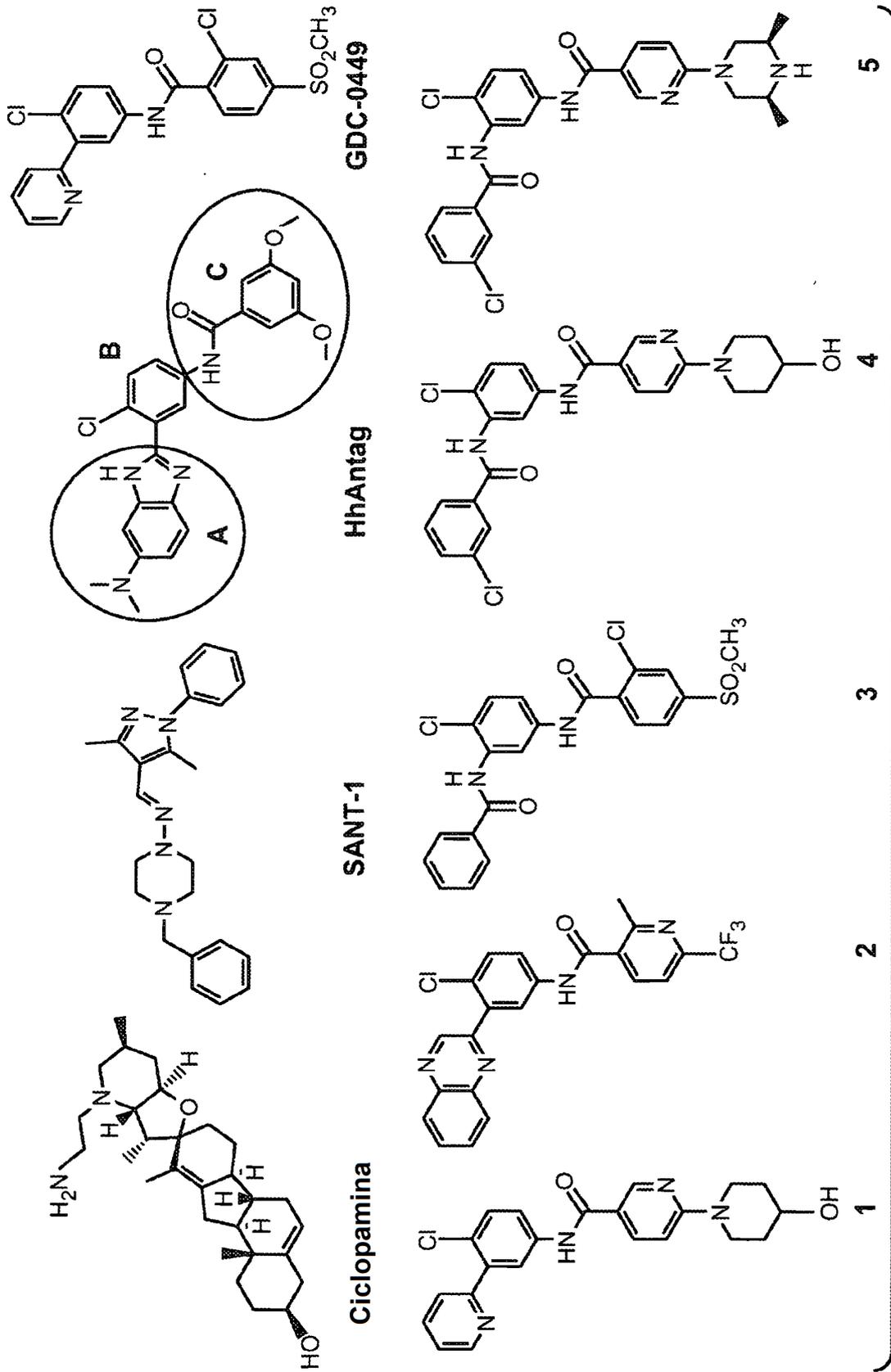


FIG. 1B



% de inhibición de SMO a 1 μ M

Compuesto	TS	D473H	
Ciclopamina	90 \pm 2	48 \pm 5	
SANT-1	93 \pm 1	39 \pm 6	
HhAntag	93 \pm 2	90 \pm 2	
GDC-0449	92 \pm 2	3 \pm 11	
1	91 \pm 2	7 \pm 16	
2	91 \pm 12	8 \pm 12	
3	93 \pm 2	50 \pm 6	
4	93 \pm 2	88 \pm 2	
5	92 \pm 2	72 \pm 3	57 \pm 18

FIG. 2B

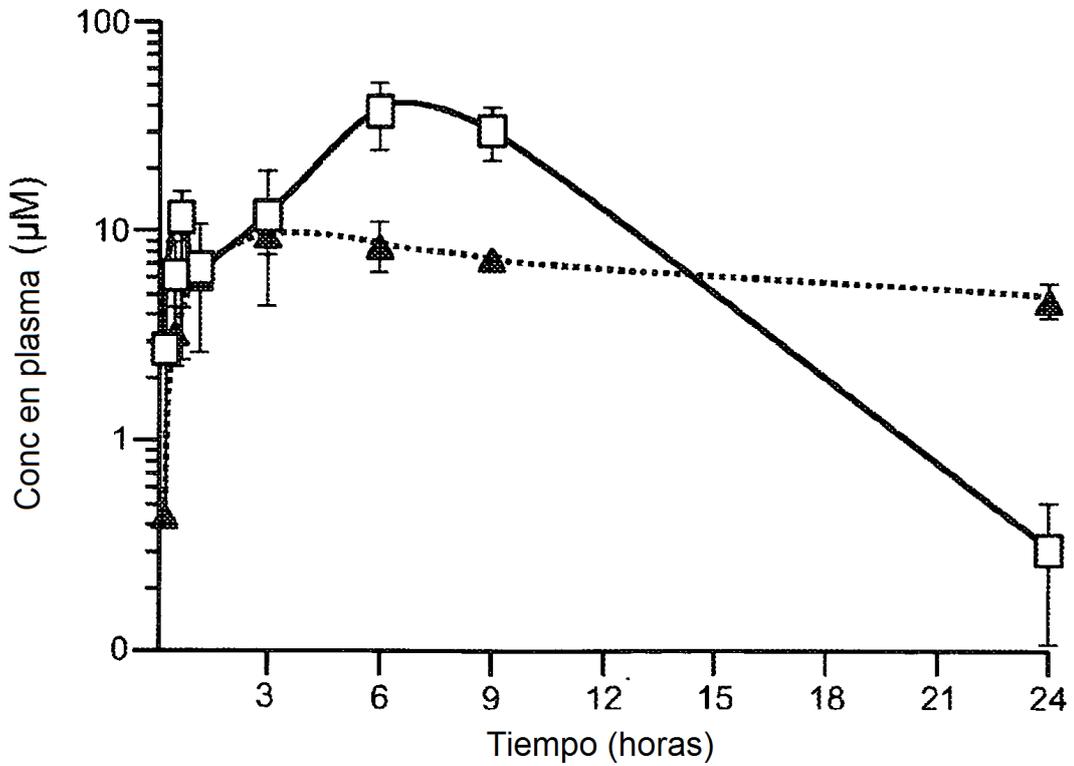


FIG. 2C