

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 076**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2010** **PCT/US2010/047739**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2011** **WO11028950**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2010** **E 10751758 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016** **EP 2473522**

54 Título: **Smoothened mutante y métodos de utilización del mismo**

30 Prioridad:

02.09.2009 US 239364 P

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

31.01.2017

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (50.0%)

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080-4990, US y

CURIS, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

DE SAUVAGE, FREDERIC J.;

DIJKGRAAF, GERRIT J. P.;

JANUARIO, THOMAS y

YAUCH, ROBERT L.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 599 076 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 utilización del mismo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a ácidos nucleicos SMO mutantes aislados y proteínas relacionados con la resistencia de tumores a la quimioterapia y métodos para cribar compuestos que se unen a los mutantes SMO, o modulan la actividad de SMO, y al diagnóstico y terapia del cáncer y en particular a la detección de mutaciones que son diagnósticas y/o pronósticas y tratamiento de tumores resistentes a los fármacos.

Antecedentes de la invención

La terapéutica molecular dirigida contra el cáncer ha mostrado una actividad impresionante en clínica. Algunos de los ejemplos destacados mejores incluyen los inhibidores de la tirosina cinasa imatinib en la leucemia mielógena crónica positiva al cromosoma Filadelfia (CML) o los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) PDGFR/KIT mutantes y el erlotinib en el cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) EGFR mutante (Krause, D.S. y R.A. Van Etten (2005) N. Engl. J. Med. 353(2):172-187). El tratamiento con estos agentes ha dado lugar a respuestas anti-tumorales drásticas en las poblaciones de pacientes que albergan estas anomalías moleculares. Sin embargo, a pesar de las impresionantes respuestas clínicas iniciales, la mayoría de los pacientes progresan eventualmente debido a la adquisición de resistencias a los fármacos (Engelman, J.A. y J. Settleman (2008) Curr. Opin. Genet. Dev. 18(1):73-79). En consecuencia, la identificación de los mecanismos de resistencia a los fármacos ha abierto la puerta para más combinaciones racionales de fármacos y el desarrollo de inhibidores de "segunda generación" que puedan potencialmente superar o evitar la aparición de resistencias.

El meduloblastoma es un tumor neuroectodérmico primitivo del cerebelo que representa el tumor maligno cerebral más común en niños (Polkinghorn, W.R. y N.J. Tarbell (2007) Nat. Clin. Pract. Oncol. 4(5):295-304). A pesar de la mejora en la tasa de supervivencia, los efectos secundarios debilitantes de la radiación adyuvante representa un desafío clínico importante, apoyando de esta manera la necesidad de nuevas terapias moleculares dirigidas.

La ruta de señalización Hedgehog (Hh) ha sido implicada directamente en la patogénesis del meduloblastoma. La señalización Hh constitutiva, más a menudo debido a una mutación de pérdida de función subyacente del receptor del inhibidor PTCH1, se ha demostrado 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 ruta Hh da como resultado la eliminación del tumor y se prolonga la supervivencia (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, se ha observado recientemente que un paciente tratado con el nuevo inhibidor de la ruta Hh, el GDC-0449, mostraba inicialmente una respuesta drástica al tratamiento (Charles M. Rudin et al. (2009) N. Engl. J. Med. (remitido)), pero fallaba en que no tenía una respuesta duradera al tratamiento y el tumor recidivaba.

Existe la urgente necesidad en la técnica de encontrar compuestos que modulen la actividad de SMO en dichas proteínas SMO mutantes para superar la resistencia a los fármacos del tratamiento con GDC-0449. Existe la necesidad adicional de un método para diagnosticar los pacientes que pueden ser resistentes al tratamiento por medio de la variación natural de su genotipo SMO o por medio de una mutación adquirida y resistencia.

Sumario de la invención

La invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una proteína SMO mutante. En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico codifican una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica en un 95 % a la SEQ ID NO: 2 en la que dicha secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido en la posición 473 de SEQ ID NO: 2 que es cualquier aminoácido menos ácido aspártico (D). En algunas realizaciones, el aminoácido de la posición 473 de SEQ ID NO: 2 es histidina (H), glicina (G), fenilalanina (F), tirosina (Y), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), serina (S), treonina (T), metionina (M), glutamina (Q) o asparagina (N). En un aspecto de la invención, la secuencia de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de ácido nucleico parental de SEQ ID NO: 3 (SMO tipo silvestre), pero contiene una mutación o mutaciones en las posiciones 1417, 1418 y/o 1419 que cambian el aminoácido codificado de ácido aspártico (D) a otro aminoácido diferente. En algunas realizaciones, las mutaciones dan como resultado un cambio de ácido aspártico (D) a histidina (H), glicina (G), fenilalanina (F), tirosina (Y), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), serina (S), treonina (T), metionina (M), glutamina (Q) o asparagina (N).

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 fragmento de la misma que incorpora una mutación en el aminoácido 473 de SMO. En una realización, la sonda es complementaria al ácido nucleico que codifica la SMO o dicho fragmento de la misma. La sonda puede tener una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos. En algunas realizaciones, la sonda puede estar marcada detectablemente. La sonda se une

diferencialmente al Smo mutante más que al Smo de tipo silvestre (que tiene un ácido aspártico en la posición 473).

La invención también proporciona una proteína SMO mutante aislada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95 % a la SEQ ID NO: 2 en la que la secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido en la posición 473 distinto de ácido aspártico (D). En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 473 es histidina (H), glicina (G), fenilalanina (F), tirosina (Y), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), serina (S), treonina (T), metionina (M), glutamina (Q) o asparagina (N).

La invención proporciona además un anticuerpo que se une específicamente a una proteína SMO mutante de la invención en la que el epítipo del anticuerpo está presente en una SMO mutante que tiene un aminoácido distinto de ácido aspártico en la posición 473, pero no se une con la SMO de tipo silvestre. 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 de cadena sencilla o un fragmento de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, o 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 sin limitarse a un agente quimioterápico, una toxina o un isótopo radioactivo. En algunas realizaciones, el anticuerpo inhibe la actividad de SMO. En otras realizaciones, el anticuerpo inhibe solamente la actividad de SMO mutante.

La invención también proporciona un método para detectar un gen SMO mutado en una muestra que comprende la amplificación, en una muestra, de un ácido nucleico que codifica el extremo carboxilo o el dominio transmembrana 6 de SMO, o un fragmento del mismo sospechoso de contener 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. En algunas realizaciones la movilidad electroforética se determina en gel de poliacrilamida. En dichas realizaciones, la movilidad electroforética del Smo mutante se puede diferenciar del Smo de tipo silvestre.

La invención proporciona adicionalmente un método para identificar 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 es capaz de hibridarse específicamente a un ácido nucleico que codifica una proteína SMO mutada o un fragmento de la misma que incorpora una mutación, y detectar la hibridación. En algunas realizaciones, el método detecta una mutación en la parte del extremo carboxilo del dominio transmembrana 6 de SMO. En algunas realizaciones, la mutación SMO se produce en las posiciones 1417, 1418 y/o 1419 de Smo (que codifican el aminoácido en la posición 473) en la que la mutación da como resultado un codón que codifica un aminoácido distinto al ácido aspártico. En algunas realizaciones la sonda está marcada detectablemente. En algunas realizaciones la sonda es un oligómero antisentido. En algunas realizaciones se amplifica el ácido nucleico del gen SMO o un fragmento del mismo de la muestra y se pone en contacto con la sonda.

La invención también proporciona un método para identificar un tumor en un sujeto humano que es resistente al tratamiento con un agente quimioterápico tal como GDC-0449 que comprende la determinación de la presencia de un gen SMO mutado o una proteína SMO mutada en una muestra del tumor, en la que dicha mutación se localiza en el gen SMO que codifica una parte de SMO en la superficie de la membrana extracelular (por ejemplo, la parte del extremo carboxilo del dominio transmembrana 6 de SMO) de manera que la presencia del gen SMO mutado o la proteína SMO mutada indica que el tumor es resistente al tratamiento con el agente quimioterápico, tal como, pero no limitado al GDC-0449. En algunas realizaciones, la mutación es en una parte del gen SMO que codifica el aminoácido 473 de SMO. En algunas realizaciones, la mutación produce un cambio en el aminoácido 473 de SMO de Asp a otro aminoácido. En algunas realizaciones el otro aminoácido es histidina (H), glicina (G), fenilalanina (F), tirosina (Y), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), serina (S), treonina (T), metionina (M), glutamina (Q) o asparagina (N).

Se desvela en el presente documento un método para identificar un tumor en un sujeto humano que es susceptible al tratamiento con un inhibidor de SMO que comprende (i) determinar la presencia de una proteína o un gen SMO de tipo silvestre en una muestra del tumor, de manera que la presencia de una proteína o un gen SMO de tipo silvestre indica que el tumor es susceptible al tratamiento con un inhibidor de SMO o (ii) determinar la presencia de una proteína o gen SMO mutado en una muestra del tumor en el que la mutación da como resultado un cambio del aminoácido de la posición 473 de SMO, de manera que la presencia de una proteína o gen SMO mutado indica que el tumor no es susceptible al tratamiento con un inhibidor de SMO tal como GDC-0449. En algunas realizaciones la mutación SMO es un cambio de ácido aspártico (D) 473 a cualquier otro aminoácido. En algunas realizaciones, el aminoácido es histidina (H), glicina (G), fenilalanina (F), tirosina (Y), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), serina (S), treonina (T), metionina (M), glutamina (Q) o asparagina (N).

Se desvela en el presente documento un método para determinar el pronóstico de un paciente que se va a tratar de un tumor dependiente de Hedgehog que comprende determinar en una muestra de un tumor, la presencia o ausencia de una mutación en el aminoácido 473 de manera que la presencia de la mutación indica un pronóstico peor en comparación con la ausencia de dicha mutación utilizando ciertos inhibidores de Smo.

La invención proporciona adicionalmente un método para cribar compuestos que inhiban la señalización de una proteína SMO mutante que incorpora una mutación en el aminoácido 473 que comprende poner en contacto el SMO mutante con un compuesto de ensayo y detectar la unión del compuesto al SMO mutante, de esta manera la unión del compuesto de ensayo al SMO mutante indica que el compuesto de ensayo es un inhibidor de SMO mutante.

La invención también proporciona un método para cribar compuestos que inhiben la señalización de una proteína SMO mutante que incorpora una mutación en el aminoácido 473 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, de esta manera la presencia de Gli indica que el compuesto de ensayo no es un inhibidor de la SMO mutante. En algunas realizaciones la actividad de Gli se mide utilizando una proteína Gli que se conjuga con un marcador detectable. En algunas realizaciones el marcador detectable es un marcador fluorescente (por ejemplo, luciferasa).

Se desvela en el presente documento un método para el tratamiento del cáncer por la administración a un paciente que necesita el mismo de un compuesto que se une significativamente al SMO que tiene una sustitución de aminoácido (mutación) en la posición 473. En algunas realizaciones, la proteína SMO comprende la sustitución del ácido aspártico en 473 por cualquier otro aminoácido. En algunas realizaciones, el otro aminoácido es histidina (H), glicina (G), fenilalanina (F), tirosina (Y), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), serina (S), treonina (T), metionina (M), glutamina (Q) o asparagina (N). 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 posteriormente).

Se desvela en el presente documento un método para retrasar o evitar la mutagénesis inducida por fármacos, que comprende la administración de un inhibidor de SMO y un inhibidor de PI3K. En algunas realizaciones el inhibidor de SMO es GDC-0449. En algunas realizaciones el inhibidor SMO es un inhibidor de SMO mutante que tiene una sustitución de aminoácido en la posición 473. En algunas realizaciones el inhibidor de SMO mutante es un compuesto que tiene la fórmula estructural de Fórmula I, Fórmula II y/o Fórmula III (véase posteriormente).

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra la identificación de una mutación SMO en muestras tumorales de un paciente con meduloblastoma que ha recidivado tras una respuesta inicial a GDC-0449. **(A)** Los trazados de secuencia de nucleótido y la mutación heterocigótica en SMO produce un cambio Asp>His en el aminoácido 473 (asterisco). Esta mutación estaba presente en una biopsia metastática tomada en la recidiva, pero no estaba presente en el tumor primario antes del tratamiento con GDC-0449. **(B)** La arquitectura GPCR de SMO mapea la localización de la mutación D473H en el extremo C de TM6. Mirando hacia la superficie extracelular del haz de la hélice GPCR (con disminución de color desde TM1 a TM7, dejando los ectobucles fuera por claridad), un modelo molecular de SMO construido en la matriz de rodopsina (PDB: 2Z73) y el receptor β -adrenérgico (PDB: 2VT4) con MODELLER (Sali, A. y T.L. Blundell (1993) J. Mol. Biol. 234: 779), muestra la posición del resto Asp-473 de frente a la cavidad central de unión.

La **Figura 2** muestra que la mutación SMO D473H confiere resistencia al inhibidor de la ruta Hh, el GDC-0449. **(A)** Actividad del indicador GLI-luciferasa tras la transfección de variantes de SMO en presencia (barras grises) o ausencia (barras negras) de ADN PTCH (20 ng). SMO-M2 representa una mutación activadora identificada previamente. **(B)** Actividad indicadora de GLI-Luciferasa en células C3H10T1/2 transfectadas con SMO-TS (círculos cerrados) o SMO-D473H (círculos abiertos) tras el tratamiento con distintas dosis de GDC-0449. La actividad indicadora se normaliza en cultivos sin tratar. **(C)** Unión de GDC-0449 marcado con ^{14}C (5 nM) a células HEK-293 transfectadas con variantes SMO en presencia o ausencia de GDC-0449 frío (5 μM), para demostrar la especificidad. Los datos en todos los experimentos representan la media $\pm$ SD.

La **Figura 3** muestra la resistencia adquirida al GDC-0449 mediante la mutación SMO en un modelo de meduloblastoma en un ratón modificado genéticamente. **(A)** Se hicieron los aloinjertos de meduloblastoma en ratones *Ptch*^{+/-}; *p53*^{+/-} resistentes al GDC-0449 mediante una dosificación diaria intermitente de 75 mg/kg de GDC-0449. Los días de tratamiento se representan por triángulos y los tumores se extirparon una vez que fallaban en la respuesta a dos dosificaciones diarias con GDC-0449. **(B)** Trazados de secuencia de nucleótidos de los aloinjertos de meduloblastoma (SG274) parentales y resistentes a GDC-0449 que muestran una mutación heterocigótica que da como resultado un cambio D>G en el aminoácido 477 de SMO (homólogos en la pos. 473 de SMO humano). **(C)** Actividad indicadora GLI-Luciferasa en células C3H10T1/2 transfectadas con SMO-TS (círculos cerrados) o SMO-D477G (círculos abiertos) tras el tratamiento con distintas dosis de GDC-0449. **(D)** Cuantificación de niveles de ARN Gli1 por qRT-PCR de múltiples tumores (n = 3) recolectados 6 h después del tratamiento con vehículo de control (barras abiertas) o 75 mg/kg de GDC-0449 (barras cerradas) de ratones que albergaban tumores parentales y SG274. Los datos indican la media $\pm$ SD. *, p < 0,05 (ensayo t).

La **Figura 4** muestra la presencia y pérdida de heterocigosidad (LOH) de la mutación PTCH1 W844C pre-existente que se confirmó en la biopsia que se tomó en la recidiva. **(A)** El trazado de secuencia del nucleótido confirma la mutación homocigótica PTCH1 W844C pre-existente en una biopsia tomada en la recidiva. **(B)** Pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 9 en el ADN obtenido del a biopsia en la recidiva, y evaluada con matrices AffymetrixSNP. Se muestran los tramos de alelo homocigótico cubiertos por cada sonda SNP a lo largo de la región resaltada del cromosoma 9.

La **Figura 5** muestra que PTCH1-W884C es incapaz de suprimir la actividad de la ruta Hh. Actividad indicadora

de GLI-Luciferasa tras la co-transfección de distintas relaciones de entrada de SMO y ADN PTCH1 de TS (círculos cerrados) o W884C (círculos abiertos) en células C3H10T1/2.

La **Figura 6** muestra que no se detectaron alteraciones en el número de copias de SMO por qPCR utilizando dos ensayos independientes de gADN derivado de la biopsia de la progresión. El número de copias se determinó por qPCR y se calibró con el ADN genómico normal humano después de la normalización a LINE-1. Se utilizaron como controles, el gADN de las líneas celulares con cambios del número de copias de bajo nivel en el locus SMO, como se determinó previamente por el perfil de la matriz Affimetrix 100K (previsión).

La **Figura 7** muestra los espectros de masas de los productos ADN extendidos para SMO TS y la variante D473H (asterisco) de múltiples biopsias. Las biopsias de meduloblastoma (MB) primario y metastático se tomaron ambas antes del tratamiento con GDC-0449. Las intensidades de espectros de masas representan unidades arbitrarias.

La **Figura 8** muestra el análisis de inmunofluorescencia de células C3H10T1/2 transfectadas con SMO-TS y SMO-D473H marcados con FLAG hibridados con anti-FLAG o anti-actina como control de carga.

La **Figura 9** muestra el análisis de citometría de flujo de células C3H10T1/2 transfectadas con SMO-TS y SMO-D473H marcados con FLAG.

La **Figura 10** muestra que SMO-D473H altera la capacidad de KAAD-ciclopamina para suprimir la señalización de Hh. Actividad indicadora de GLI-luciferasa en células C3H10T1/2 transfectadas con SMO-TS (círculos cerrados) o SMO-D473H (círculos abiertos) tras el tratamiento con distintas dosis de KAAD-ciclopamina.

La **Figura 11** muestra que el resto SMO Asp-473 está bien conservado a lo largo de SMO y receptores Frz. Un alineamiento a lo largo de la región TM6-TM7 de las variantes de especies SMO representativas y las diez cadenas del receptor Frz humano muestra el resto Asp/Glu conservado en la posición 473. También se resalta la posición de la cola TM7 de Trp-535 que alberga la mutación activadora SMO-M2. De manera interesante, ambas posiciones de aminoácidos sensibles están seguidas estrechamente por una corta hélice anfipática asociada a la membrana.

La **Figura 12** muestra que el resto SMO Asp-473 está bien conservado a lo largo de SMO y los receptores Frz. El pliegue GPCR de SMO mapea la localización de la mutación D473H en el extremo C de TM6, en la interfaz de la membrana extracelular. La topología esquemática de SMO muestra la imagen en espejo, la localización de la interfaz de la membrana citosólica de la mutación activadora W535L de SMO-M2 en el extremo C del TM7 (Xie, J. et al. (1998) Nature 391: 90). Se ha previsto que tanto TM6 como TM7 estén seguidos por cortas hélices anfipáticas, asociadas a la membrana.

La **Figura 13** muestra que D473 es un resto clave para la actividad de SMO y la unión a GDC-0449. **(A)** Actividad de *Gli*-luciferasa en células C3H10T1/2 transfectadas con construcciones SMO de tipo silvestre, o mutantes. Los ensayos de indicador se llevaron a cabo en presencia (barras grises) o ausencia (barras negras) de 1 μ M de GDC-0449 y los valores se normalizaron con los de SMO-TS. El nivel de actividad de SMO-TS en ausencia de fármaco se indica con una línea discontinua (-----) a lo largo del gráfico para facilitar la comparación. El SMO-M2 es una mutante oncogénica descrita previamente con una sustitución W535L (Xie, J. et al. (1998) Nature 391: 90). **(B)** Unión de GDC-0449 marcado con 3 H a células HEK-293 transfectadas con distintos plásmidos SMO en presencia (barras grises) y ausencia (barras negras) de un exceso de GDC-0449 sin marcar. La unión al fármaco se midió en recuentos por minuto (cpm). **(C)** Actividad *Gli*-luciferasa en células C3H10T1/2 co-transfectadas con PTCH1 y selección de construcciones SMO. Los valores se normalizaron con los niveles de máxima actividad de los cultivos sin PTCH1. Los datos en todos los experimentos son medias $\pm$ SD.

La **Figura 14** muestra que el Compuesto 5 (Fórmula III) es un potente antagonista de SMO-D473H con buenas propiedades farmacocinéticas en ratones. **(A)** Estructuras químicas de distintos antagonistas de SMO utilizados en el presente estudio. Un círculo marca el anillo-A, un segundo círculo marca el anillo C y el anillo B se muestra entre los dos HhAntag. Los otros compuestos contienen variaciones de estos elementos estructurales. **(B)** los compuestos cribados a 1 μ M con valores del % de inhibición de actividad *Gli*-luciferasa inducida por sobre-expresión de SMO-TS o SMO-D473H en células C3H10T1/2. **(C)** Media de concentración de plasmática frente al tiempo después de una dosis única vía oral de 100 mg kg⁻¹ del compuesto 4 (cuadrado negro) o el compuesto 5 (triángulo gris) en ratones ($n = 24$; tres animales por punto de tiempo). El compuesto 4, estructuralmente similar, pero más potente se aclara mucho más rápidamente de la corriente sanguínea que el compuesto 5 (t_{1/2} de 21/2 frente a 22 horas). **(D)** Actividad indicadora de *Gli*-luciferasa de células C3H10T1/2 transfectadas con SMO-TS (sólido) o SMO-D473H (abierto) después de la respuesta a la dosis de GDC-0449 (cuadrados negros) o el compuesto 5 (triángulos grises). La actividad indicadora se normalizó con respecto a un indicador de control y a niveles de actividad máximos. El compuesto 5 es menos potente contra SMO-TS que GDC-0449, pero puede inhibir los mutantes resistentes a fármacos. Los datos en (B) a (D) son las medias $\pm$ SD.

La **Figura 15** muestra que el compuesto 5 inhibe el crecimiento tumoral dependiente de Smo-D477G y evita la acumulación ciliar de Smo *in vitro*. **(A)** Volumen tumoral fijado de aloinjertos de SG274 tratados por vía oral con un vehículo ($n = 4$; rombos negros), 100 mg kg⁻¹ del compuesto una vez al día ($n = 6$; triángulos grises) o 100 mg kg⁻¹ de HhAntag691 dos veces al día ($n = 6$, cuadrados grises). La curva del vehículo de control se detiene el día 8, ya que se practicó la eutanasia a los ratones cuando su carga tumoral alcanzaba los 2000 mm³. **(B)** Evaluación de niveles de ARNm *mGli1* por qRT-PCR en tumores del panel (A) recolectado 6 horas después del último tratamiento farmacológico. Los valores representan las medias $\pm$ SD. **(C)** imágenes representativas de células S12 tratadas con los compuestos indicados en ausencia (arriba) o presencia (abajo) de Shh durante 16 horas. Se detectaron los cilios y centrosomas (tubulinas acetiladas y gamma, respectivamente), así como Smo por inmunofluorescencia, mientras que los núcleos se visualizaron por tinción con DAPI. Se muestra una superposición de los tres canales con el canal (Smo) cambiado seis píxeles a la derecha. Las flechas apuntan a

los cilios con tinción robusta (gris) y débil o sin tinción (blanco) de Smo. La escala de la barra es de 15 μ M. **(D)** gráfico de barras que representa el % de células S12 con cilios Smo+ (flechas grises) en las condiciones indicadas, calculado a partir de múltiples imágenes similares a las que se muestran en el panel (C). Se evaluaron al menos 200 cilios de tres o más experimentos y los valores representan la media $\pm$ SD. Para facilitar la comparación, el nivel de Smo ciliar en las células tratadas con el vehículo (DMSO) se indica con una línea de puntos (---) para la condición Hh- (barras grises) y una línea discontinua para la condición Hh+ (barras negras).

La **Figura 16** muestra la caracterización molecular de modelos adicionales de aloinjerto de MB resistente que revela mecanismos de resistencia a GDC-0449 corriente abajo de Smo. **(A)** Cuantificación de niveles de ARNm *Gli1* por qRT-PCR en tumores expandidos ($n = 3$) recolectados 6 horas tras el tratamiento con vehículo (triángulos cerrados) o GDC-0449 (triángulos abiertos). *Gli1* se expresaba similarmente en todos los modelos, pero solamente se regulaba negativamente por GDC-0449 en el control y en tumores SG102 (* $p < 0,02$). **(B)** El gráfico muestra simultáneamente el número de copias (barras) y la expresión de ARNm (puntos de datos) de *Ccnd1* (negro) y *Gli2* (gris) en el control y en los tumores resistentes a GDC-0449. El análisis del número de copias se llevó a cabo por qPCR del tumor resistente inicial para confirmar las amplificaciones génicas observadas por aCGH, mientras que la expresión de ARNm se determinó por perfil de micromatrices de tres tumores expandidos. Los niveles de expresión de ARNm se muestran en unidades arbitrarias y representan las medias $\pm$ SD. **(C)** Inmunotransferencias que muestran los niveles de proteína *Ccnd1* y *Gli2*. Se analizaron tres tumores expandidos para cada línea tumoral y se mostraron los niveles de actina como un control de carga. *Gli2FL* y *Gli2R* representan las formas de longitud completa y represora de *Gli2*. Las posiciones de los marcadores de peso molecular se indicaron a la izquierda de la transferencia de *Gli2* en kilodaltons (kDa). **(D)** Inmunotransferencia que muestra los niveles de proteína *Ccnd1* en tumores expandidos de control y SG102 ($n = 3$ /grupo) después de un tratamiento de 24 horas con el vehículo (Veh) o GDC-0449 (449). El gen Hh diana *Ccnd1* es refractario a la regulación negativa mediada por GDC-0449 en tumores SG102.

La **Figura 17** muestra que los aloinjertos de MB de control y resistentes a GDC-0449 son sensibles a la inhibición de PI3K. **A**, inmunotransferencias que muestran los niveles de AKT activada y S6 en tumores expandidos de los 4 modelos ($n = 3$ /grupo) después de un tratamiento de 6 horas con el vehículo (Veh) o GDC-0941 (941). Los niveles totales de AKT y S6 se muestran como controles de carga. **B**, media ajustada de volumen tumoral de aloinjertos de MB de control y resistente a GDC-0449 tratados por vía oral con el vehículo (cuadrados abiertos) o 150 mg kg⁻¹ de GDC-0941 una vez al día (triángulos sólidos). Se analizaron el mismo número de animales para ambas armas de tratamiento de cada modelo tumoral: Control ($n = 7$), SG102 ($n = 5$), SG152 ($n = 5$) y SG274 ($n = 7$).

La **Figura 18** muestra la inhibición por GDC-0449 y la expresión en la superficie celular de distintos mutantes SMO-D473. **(A)** como en la Fig. 1A, pero con distintas sustituciones de aminoácidos en la posición 473. **(B)** Actividad de indicador *Gli*-luciferasa en células C3H10T1/2 transfectadas con SMO-TS (cuadrados negros) o SMO-D473V (triángulos grises) después de una respuesta a la dosis de GDC-0449. SMO-D473V es parcialmente resistente a este HPI con una CI₅₀ aproximadamente 20 veces mayor. **(C)** Expresión relativa SMO-D473 mutantes en la superficie celular de varios.

La **Figura 19** muestra la localización de Smo en células S12 tratadas con KAAD-Ciclopamina o HhAntag en ausencia o presencia de Shh. Como en la Fig. 15 C, pero con otros compuestos.

La **Figura 20** muestra un resumen de las variaciones del número de copias a lo largo del **(A)** el cromosoma 7 en el modelo SG102 y **(B)** el cromosoma 1 en el modelo SG152. Se representa la relación Log2 en el eje Y, y se representa la localización cromosómica en el eje X, en relación con el ideograma. Las líneas superiores e inferiores externas indican los umbrales pre-definidos como se describe en Materiales y Métodos.

Descripción detallada

Es un descubrimiento de la presente invención los eventos mutacionales asociados con la resistencia a la quimioterapia para los tumores dependientes de hedgehog que existen en Smoothed (SMO) que imparte resistencia de los tumores al tratamiento con compuestos que inhiben la señalización hedgehog tal como la ciclopamina y GDC-0449. La presente invención proporciona composiciones y métodos que son útiles para el pronóstico, diagnóstico y terapia contra el cáncer que es dependiente de la señalización Hedgehog.

Las técnicas y procedimientos descritos o a los que se hace referencia en el presente documento generalmente se entienden bien y comúnmente se emplean utilizando una metodología convencional por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías que se utilizan ampliamente descritas en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; 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 y 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); 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 y 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).

I. DEFINICIONES

Con fines de interpretación de esta memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y donde sea apropiado, los términos que se utilizan en singular también incluirán el plural y viceversa.

El término "anticuerpo" en el presente documento se utiliza 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 anticuerpo siempre que presenten la actividad biológica deseada.

Un anticuerpo "aislado" es el que se ha identificado y separado y/o recuperado de un compuesto de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son los materiales que interferirían con los usos de investigación, diagnóstico o terapéutico del anticuerpo, y puede incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica (1) hasta más del 95 % por peso de anticuerpo como se determina, por ejemplo, por el método Lowry, y en algunas realizaciones, hasta más de 99 % por peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencias de aminoácidos en el extremo N o internas por el uso, por ejemplo, de un secuenciador de copa centrífuga, o (3) hasta la homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando, por ejemplo, la tinción con Coomassie o plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Los "anticuerpos nativos" habitualmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Daltons, compuestos por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque el número de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por varios 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 se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que ciertos restos de aminoácidos particulares forman un interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios del extremo amino de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Se puede hacer referencia al dominio variable de la cadena pesada como "VH". Se puede hacer referencia al dominio variable de cadena ligera como "VL". Estos dominios generalmente son las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión al antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables se diferencian extensamente en secuencias entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular a 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 llamados regiones hipervariables (HVR) tanto en los dominios variables de la cadena ligera como en los de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco conservadas (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada una cuatro regiones FR, que adoptan mayormente una configuración de lámina beta. Las HVR de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por 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., Sequence of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están directamente implicados en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan varias funciones efectoras, tales como la participación en la toxicidad celular mediada por anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" del anticuerpo (inmunoglobulina) de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno o dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), que se basan en las secuencias de aminoácido de sus dominios constantes.

Dependiendo de las secuencias de aminoácido de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varios de estos se pueden dividir en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones

tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien y se describen en general, por ejemplo, en Abbas et al. *Cellular and Mol. Immunology*, 4ª ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formado por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos.

Las expresiones “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo completo” se utilizan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no fragmentos de anticuerpo como se define posteriormente. Las expresiones se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

Un “anticuerpo desnudo” para los fines del presente documento es un anticuerpo no está conjugado con un resto citotóxico o un radiomarcador.

Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que comprenden preferentemente la región de unión al antígeno del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y fragmentos Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpos.

La digestión del anticuerpo con papaína produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. Los tratamientos con pepsina producen un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y sigue siendo capaz de entrecruzarse con el antígeno.

El “Fv” es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de unión al antígeno completo. En una realización, una especie Fv de dos cadenas consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en una asociación estrecha, no covalente. En una especie Fv de cadena sencilla (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden estar unidos covalentemente por un enlazador peptídico flexible de manera que las cadenas ligera y pesada se pueden asociar en una estructura “dimérica” análoga a la de la especie Fv de dos cadenas. Es en esta configuración en la que tres HVR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis HVR confieren la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable sencillo (o medio 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 completo.

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

Los fragmentos “Fv de cadena sencilla” o “scFv” comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. En general, el polipéptido scFv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que hace posible que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para revisar los scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH-VL). Utilizando un enlazador que es demasiado corto para el emparejamiento de los dos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan a emparejarse con los dominios complementarios de la otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9: 129-134 (2003); y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetraacuerpos se describen también en Hudson et al., *Nat. Med.* 9: 129-134 (2003).

La expresión “anticuerpo monoclonal” como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones que se producen naturalmente, que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Por lo tanto, el adjetivo “monoclonal” indica de la característica del anticuerpo que no es una mezcla de distintos anticuerpos. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal incluye normalmente un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptido que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a la diana se obtuvo por un proceso que incluye la

selección de una secuencia polipeptídica de unión a una única diana a partir de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único a partir de una pluralidad de clones, tal como un agrupamiento de clones de hibridoma, clones de fagos, o clones de ADN recombinante. Se debería entender que una secuencia de unión a la diana seleccionada puede alterarse
 5 adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, humanizar la secuencia de unión a la diana, mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende una secuencia de unión a la diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. Al contrario que en las preparaciones de anticuerpo policlonal, que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo
 10 monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpo monoclonal son ventajosas ya que normalmente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El adjetivo "monoclonal" indica la característica del anticuerpo que se obtiene a partir de una población
 15 sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se considera que necesite cualquier método de producción particular del anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a utilizar de acuerdo con la presente invención se pueden producir por varias técnicas, que incluyen por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling et al., en:
 20 *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. Nº 4.816.567), tecnologías de fagos de presentación (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
 25 producir anticuerpos humanos o tipo humanos en animales que tienen partes o todo de los loci o genes de inmunoglobulina humanos que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; 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 EE. UU. Nº 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 Bio-technol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los
 35 que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo, mientras que la cadena remanente es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nº 4.816.567; y
 40 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, por ejemplo, inmunizando monos macacos con el antígeno de interés.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que
 45 contienen una secuencia mínima de inmunoglobulinas no humanas. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en el que los restos de HVR del receptor se sustituyen con restos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata, conejo, o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseada. En algunos casos, los restos FR de inmunoglobulina humana se sustituyen con los restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos
 50 humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se pueden hacer para afinar adicionalmente la actuación del anticuerpo. En general un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FR son de una secuencia de inmunoglobulina
 55 humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente comprenderá también al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de la inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, por ejemplo, Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *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. Transaction* 23: 1035-1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:
 60 428-433 (1994); y las Patentes de EE. UU. Nº 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es el que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con el de un anticuerpo
 producido por un ser humano y/o se ha producido utilizando cualquiera de las técnicas de producción de anticuerpos
 65 humanos como se desvela en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión al antígeno no humanos. los anticuerpos humanos se pueden producir utilizando varias técnicas que se conocen en la técnica, que incluyen

bibliotecas de fagos de presentación. 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 que se describen en Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 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). Los anticuerpos humanos se pueden preparar administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a un desafío antigénico, pero cuyos loci endógenos se han incapacitado, por ejemplo, un xenomouse inmunizado (véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N° 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 anticuerpos humanos generados por medio de tecnología de hibridoma de células B humanas.

La expresión “región hipervariable”, “HVR”, o “HV”, cuando se utiliza en el presente documento se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que es hipervariable en su secuencia y/o forma bucles definidos estructuralmente. En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en VH (H1, H2, H3), y tres en VL (L1, L2, L3). En los anticuerpos nativos, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y en particular, se cree que H3 tiene un papel único para conferir la especificidad afinada 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). Además, los anticuerpos de camélidos de origen natural que consisten solo en una cadena pesada son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-448 (1993); Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3: 733-736 (1996).

Se utilizan varias descripciones de HVR y se engloban en el presente documento. Las regiones determinantes de complementariedad de Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de secuencia y se utilizan muy habitualmente (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere por el contrario a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Las HVR AbM representan una solución de compromiso entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se utilizan en el modelo de software de anticuerpo AbM de Oxford Molecular. Las HVR de “contacto” se basan en el análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas HVR se mencionan 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 pueden comprender “HRV extendidas” de la siguiente manera 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., *supra*, para cada una de estas definiciones.

“Región marco conservada” o restos “FR” son los restos del dominio variable distintos de los restos de la HVR como se definen en el presente documento.

La expresión “resto del dominio variable numerado como en Kabat” o “posición de aminoácido numerada como en Kabat”, y variaciones de las mismas, se refiere al sistema de numeración que se utiliza para los dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la recopilación de anticuerpos en Kabat et al., *supra*. Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal actual puede contener menos o aminoácidos adicionales que se corresponden con un acortamiento de, o la inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácido (resto 52a según Kabat) tras el resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, los restos 82a, 82b, y 82c, etc. según Kabat) tras el resto 82 de FR de cadena pesada. La numeración Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado, alineando las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada según Kabat de referencia.

El sistema de numeración de Kabat se utiliza en general cuando se hace referencia 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., Sequence of Immunological Interest. 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.

(1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se utiliza generalmente al referirse a un resto en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU expuesto en Kabat et al., *supra*). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de restos del anticuerpo IgG1 EU humano. A menos de que se establezca otra cosa en el presente documento, las referencias a números de restos en el dominio variable de anticuerpos significa la numeración de restos por el sistema de numeración de Kabat. A menos de que se establezca otra cosa en el presente documento, las referencias a los números de resto en el dominio constante de anticuerpos significa la numeración de restos por el sistema de numeración EU (por ejemplo, véase Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/640.323, Figuras para la numeración EU).

Un anticuerpo con "afinidad madura" es el que tiene una o más alteraciones en una o más HVR de los mismos que dan como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esas alteraciones. En una realización, un anticuerpo con afinidad madura tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos con afinidad madura se pueden producir utilizando ciertos procedimientos que se conocen en la técnica. Por ejemplo, Marks et al. *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) describe la maduración de afinidad por redistribución de dominios VH y VL. Se describe la mutagénesis aleatoria de restos de la HVR y/o región marco conservada en, por ejemplo 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).

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

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

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

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

"Funciones efectoras" de anticuerpo se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una secuencia nativa de la región Fc o variante de secuencia de aminoácidos de la región Fc) de un anticuerpo, y varía con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de las funciones efectoras de anticuerpo incluyen, la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B), y activación de células B.

La expresión "región Fc" se utiliza en el presente documento para definir una región del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye las regiones de secuencia nativa de Fc y variantes de regiones de Fc. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina puede variar, la región Fc de cadena pesada de inmunoglobulina IgG humana habitualmente se define como el tramo desde el resto de aminoácidos en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo del mismo. La lisina del extremo C (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede eliminar, por ejemplo, durante la producción o la purificación del anticuerpo, o por modificación recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpos intactos pueden comprender las poblaciones de anticuerpo con todos los restos K447 eliminados, poblaciones sin eliminación de restos K447, y poblaciones de anticuerpo que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin resto K447.

Una "región funcional Fc" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" a modo de ejemplo incluyen la unión a C1q; CDC; unión al receptor Fc; ADCC; fagocitosis; regulación negativa de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B, BCR), etc. Dichas funciones efectoras generalmente necesitan que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se puede evaluar utilizando distintos ensayos como se desvelan, por ejemplo, en las definiciones en el presente documento.

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

Una "variante de la región Fc" comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de una región de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácido, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la variante de región Fc tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con la región Fc de secuencia nativa o la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, desde

5 aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en la región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La variante de región Fc en el presente documento preferentemente poseerá al menos aproximadamente un 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de homología con las mismas,

10 más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % de homología con las mismas.

"Receptor de Fc" o "FcR" describe 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 el que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, que incluyen las variantes alélicas y las formas de corte y empalme alternativas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian primariamente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene el motivo de activación basado en el inmunorreceptor de tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en el inmunorreceptor de tirosina (ITIM) en su dominio intracitoplasmático (véase, por ejemplo, Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Los FcR se revisan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Cape1 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 identificarán en el futuro, se engloban en el término "FcR" del presente documento.

La expresión "receptor Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)) y la regulación de la homeostasis de las inmunoglobulinas. Se conocen métodos para medir la unión al FcRn (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.).

Se puede ensayar la unión del FcRn humano *in vivo* y la semivida en el suero de los polipéptidos de unión con alta afinidad al FcRn humano, por ejemplo, en un ratón transgénico o líneas celulares humanas transfectadas que expresen el FcRn humano, o en primates a los que se administra los polipéptidos con una variante de la región Fc. El documento WO 2000/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con unión a FcR mejorada o disminuida. Véase también, por ejemplo, Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y llevan a cabo funciones efectoras. En ciertas realizaciones, las células expresan al menos el FcγRIII y llevan a cabo funciones efectoras ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células citolíticas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas, y neutrófilos. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretadas unidas a los receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células NK, neutrófilos, y macrófagos) capacitan a estas células efectoras citotóxicas para unirse específicamente a una célula diana que porta un antígeno y posteriormente destruir la células diana con citotoxinas. Las células primarias para medir la ADCC, las células NK, expresan solo el FcγRIII, 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). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede llevar a cabo un ensayo *in vitro* de ADCC, tal como los que se describen en la Patente de EE. UU. N° 5.500.362 o 5.821.337 o la Patente de EE. UU. N° 6.737.056 (Presta). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen las PBMC y NK. De manera alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se desvela en Clynes et al. PNAS (USA) 95: 652-656 (1998).

"Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta del complemento clásica se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada), que se unen con su antígeno equivalente. Para evaluar la activación del complemento se puede llevar a cabo un ensayo de CDC, por ejemplo, como el que se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996). Las variantes de polipéptidos con la secuencia de aminoácidos de la región Fc alterada (polipéptidos con una variante de la región Fc) y con un aumento o disminución de la capacidad de unión a C1q se describen, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. 6.194.551 B1 y el documento WO 1999/51642. Véase también, por ejemplo, Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

El término “anticuerpo que comprende una región Fc” se refiere a un anticuerpo que comprende una región Fc. La lisina del extremo C (resto 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede eliminar, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o por modificación recombinante del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. En consecuencia, una composición que comprende un anticuerpo que tiene una región Fc de acuerdo con la presente invención puede comprender un anticuerpo con K447, con todo el K447 eliminado, o una muestra de anticuerpos con y sin el resto K447.

“Afinidad de unión” se refiere en general 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 pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos de que se indique otra cosa, como se utiliza en el presente documento, “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción de 1:1 entre los miembros de una pareja de unión (por ejemplo, un anticuerpo y un antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y puede representarse en general por la constante de disociación (K_d). La afinidad se puede medir por métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los que se describen en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse rápidamente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad, generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a mantenerse unidos más tiempo. Se conoce en la técnica varios métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales se pueden utilizar para los fines de la presente invención. Las realizaciones ilustrativas específicas y a modo de ejemplo para medir la afinidad de unión se describen a continuación.

En una realización, la “ K_d ” o “valor de K_d ” de acuerdo con la presente invención se mide mediante un ensayo de unión a un antígeno radiomarcado (RIA) que se lleva a cabo con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe para el siguiente ensayo. La solución de afinidad de unión de los Fab por el antígeno se mide equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con ^{125}I en presencia de una serie de titulaciones de antígeno sin marcar, después de capturar el antígeno unido en una placa revestida con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen, et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881(1999)). Para establecer las condiciones del ensayo, se revistieron placas MICROTITER® multipocillo (Thermo Scientific) durante una noche con 5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato sódico (pH 9,6), posteriormente se bloquearon con un 2 % (p/v) de soroalbúmina bovina en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n° 269620), se mezclaron 100 pM o 26 pM de antígeno marcado con ^{125}I con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)). El Fab de interés se incubó entonces durante una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. A partir de entonces, se transfirieron las mezclas a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). La solución se retira entonces y se lava la placa ocho veces con un 0,1 % de TWEEN-20™ en PBS. Cuando se secaron las placas, se añadieron 150 μl /pocillo de centelleante (MICROSCINT-20™; Packard), y se hizo el recuento de las placas en un contador gamma TOP-COUNTER™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos que o igual al 20 % de la unión máxima se escogen para su uso en los ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización la K_d o valor de K_d se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmones superficiales utilizando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con un antígeno inmovilizado en un chip CM5 a ~ 10 unidades de respuesta (UR). En resumen, los chip biosensores de dextrano carboximetilados (CM5, BIAcore, Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato sódico, pH 4,8, hasta 5 $\mu\text{g/ml}$ (~ 0,2 μM) antes de la inyección a un caudal de 5 $\mu\text{l/min}$ para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de la proteína acoplada. Después de la inyección de antígeno se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear los grupos que no reaccionan. Para las mediciones cinéticas, se inyectaron dos diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05 de tensioactivo TWEEN-20™ (PBST) a 25 °C con un caudal de aproximadamente 25 $\mu\text{l/min}$. Las tasas de asociación (k_{on}) y tasas de disociación (k_{off}) se calcularon utilizando un modelo de unión de Langmuir uno a uno (Software de Evaluación versión 3.2 BIACORE®) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la relación $K_{\text{off}}/K_{\text{on}}$. Véase, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999). Si la tasa on excede de $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmones superficiales anteriores, entonces la tasa on se puede determinar utilizando una técnica de enfriamiento fluorescente que mide el aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 40 nm, 16 nm de paso de banda) a 25 °C de 20 nM de anticuerpo antigénico (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno según se mide en un espectrómetro, tal como el espectrofotómetro equipado con parada de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINICO™ serie 8000 ThermoSpectronic) con una cubeta con agitado.

Una “tasa on”, “tasa de asociación”, “tasa asociación”, o “ K_{on} ” de acuerdo con la presente invención también se puede determinar como se ha descrito anteriormente utilizando un sistema BIACORE® 2000 o un BIACORE® 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

La expresión “sustancialmente similar” o “sustancialmente el mismo”, como se utiliza en el presente documento, denota un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador), de manera que un experto en la técnica consideraría si la diferencia entre los dos valores tiene poca o ningún significado biológico o estadístico en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de K_d). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menos de aproximadamente el 50 %, menos de aproximadamente el 40 %, menos de aproximadamente el 30 %, menos de aproximadamente el 20 %, y/o menos de aproximadamente el 10 % en función del valor de la referencia/comparador.

La frase “sustancialmente reducido” o “sustancialmente diferente”, como se utiliza en el presente documento denota un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparadora) de manera que un experto en la técnica consideraría si la diferencia entre los dos valores tiene una significación estadística en el contexto de la característica biológica que se mide por dichos valores (por ejemplos, valores de K_d). 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/o mayor de aproximadamente el 50 % en función del valor de referencia/comparador.

“Purificado” significa que una molécula está presente en una muestra en una concentración de al menos un 95 % por peso, o al menos un 98 % por peso de la muestra en la que está contenida.

Una molécula de ácido nucleico “aislado” es una molécula de ácido nucleico que está separada de al menos otra molécula de ácido nucleico con la que está habitualmente asociada, por ejemplo, en su entorno natural. Una molécula de ácido nucleico aislada incluye además una molécula de ácido nucleico contenida en células que habitualmente expresan la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

El término “vector” como se utiliza en el presente documento, se pretende que se refiera 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 de doble cadena circular en el que se han ligado segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector fago. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que los segmentos adicionales de ADN se pueden ligar en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de la replicación autónoma en la célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped al introducirse en la célula huésped, y de esta manera se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los que están unidos operativamente. Se hace referencia a dichos vectores como “vectores de expresión recombinante”, o simplemente, “vectores de expresión”. En general, los vectores de expresión con utilidad en las técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” se pueden utilizar de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma utilizada más comúnmente de vector.

“Polinucleótido” o “ácido nucleico”, como se utiliza de manera intercambiable en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero por la ADN o ARN polimerasa o por 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 del nucleótido se puede realizar antes o después del ensamblar el polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede comprender modificaciones hechas tras la síntesis, tales como la conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “capuchones”, sustitución de uno o más nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleótido tales como, por ejemplo, las que tienen uniones sin carga (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), los que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-lisina, etc.), los que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.) los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), los que contienen alquilantes, los que tienen uniones modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anómicos, etc.), así como las formas no modificadas de los polinucleótidos. Además, se pueden sustituir cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los azúcares, por ejemplo por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores convencionales, o activados para preparar uniones adicionales con nucleótidos adicionales, o se pueden conjugar con soportes sólidos o semi-sólidos. El OH del extremo 5' o 3' se puede fosforilar o sustituir con aminas o restos orgánicos del grupo de protección con capuchón de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivarse a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que se conocen en general en la técnica, que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclica, azúcar α -anómicos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosa,

azúcares furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos, y análogos de nucleósidos básicos tales como metil ribósido. Se pueden sustituir uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos, incluyen, pero no se limitan a, las realizaciones en las que el fosfato se sustituye 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 no sustituido (1-20 C) que contienen opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido tienen que ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento, que incluyen el ARN y ADN.

"Oligonucleótido" como se utiliza en el presente documento se refiere a polinucleótidos cortos, generalmente de cadena sencilla, generalmente sintéticos que en general 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 igualmente y completamente aplicable a los oligonucleótidos.

El término "Smo" o "SMO" como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier SMO nativo de cualquier origen vertebrado, incluyendo de mamíferos tales como los primates (por ejemplo, los seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos de que se indique otra cosa. El término engloba el SMO de "longitud completa", sin procesar así como cualquier forma de SMO que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes de SMO de origen natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas. "Smo mutante" como se utiliza en el presente documento se refiere a SMO que tienen una mutación en la parte del extremo carboxilo de la transmembrana 6 de SMO en la posición 473 del SMO humano.

Como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones tales como "tratar" o "tratando") se refiere a una intervención clínica en un intento para alterar el curso natural del individuo o célula que se va a tratar, se puede llevar a cabo para la profilaxis o durante el curso de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la prevención de que ocurra o recurra la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejoría o paliación del estado de enfermedad, y remisión o mejor pronóstico. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se utilizan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno o enlentecer 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 (tales como vacas), animales deportivos, mascotas (tales como gatos, perros, y caballos), primates, ratones y ratas. En ciertas realizaciones, un mamífero es un ser humano.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está de tal manera que permite la actividad biológica del ingrediente activo que va a ser eficaz, y que no contiene componentes adicionales que son inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación. Dichas formulaciones pueden ser estériles.

Una formulación "estéril" es aséptica o libre de cualquier microorganismo vivo y sus esporas.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, con dosificaciones y por periodos 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 el estado de enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula, que da lugar a una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz engloba una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula se supera por los efectos beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, como la dosis profiláctica se utiliza en sujetos antes o en un estadio temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

La expresión "agente citotóxico" como se utiliza en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o evita una función celular y/o produce muerte o destrucción celular. La expresión pretende que incluya isótopos radioactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹², e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes de intercalación, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluyen fragmentos y/o variantes de las mismas, y los distintos agentes antitumorales o anticáncer desvelados posteriormente. Otros agentes citotóxicos se describen posteriormente. Un agente tumoricida produce 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. Ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquil sulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (que incluye el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escoplectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enedina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omega11 (véase, por ejemplo, Nicolaou et al., *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor oral de alfa-4 integrina; dinemicina, incluyendo dinemicina A; una espiamicina; así como cromóforo neocarzinostatina y cromoproteínas relacionadas con cromóforos antibióticos), aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinopfilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMICINA®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección liposómica de doxorubicina HC1 (DOXIL®), doxorubicina TLC D-99 liposómica (MYOCET®), doxorubicina liposómica pegilada (CAELYX®), y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELO-DA®), una epotilona, y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de la pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; recargador de ácido fólico tal como ácido froilínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; di-azicuaona; elformitina; acetato de eliptino; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK® complejo polisacárido (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2'-triclorotrietil-amina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas de paclitaxel modificadas 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 evitan la polimerización de tubulina para formar microtúbulos que incluyen vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorin; novantrona; edatraxato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, incluyendo bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095 ácido, zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®), o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un 1,3-análogo dioxolano del nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes de rutas de señalización implicados 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 vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rrmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inhibidor de la COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosoma (por ejemplo, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersen sódico (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR (véase la definición posterior); inhibidores de la tirosina cinasa (véase la definición posterior); inhibidores de la serina-treonina cinasa tales como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); inhibidores de la farnesil transferasa tales como lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura de terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOYATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

Los agentes quimioterápicos como se definen en el presente documento incluyen "agentes hormonales" o "agentes terapéuticos endocrinos" que actúan para regular, bloquear, o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer. Pueden ser hormonas propiamente, incluyendo pero sin limitarse a: anti-estrógenos con un perfil mixto agonista/antagonista, que incluyen tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, keoxifeno, y moduladores del receptor estrogénico (SERM) tal como SERM3, anti-estrógenos puros sin propiedades agonistas, tales como fulvestrant (FASLODEX®), y EM800 (dichos agentes pueden bloquear la dimerización del receptor estrogénico (ER), inhibir la unión de ADN, aumento de renovación de ER, y/o suprimir los niveles de ER); inhibidores de la aromatasa, que incluye los inhibidores de la aromatasa esteroideas tales como formestano y exemestano (AROMASIN®), e inhibidores de la aromatasa no esteroideas tales como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de aromatasa que incluyen vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol, y 4(5)-imidazoles; agonista de la hormona liberadora de hormona luteinizante, que incluyen leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, buserelina, y tripterelina; esteroides sexuales, que incluyen progestinas tales como acetato de megestrol y medroxiprogesterona, estrógenos tales como dietilestilbestrol y premarina y andrógenos/retinoides tales como fluoximesterona, todos los ácidos transretinoicos y fenretinida; onapristona, antiprogesteronas; reguladores negativos del receptor estrogénico (ERD), anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida, y sales, ácidos farmacéuticamente aceptables o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se utiliza 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) sea *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células (tales como una células que expresa SMO) en fase S. Ejemplos de los agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio distinto de la fase S), tal como agentes que incluyen la detención en la fase G1 y la detención en fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también se implican en la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Se puede encontrar información adicional en Mendelsohn y Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, Chapter 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), por ejemplo, p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticáncer que se derivan ambos 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 docetaxel promueve el ensamblaje de los microtubos de dímeros de tubulina y estabiliza los microtúbulos evitando la despolimerización que resulta en la inhibición de la mitosis en las células.

Un "antagonista de Smo mutante" es un compuesto que inhibe la actividad biológica de un SMO que tiene una sustitución de aminoácido en la posición 473 del SMO humano que cambia el ácido aspártico del tipo silvestre en esta posición por otro aminoácido. La actividad del SMO es la capacidad de transducir una señal mediante la estimulación con hedgehog para la activación del factor de transcripción Gli.

I. Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos de la invención incluyen secuencias aisladas que codifican SMO mutantes. Los ácidos nucleicos comprenden una secuencia que es al menos idéntica en un 80 % con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3 y que contiene al menos una mutación en esta secuencia para codificar cualquier aminoácido en la posición 473 distinto de ácido aspártico (D). En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica una histidina (H), glicina (G), fenilalanina (F), tirosina (Y), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), serina (S), treonina (T), metionina (M), glutamina (Q) o asparagina (N) en la posición 473. En algunas realizaciones, el ácido nucleico tiene al menos una mutación en el SMO tipo silvestre parental en el nucleótido 1417, 1418 y/o 1419. En algunas realizaciones, el porcentaje de identidad es del 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con SEQ ID NO: 3 siempre que haya al menos una mutación en la posición 1417, 1418 y/o 1419. La invención también contempla fragmentos de dichos ácidos nucleicos que abarcan la región de las mutaciones descritas anteriormente en fragmentos que tienen al menos una longitud de 100 nucleótidos. Los fragmentos pueden ser de cualquier longitud que abarque la región de las mutaciones descritas anteriormente hasta la molécula de ácido nucleico que codifica el SMO mutante de longitud completa. El mutante SMO aislado y fragmentos del mismo se pueden utilizar, 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 (tales como para generar la proteína SMO mutante o partes de la misma para utilizarlos como inmunógenos y para su uso en ensayos de la invención como se describe en el presente documento).

La invención proporciona sondas de ácido nucleico que se pueden utilizar para identificar la molécula de ácido nucleico SMO mutante en los métodos de la invención. Las muestras de ácido nucleico derivados de un tejido sospechoso de tener una SMO mutante o de un tejido donde el estado de SMO es desconocido se pueden cribar utilizando una sonda específica para SMO mutante utilizando procedimientos convencionales, tal como se describe en Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory Press,

NY, 1989). De manea alternativa, el ácido nucleico que codifica el SMO se puede amplificar a partir del tejido e hibridarse con una sonda específica de la invención para determinar la presencia o ausencia de SMO mutante. La metodología PCR se conoce bien en la técnica (Sambrook et al., *supra*; Dieffenbach et al., PCR PRIMER: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1995).

Las secuencias de nucleótidos (o su complementaria) que codifica SMO mutante tienen varias aplicaciones en las técnicas de biología molecular, que incluyen los usos como sondas de hibridación, y en la generación de sondas ARN y ADN antisentido. El ácido nucleico que codifica SMO mutante también será útil para la preparación de polipéptidos SMO mutantes por las técnicas recombinantes descritas en el presente documento, en las que los polipéptidos SMO mutantes pueden utilizarse, por ejemplo, en la preparación de anticuerpos anti-SMO mutantes como se describe en el presente documento.

Los ácidos nucleicos SMO mutantes de longitud completa, o partes de los mismos, se pueden utilizar como sondas de hibridación para identificar SMO mutantes.

Opcionalmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación se pueden derivar del al menos la región mutante de la secuencia de nucleótidos del SMO mutante de longitud completa.

A modo de ejemplo, un método de cribado comprenderá el aislamiento de la región codificante del SMO mutante utilizando la secuencia conocida de ADN para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Las sondas de hibridación se pueden marcar con varios marcadores, incluyendo radionúclidos tales como ^{32}P o ^{35}S , o marcadores enzimáticos tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda o medio de sistemas de acoplamiento avidina/biotina. Las sondas marcadas que tienen una secuencia complementaria a la del gen SMO mutante de la presente invención se pueden utilizar para cribar bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico o ARNm para determinar qué miembros de dichas bibliotecas se hibridan con la sonda. Los productos de la hibridación se pueden re-disolver en geles de poliacrilamida. Además, las mutaciones SMO se pueden determinar utilizando el método descrito en los Ejemplos. Las condiciones de hibridación, incluyen las de rigurosidad moderada y de alta rigurosidad, como se proporciona en Sambrook et al., *supra*.

Las secuencias identificadas en dichos métodos de cribado de la biblioteca se pueden comparar y alinear con secuencias conocidas de SMO y SMO mutante. La identidad de secuencia en la región del extremo carboxilo del dominio transmembrana 6 se puede determinar utilizando métodos conocidos en la técnica

Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos que codifican el SMO incluyen oligonucleótidos antisentido y en sentido que comprenden una secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla (sea ARN o ADN) capaz de unirse a secuencias de ARNm SMO mutante diana (en sentido) o al ADN SMO mutante (antisentido). Los oligonucleótidos antisentido o en sentido, de acuerdo con la presente invención, comprenden un fragmento de la región codificante del ADN SMO mutante que contiene la región de la mutación. Dicho fragmento comprende en general al menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferentemente aproximadamente de 14 a 30 nucleótidos. La capacidad para derivar un oligonucleótido antisentido o en sentido, basándose en la secuencia de ADNc que codifica una determinada proteína se describe, por ejemplo, en Stein y Cohen (1988) Cancer Res. 48: 2659 y van der Krol et al. (1988) BioTechniques 6: 958.

La unión de oligonucleótidos antisentido o en sentido a las secuencias de ácido nucleico diana da como resultado la formación de dúplex que bloquean la transcripción o traducción de la secuencia diana por uno o varios medios, que incluyen el aumento de la degradación de los dúplex, terminación prematura de la transcripción o traducción, o por otros medios. Dichos métodos se engloban en la presente invención. Se pueden utilizar oligonucleótidos antisentido, por lo tanto, para bloquear la expresión de proteínas SMO mutantes, en las que las proteínas SMO mutantes pueden tener un papel en la resistencia del cáncer en mamíferos a los quimioterápicos tales como GDC-0449. Los oligonucleótidos antisentido o en sentido comprenden adicionalmente oligonucleótidos que tienen armazones de azúcar-fosfodiéster modificados (u otros enlaces de azúcares, tales como los que se describen en el documento WO 91/06629) y en los que dichos enlaces de azúcares son resistentes a las nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con enlaces de azúcares resistentes son estables *in vivo* (es decir, son capaces de resistir la degradación enzimática) pero mantienen la especificidad de secuencia para ser capaces de unirse a las secuencias de nucleótidos diana.

Ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos útiles para inhibir la expresión de proteínas SMO mutantes incluyen los oligonucleótidos que contienen armazones modificados o enlaces internucleósido no naturales. Los oligonucleótidos que tienen armazones modificados incluyen los que mantienen un átomo de fósforo en el armazón y los que no tienen un átomo de fósforo en el armazón. Para los fines de la presente memoria descriptiva, y como se hace referencia a veces en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su armazón internucleótido también se puede considerar que son oligonucleósidos. Los armazones de oligonucleótidos preferidos incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos incluyendo 3'-alquileo fosfonatos, 5' alquileo fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforoamidatos incluyendo 3'-amino

fosforoamidato y aminoalquilofosforoamidatos, tionofosforoamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos unidos 2'-5' de los mismos y los que tienen polaridad invertida en los que uno o más enlaces internucleótido es un enlace 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Los oligonucleótidos preferidos tienen una polaridad invertida que comprende un enlace 3' a 3' en el enlace internucleótido más 3' es decir un único resto de nucleósido invertido que puede ser abásico (se ha perdido la nucleobase o tiene un grupo hidroxilo en su lugar) También se incluyen sales distintas, mezcla de sales y formas ácidas libres. Las Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de enlaces que contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de EE. UU. N° 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; 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.

Los armazones de oligonucleótido preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos tienen armazones que se forman por enlaces internucleósidos de cadenas alquilo o cicloalquilo cortas, heteroátomos mezclados y enlaces internucleósido alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósido de cadenas cortas heteroatómicas o heterocíclicas. Estas incluyen las que tienen enlaces morfolino (formados en parte por la parte de azúcar de un nucleósido), armazones de siloxano; armazones sulfuro, sulfóxido y sulfona; armazones de formacetilo y tioformacetilo, armazones de metileno formacetilo y tioformacetilo, armazones de riboacetilo, armazones que contienen alqueno; armazones sulfamato, armazones metilenoimino y metilenoimidazina, armazones sulfonato y sulfonamida, armazones amida, y otros que tienen partes sub-componentes N, O, S y CH. Las Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos oligonucleósidos incluyen pero no se limitan a: Las Patentes de EE. UU. N°: 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; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.792.608; 5.646.269 y 5.677.439.

En otros oligonucleótidos antisentido preferidos, tanto en el enlace azúcar como el internucleósido, es decir, el armazón, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos nuevos. Las unidades básicas se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácido nucleico diana adecuado. Se hace referencia a uno de dichos compuestos oligoméricos, un oligonucleótido mimético que ha demostrado que tiene excelentes propiedades para la hibridación, como ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos PNA, el armazón de azúcar de un oligonucleótido se sustituye con un armazón que contiene una amida, en particular un armazón aminoetilglicina. Las nucleobases se mantienen y se unen directa o indirectamente a los átomos aza nitrógeno de la parte amida del armazón. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan sobre la preparación de compuestos PNA incluyen, pero no se limitan a, Patentes de EE. UU. N°: 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Enseñanzas adicionales de compuestos PNA se pueden encontrar en Nielsen et al. (1991) Science 254: 1497-1500.

Los oligonucleótidos antisentido preferidos incorporan armazones fosforotioato y/o armazones heteroatómicos, y en particular -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- (conocido como armazón metileno (metilimino) o MMI), -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- (en el que el armazón fosfodiéster se representa como -O-P-O-CH₂-) descrito en la Patente de EE. UU. a la que se hace referencia anteriormente N°: 5.489.677, y los armazones amida de la Patente de EE. UU. a la que se hace referencia anteriormente N° 5.602.240. También se prefieren los oligonucleótidos que tienen estructuras armazón de morfolino de la Patente de EE. UU a la que se ha hecho referencia anteriormente N° 5.034.506.

Los oligonucleótidos modificados pueden contener también sustituidos uno o más restos de azúcar. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-alquilo, S-alquilo, O-alqueno, S-alqueno, o N-alqueno; O-alquino, S-alquino o N-alquino, o O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, alqueno y alquino se pueden sustituir o no sustituir de C a C10 alquilo o de C2 a C10 alqueno y alquino. Particularmente preferidos son 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 nucleótidos antisentido preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C1 a C10 alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alquino, alquino, 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 tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye el 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 alcóxialcoxilo. Una modificación preferida adicional incluye 2'-dimetilaminoetoxietoxi, es decir un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos del presente documento posteriormente, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂).

Una modificación preferida adicional incluye los Ácidos nucleicos bloqueados (LNA) en las que el grupo 2'-hidroxilo se une al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcar formando de esta manera un resto de azúcar bicíclico. El enlace es preferentemente un grupo metileno (-CH₂)_n que forma un puente con 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 describe en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxilo (2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxilo (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-alilo (2'-CH₂-CH=CH₂), 2'-O-alilo (2'-O-CH₂-CH=CH₂) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación 2' puede estar en la posición arabino (arriba) o la posición ribo (abajo). Una modificación 2'-arabino preferida es 2'-F. Se pueden hacer también modificaciones similares en otras posiciones del oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en oligonucleótidos unidos 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar de la pentafricanosil azúcar. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de EE. UU. N°: 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 de nucleobases (a menudo se hace referencia en la técnica simplemente como "base"). Como se utiliza en el presente documento, nucleobases "sin modificar" o "naturales" incluyen las bases purínicas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propil otros derivados alquilo de adenina y guanina, 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 alquilo de bases pirimidínicas, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uracilos y citosinas 5-sustituidas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Nucleobases modificadas adicionalmente incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazina-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazina-2(3H)-ona), G-fijaciones tales como fenoxazina 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), piridoindol citidina (H-pirido[3,2': 4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las nucleobases modificadas pueden incluir también las que tienen sustituidas la base purínica o pirimidínica con otros heterociclos, por ejemplo, 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Nucleobases adicionales incluyen las desveladas en la Patente de EE. UU. N° 3.687.808, las que se desvelan en THE CONCISE ENCYCLOPEDIA OF POLYMER SCIENCE AND ENGINEERING, Kroschwitz, J.I., ed., John Wiley & Sons, 1990, pp. 858-859, y las que desvelan Englisch et al., ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION, Wiley-VCH, Alemania, 1991, 30: 613. Ciertas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Estos incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Las sustituciones 5-metilcitosina han demostrado que aumentan la estabilidad de los dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C. (Sanghvi et al. ANTISENSE RESEARCH AND APPLICATIONS, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y se prefieren sustituciones de bases, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietil azúcar. Patentes de EE. UU. representativas que enseñan la preparación de las nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a: Patente de EE. UU. N° 3,687,808, así como las Patentes de EE. UU. N°: 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 antisentido es la unión químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que aumentan la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Los compuestos de la invención puede incluir grupos conjugados unidos covalentemente a los grupos funcionales tal como los grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la invención incluyen intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que aumentan las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros, y grupos que aumentan las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos de conjugados típicos incluyen colesterol, lípidos, lípidos catiónicos, fosfolípidos, fosfolípidos catiónicos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Grupos que aumentan las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de la presente invención incluyen grupos que mejoran la captación del oligómero, mejoran la resistencia de oligómeros a la degradación, y/o fuerte hibridación específica de secuencia con ARN. Los grupos que aumentan las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de la presente invención incluyen grupos que mejoran la captación del oligómero, la distribución, metabolismo o excreción. Los restos conjugados incluyen, pero no se limitan a restos de lípido, 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 de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al. (1991) EMBOJ. 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 trietil-amonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato (Manoharan et al. (1995) Tetrahedron Lett. 36: 3651-3654; Shea et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18: 3777-3783), una cadena de poliamina o un 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 palmitil (Mishra et al. (1995) Biochim. Biophys. Acta 1264: 229-237), o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la invención también se pueden conjugar con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazina, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Los conjugados de oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en las Patentes de EE. UU. N°: 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 que un determinado compuesto esté modificado uniformemente en todas las posiciones, y de hecho más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente se pueden incorporar en un único compuesto o incluso en un único nucleósido en un oligonucleótido. La presente invención también incluye compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras" en el contexto de la presente invención, son compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones distintas químicamente, cada una compuesta por al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen al menos una región en la que se modifica el oligonucleótido de manera que le confiere al oligonucleótido un aumento de resistencia a la degradación por nucleasas, aumento de la captación celular, y/o un aumento de la afinidad por el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como un sustrato para las enzimas capaces de escindir híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de la RNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión de un ARN diana, aumentando mucho de esta manera la eficacia de la inhibición de la expresión génica del oligonucleótido. En consecuencia, se pueden obtener a menudo resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se utilizan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con los desoxioligonucleótidos fosforotioato que se hibridan con la misma región diana. Los compuestos antisentido quiméricos de la invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, miméticos de oligonucleósidos y/u oligonucleótidos, como se han descrito anteriormente. Los oligonucleótidos antisentido quiméricos preferidos incorporan al menos un azúcar modificado en 2' (preferentemente 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el extremo 3' para conferir resistencia a nucleasas y una región con al menos 4 azúcares 2'-H contiguos para conferir la actividad RNasa H. También se hace referencia a dichos compuestos en la técnica como híbridos o gámperos. Los gámperos preferidos tienen una región de azúcares modificados en 2' (preferentemente 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el extremo 3' y en el extremo 5' separados por al menos una región que tiene al menos 4 azúcares 2'-H contiguos y preferentemente incorpora uniones de armazón fosforotioato. Las Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan en la preparación de dichas estructuras híbridas incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de EE. UU. N°: 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 antisentido que se utilizan de acuerdo con la presente invención pueden producirse conveniente y rutinariamente mediante la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipamiento para dicha síntesis se vende en varios proveedores que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Se pueden utilizar adicional y alternativamente cualquier otro medio para dicha síntesis que se conozca en la técnica. Se sabe bien que el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los derivados fosforotioato y alquilados. Los compuestos de la invención pueden también mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otra manera con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas al receptor, formulaciones oral, rectal, tópica u otras formulaciones para ayudar a la captación, distribución y/o absorción. Las Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan en la preparación de dichas estructuras híbridas incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de EE. UU. N°: 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.

Otros ejemplos de oligonucleótidos en sentido y antisentido 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 de los oligonucleótidos por una secuencia de ácido nucleico diana, tal como poli-(L-lisina). Aún más, se pueden unir agentes intercalantes, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos a los oligonucleótidos antisentido para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido en sentido o antisentido por la secuencia de nucleótido diana.

Los oligonucleótidos antisentido y en sentido pueden introducirse en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana por cualquier método de transferencia génica, que incluye, por ejemplo, transfección de ADN

mediada por CaPO_4 , electroporación, o utilizando vectores de transferencia génica tales como virus de Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, se inserta un oligonucleótido antisentido o en sentido en un vector retroviral adecuado M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o vectores de copia doble denominados DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase el documento WO 90/13641).

5 Los oligonucleótidos antisentido o en sentido también se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de nucleótido diana por la formación de un conjugado con una molécula de unión al ligando, como se describe en el documento WO 91/04753. Las moléculas de unión al 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 los receptores de la superficie celular. Preferentemente, la conjugación de la molécula de unión al ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión al ligando para unirse a su molécula o receptor correspondiente, o bloquear la entrada del oligonucleótido en sentido o antisentido o su versión conjugada en la célula.

15 De manera alternativa, un oligonucleótido en sentido o antisentido puede introducirse en una célula que contenga la secuencia de ácido nucleico diana por la formación de un complejo oligonucleótido-lípido, como se describe en el documento WO 90/10448. El complejo oligonucleótido en sentido o antisentido-lípido se disocia preferentemente en la célula por una lipasa endógena.

20 Las moléculas de ARN o ADN antisentido o en sentido generalmente tienen al menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, de manera 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 los que en el presente contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de nucleótido a la que se hace referencia más o menos un 10 % de esa longitud a la que se hace referencia.

30 Las secuencias de nucleótido que codifican un SMO mutante también se pueden utilizar para construir sondas de hibridación para mapear el gen que codifica esa SMO y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótido que se proporcionan en el presente documento pueden mapearse en un cromosoma y en regiones específicas de un cromosoma utilizando técnicas conocidas, tales como hibridación *in situ*, análisis de unión con marcadores cromosómicos conocidos y cribado por hibridación con bibliotecas.

35 Un potencial antagonista del SMO mutante es una construcción de ARN o ADN antisentido que se prepara utilizando tecnología antisentido, en la que, por ejemplo, una molécula de ARN o ADN actúa bloqueando directamente la traducción de ARNm hibridándose con un ARNm dirigido y evitando la traducción de la proteína. Se puede utilizar una tecnología antisentido para controlar la expresión génica por medio de la formación de una hélice triple o un ADN o ARN antisentido, ambos métodos se basan en la unión de un polinucleótido al ADN o ARN. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican el SMO mutante en el presente documento, se utilizan para diseñar un oligonucleótido ARN de desde aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Un oligonucleótido de ADN se diseña para que sea complementario a la región del gen implicado en la transcripción (hélice triple – 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 esta manera la transcripción y la producción de SMO mutantes. El oligonucleótido ARN antisentido se hibrida al ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en mutantes SMO (Okano (1991) Neurochem. 56: 560); OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION, CRC Press, Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también se pueden suministrar a las células de manera que el ARN o ADN antisentido se pueda expresar *in vivo* para inhibir la producción de SMO mutante. Cuando se utiliza el ADN antisentido, se prefieren los oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo entre -10 y +10 posiciones de la secuencia de nucleótido del gen diana.

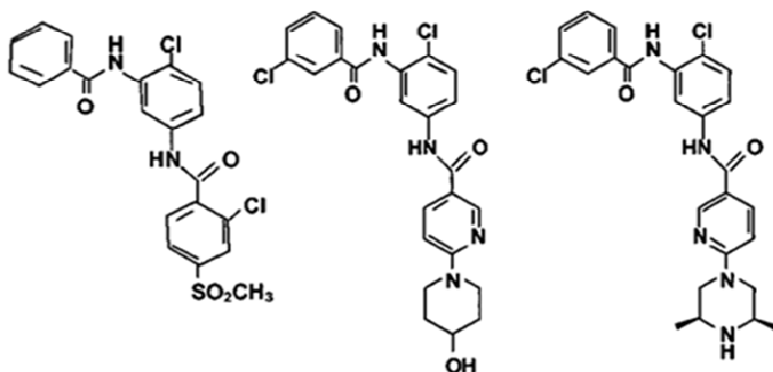
Los potenciales antagonistas de SMO mutantes incluyen moléculas pequeñas que se unen al sitio ocupado por el GDC-0449 en el SMO de tipo silvestre, bloqueando de esta manera la actividad biológica del SMO mutante. Ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, péptidos pequeños o moléculas tipo péptido, preferentemente péptidos solubles, y compuestos inorgánicos u orgánicos no peptídicos sintéticos.

60 Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar la escisión específica de ARN. Las ribozimas actúan por hibridación específica de secuencia con el ARN diana complementario, seguido por escisión endonucleolítica. Los sitios de escisión específicos de ribozima con un potencial ARN diana se pueden identificar por técnicas conocidas. Para más detalles, véase, por ejemplo, Rossi (1994) Current Biology, 4: 469-471, y publicación PCT N° WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

65 Las moléculas de ácido nucleico con una formación de triple hélice que se utilizan para inhibir la transcripción debería ser de cadena sencilla y estar compuestas por desoxinucleótidos. La composición básica de estos oligonucleótidos se diseña de manera que promueva la formación de triple hélice por medio de las reglas de

emparejamiento básico de Hoogsteen, que en general necesita tramos considerables de purinas o pirimidinas en una cadena del dúplex. Para más detalles véase, por ejemplo, la Publicación PCT N° WO 97/33551, *supra*.

Estas moléculas pequeñas se pueden identificar por uno cualquiera o más de los ensayos de cribado expuestos anteriormente en el presente documento y/o por cualquier otra técnica de cribado bien conocida por los expertos en la técnica. Ejemplos de moléculas pequeñas que se pueden utilizar como antagonistas de SMO mutante son compuestos que tienen las siguientes fórmulas estructurales:



Fórmula I

Fórmula II

Fórmula III

II. Proteínas

La invención proporciona proteínas SMO mutantes aisladas. La SMO humana de tipo silvestre se muestra en SEQ ID NO: 1. La SMO mutante humana se muestra en SEQ ID NO: 2 en la que el aminoácido 473 se muestra como "X", con respecto a la presente solicitud sirve para cualquier aminoácido distinto de ácido aspártico (D). En algunas realizaciones, la X es histidina (H), glicina (G), fenilalanina (F), tirosina (Y), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), serina (S), treonina (T), metionina (M), glutamina (Q) o asparagina (N). La SMO mutante y los fragmentos de la misma se pueden producir en sistemas recombinantes como se conoce bien en la técnica utilizando los ácidos nucleicos SMO descritos en el presente documento. Dichos ácidos nucleicos se pueden incorporar en vectores de expresión como se sabe bien en esa técnica y se transfectan en células huésped, que pueden ser células procariotas o eucariotas dependiendo del uso propuesto para la proteína. La mutante SMO de longitud completa o los fragmentos (en los cuales los fragmentos contienen al menos la parte del extremo carboxilo del dominio transmembrana 6 y el aminoácido 473 de SEQ ID NO: 2) se puede utilizar como inmunógenos para producir los anticuerpos de la invención.

III. Anticuerpos

A. Anticuerpos anti-SMO mutante

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que se unen al 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 fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, o F(ab')₂. En una realización, un anticuerpo anti-SMO mutante es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una realización, un anticuerpo anti-SMO está purificado. En ciertas realizaciones, una composición es una formulación farmacéutica para el tratamiento del cáncer.

1. Fragmentos de anticuerpo

La presente invención engloba fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo se pueden generar por medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o por técnicas recombinantes. En ciertas circunstancias existen ventajas en la utilización de fragmentos de anticuerpo, más que anticuerpos completos. El tamaño menor de los fragmentos permite un aclaramiento rápido y puede dar lugar a un acceso mejor a tumores sólidos. Para revisar ciertos fragmentos de anticuerpo, véase Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9: 129-134.

Se han desarrollado distintas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente estos fragmentos se derivaron por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical y Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); y Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv se pueden expresar y secretar a partir de *E. coli*, permitiendo por lo tanto la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpos expuestas anteriormente. de manera alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al.,

Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otra estrategia, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente de un cultivo de células huésped recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ con un aumento de la semivida *in vivo* que comprenden restos de unión al epítipo del receptor silvestre se describen en la Patente de EE. UU. N° 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán aparentes para el facultativo experto. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase el documento WO 93/16185; Pat. de EE. UU. N° 5.571.894; y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; por lo tanto, pueden ser adecuados para la reducción de la unión no específica en su uso *in vivo*. Las proteínas de fusión scFv se pueden construir para que se produzca la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxilo de un scFv. Véase *Antibody, Engineering*, ed. Borrebaeck, *supra*. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Pat. de EE. UU. N° 5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

2. Anticuerpos humanizados

La invención engloba anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica distintos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácidos introducidos en el mismo de una fuente que es no humana. Se hace referencia a menudo a estos restos de aminoácidos no humanos como restos "importados", que normalmente se escogen de un dominio variable "importado". La humanización puede llevarse a cabo, 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 la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de EE. UU. N° 4.816.567) en la que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanizados en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos FR se sustituyen por restos de los sitios análogos de anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a utilizar en la producción de anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a la biblioteca completa de secuencias del dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que está más cercana a la del roedor se acepta como la región marco conservada humana del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151: 2296; Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901. Otro método utiliza una región marco conservada derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un particular subgrupo de cadenas ligeras o pesadas. Se puede utilizar la misma región marco conservada para varios diferentes anticuerpos humanizados. Véase, por ejemplo, Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285; Presta et al. (1993) *J. Immunol.*, 151: 2623.

En general es deseable adicionalmente que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, de acuerdo con un método, los anticuerpos humanizados se preparan por un proceso de análisis de las secuencias parentales y destinos producto humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están disponibles comúnmente y son familiares para los expertos en la técnica. Hay disponibles programas de computadora que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel más probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que tienen influencia en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos FR se pueden seleccionar y combinar de entre las secuencias receptoras e importadas, de manera que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como aumento de afinidad por el antígeno(s) 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 se pueden construir combinando secuencias del dominio variable clónicas Fv que se seleccionan de las bibliotecas de fagos de presentación derivadas del ser humano con secuencias del dominio constante humanas conocidas como se ha descrito anteriormente. De manera alternativa, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden producir por el método de hibridoma. Las líneas celulares del mieloma humano y el heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito, por ejemplo, por Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

Actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, al inmunizarlos, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas

endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión (JH) de la cadena pesada de anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de matrices de genes de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos en el desafío antigénico. 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).

La redistribución génica también se puede utilizar para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo, roedores, en los que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este método, que también se llama "imprimación de epítipo", cualquier región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido por técnicas de fago de presentación como se describe en el presente documento se sustituye con un repertorio de genes del dominio V humano, creando una población de quimeras scFv o Fab de cadena humana/cadena no humana. La selección con el antígeno da como resultado el aislamiento de quimeras de cadenas de scFv o Fab no humanas/humanas en las que la cadena humana restaura el sitio de unión al antígeno destruido al eliminar la correspondiente cadena no humana en el clon primario de fago de presentación, es decir, el epítipo gobierna (imprime) la elección de la pareja de la cadena humana. Cuando se repite el proceso con el fin de sustituir la cadena no humana que se mantiene, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). Al contrario que con la humanización tradicional de anticuerpos no humanos por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos de FR o CDR de origen no humano.

4. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para 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 para cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de SMO. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para posicionar agentes citotóxicos en las células que expresan SMO. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a SMO y un brazo que se une a un agente citotóxico, tal como, por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloide de la vinca, cadena de ricino A, metotrexato o un hapteno de un isótopo radioactivo. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena ligera-cadena pesada, en las que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature, 305: 537 (1983)). Debido a la disposición aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de los que solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace habitualmente por etapas de cromatografía de afinidad, es más engorrosa, y los rendimientos del 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 una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a las secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con el dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, regiones CH₂, y CH₃. En ciertas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CH₁), que contiene el sitio necesario para la unión con la cadena ligera, está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión por separado, y se co-transfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que se utilizan relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas en la construcción que proporciona los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes para dos o tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos, o cuando las proporciones no tienen una particular significancia.

En una realización de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad) en el otro brazo. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Esta estrategia se desvela en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

De acuerdo con otra estrategia, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo se puede modificar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La interfaz comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, se sustituye una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácido de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo con cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena(s) lateral grande se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales grandes de aminoácidos con otras pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero por encima de otros productos finales no deseados tales como los homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario contra células no deseadas (Patente de EE. UU. N° 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden producir por cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes de entrecruzamiento adecuados se conocen bien en la técnica, y se desvelan en la Patente de EE. UU. N° 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

Las técnicas de generación de anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo también están descritas en la bibliografía. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando una unión química. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden de manera proteolítica para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia de agente de formación de complejos ditiol arsenito sódico para estabilizar los ditiolos vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierten entonces en el Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TMB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos que se producen se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

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

También se han descrito distintas técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpo Ig específicos directamente de un cultivo celular recombinante. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se han producido utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos con cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a la partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se re-oxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método se puede utilizar también para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrito por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para producir fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios VH y VL complementarios de otro fragmento, formando de esta manera dos sitios de unión al antígeno. Otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpo biespecíficos por el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (scFv) también se han expuesto. Véase Gruber et al., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

5. Anticuerpos multivalentes

Se puede internalizar un anticuerpo multivalente (y/o catabolizar) más rápidamente que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que 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 al antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente por la expresión recombinante de 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 al antígeno. En ciertas realizaciones, el dominio de dimerización comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho sitios de unión al antígeno. En una de dichas realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) cuatro sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (por ejemplo, dos cadenas polipeptídicas), en las que la cadena(s) polipeptídica comprende dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena(s) polipeptídica puede

comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, en las 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(s) polipeptídica puede comprender VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1- cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente del presente documento, puede comprender, por ejemplo, desde aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de cadena ligera que se contemplan aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprende además un dominio CL.

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 un polipéptido de cadena sencilla que comprende toda o una parte del dominio variable de cadena pesada o toda o una parte del dominio variable de 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 EE. UU. N° 6.248.516 B1). En una realización, el anticuerpo de dominio único consiste en todo o parte del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

7. Variantes de anticuerpo

En algunas realizaciones, se contemplan las modificaciones de secuencia de aminoácidos que se describen 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 anticuerpo se pueden preparar introduciendo cambios adecuados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de, y/o inserciones en, y/o sustituciones de, restos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede hacer cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo sujeto a la vez que se produce la secuencia.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denominan "mutagénesis de cribado de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) Science, 244: 1081-1085. Aquí, un resto o grupo de restos diana se identifican (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen con un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Estas localizaciones de aminoácidos que demuestran una sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan entonces introduciendo más u otras variantes, en, i para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, mientras que el sitio para la introducción de una variación de secuencia de aminoácidos se pre-determina, la naturaleza de la mutación per se no es necesario que se pre-determine. Por ejemplo, para analizar la actuación de una mutación en un sitio determinado, el cribado ala o la mutagénesis aleatoria se lleva a cabo en el codón diana o la región y la inmunoglobulina que se expresa se criba según la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones en el extremo amino o carboxilo que varían en longitud desde un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de un único, o múltiples restos de aminoácidos. Los ejemplos de las inserciones en los extremos incluyen un anticuerpo con un resto metionilo en el extremo N. Otras variantes de inserciones en la molécula de anticuerpo incluyen la fusión a los extremos N o C del anticuerpo con una enzima (por ejemplo, por ADEPT) o un polipéptido con aumentos de la semivida sérica del anticuerpo.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se altera para aumentar o disminuir la extensión en que el anticuerpo se glicosila. La glicosilación de polipéptidos es normalmente N-ligada, u O-ligada. N-ligada se refiere a la unión de un resto de carbohidrato en la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas 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 carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. La glicosilación O-ligada se refiere a la unión de una de los azúcares N-actilgalactosamina, galactosa, o xilosa, a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, aunque la 5-hidroxiprolina o la 5-hidroxilisina también se puede utilizar.

La adición o eliminación de sitios de glicosilación a un anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para los sitios de N-glicosilación) se crea o se elimina. La alteración también se puede producir por la adición, eliminación, o sustitución de uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de O-glicosilación).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido al mismo se puede alterar. Los anticuerpos nativos producidos por las células de mamífero comprenden normalmente un oligosacárido biantenarico ramificado

que generalmente se une por una ligadura N a ASn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright et al. (1997) TIBTECH 15: 26-32. El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa, y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención se puede hacer con el fin de crear variantes con ciertas propiedades mejoradas.

Por ejemplo, las variantes de anticuerpo que se proporcionan tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Dichas variantes pueden tener una función ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de EE. UU. N°: US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpo desfucosilados incluyen las células CHO Lec13 deficientes en fucosilación proteica (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); Solicitud de Patente de EE. UU. N° US 2003/0157108 A1, Presta, L; y documento WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares desactivadas génicamente (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4): 680-688 (2006); y el documento WO2003/085107).

Las variantes de anticuerpo se proporcionan además con oligosacáridos biseccionados, por ejemplo, en los que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo está biseccionado con GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una fucosilación reducida y/o una función ADCC mejorada. Ejemplos de dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); Patente de EE. UU. N° 6.602.684 (Umana et al.); y documento US 2005/0123546 (Umana et al.). Las variantes de anticuerpo con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc también se proporcionan. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener mejorada la función CDC. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); y 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 aún más la ADCC, por ejemplo, las 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 contempla una variante de anticuerpo que posee alguna pero no todas las funciones efectoras, que las hace candidatas deseables para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante ya que ciertas funciones efectoras (tal como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertas realizaciones, las actividades del Fc del anticuerpo se miden para asegurarse que solamente se mantiene las propiedades deseadas. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades CDC o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para asegurarse de que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por lo tanto probablemente carece de actividad ADCC), pero mantiene la capacidad de unirse a FcRn. Las células primarias que median ADCC, las células NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991). Ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en la Patente de EE. UU. N° 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I., et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83: 7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: Patente de EE. UU. N° 1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166: 1351-1361 (1987)). De manera alternativa, se pueden emplear métodos de ensayo no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACT1™ por citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y las células citolíticas naturales (NK). DE manera alternativa o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como los que se desvelan en Clynes et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 652-656 (1998). Los ensayos de unión a C1q se pueden llevar a cabo también para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemento, se puede llevar a cabo un ensayo CDC (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)). La unión a FcRn y las determinaciones del aclaramiento/semivida *in vivo* también se pueden llevar a cabo utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., Int'l. 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 por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero se contemplan también alteraciones de FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el título de "sustituciones

preferidas". Se proporcionan cambios más sustanciales, denominados "sustituciones a modo de ejemplo" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente posteriormente en referencia a las clases de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos se pueden introducir en un anticuerpo de interés y los productos cribados, por ejemplo, en cuanto a una actividad deseada tal como una unión al antígeno mejorada, un descenso de inmunogenicidad, mejora de ADCC o CDC, etc.

TABLA 1

Resto Original	Sustituciones a modo 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

Las modificaciones de la propiedades biológicas de un anticuerpo se puede conseguir seleccionando sustituciones que afectan (a) la estructura del armazón de 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 volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) no polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polar sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácido: Asp (D), Glu (E)
- (4) básico: Lys (K), Arg (R), His(H)

DE manera alternativa, los restos de origen natural se pueden dividir en grupos basándose en sus propiedades de cadenas laterales comunes:

- (1) hidrófobo: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilo neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácido: Asp, Glu;
- (4) básico: His, Lys, Arg;
- (5) restos que tienen influencia en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras que implican el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos también se pueden introducir en los sitios de sustitución conservadora o, en los sitios remanentes (no conservados).

5 Un tipo de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, las variantes resultantes que se seleccionan para posterior desarrollo tendrán propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) con respecto al anticuerpo parental del que se generan. Una variante de sustitución a modo de ejemplo es un anticuerpo de afinidad madura, que se puede generar convenientemente utilizando técnicas de maduración de afinidad basadas en fagos de presentación. En resumen, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada sitio. Los anticuerpos generados de esta manera se presentan a partir de partículas de fago filamentosos como fusiones con al menos una parte de la proteína de revestimiento del fago (por ejemplo, el producto M13 del gen III) empaquetado en cada partícula. Las variantes de fago de presentación se criban entonces por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Con el fin de identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, cribado de mutagénesis (por ejemplo, cribado de alanina) se pueden llevar a cabo para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión con el antígeno. De manera alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos vecinos son candidatos para la sustitución con las técnicas conocidas en la técnica, que incluyen los elaborados en el presente documento. Una de dichas variantes se generan, el panel de variantes se somete a cribado utilizando técnicas conocidas en la técnica, incluyendo las descritas en el presente documento, y las variantes con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para su desarrollo posterior.

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

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

De acuerdo con la presente descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla 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 sin embargo mantendría sustancialmente las mismas características necesarias para la utilizada terapéutica en comparación con su equivalente de tipo silvestre. Por ejemplo, se cree que ciertas alteraciones se pueden hacer en la región Fc que resultaría en la alteración (es decir, o mejorada o disminuida) de la unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan & Winter, *Nature* 322: 738-40 (1988); Patente de EE. UU. Nº 5.648.260; Patente de EE. UU. Nº 5.624.821; y documento WO94/29351 que se refiere a otros ejemplos de variantes de la región Fc. Los documentos WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpos que mejoran o disminuyen la unión a FcR. Véase también, Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es el responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994)), se describen en el documento US2005/0014934 A1 (Hinton et al.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en ella que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Las variantes de polipéptido con secuencias de aminoácidos alteradas de la región Fc y aumento o descenso de la capacidad de unión a C1q se describen en la Patente de EE. UU. Nº 6.194.551 B1, documento WO99/51642.

55 Véase también, Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en la interfaz de 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 el primer polipéptido Fc y una cavidad en el segundo polipéptido Fc, en los que la protuberancia se puede posicionar en la cavidad de manera que se promueve la formación de complejos entre el primer y segundo polipéptidos Fc. Los métodos para generar anticuerpos con estas modificaciones se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE. UU. Nº 5.731.168.

65 En otro aspecto más, puede ser deseable crear anticuerpos modificados en cisteína, por ejemplo "tioMAb", en los que uno o más restos de un anticuerpo se sustituyen con restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos

sustituídos están en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo los restos de cisteína, los grupos rio reactivos están por lo tanto posicionados en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden utilizar para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos farmacológicos o restos enlazadores de fármacos, como se ha descrito adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, cada una o más de los siguientes restos se

5 pueden sustituir con 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 anticuerpo

10 Los anticuerpos de la presente invención se pueden modificar adicionalmente para que contengan restos no proteináceos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los restos adecuados para la derivación del anticuerpo son polímeros solubles en agua. 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,

15 copolímero de anhídrido etileno/maleico,, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios), y homopolímeros dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, propilenglicol, co-polímeros óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (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 ser de cualquier peso molecular, y pueden ser ramificados o no ramificados. El número de

20 polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, pueden estar en la misma o diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados en la derivación se pueden determinar basándose en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades particulares o funciones del anticuerpo que se van a mejorar, si el derivado del anticuerpo se utilizará en una terapia en condiciones definidas, etc.

25 En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo con un resto no proteináceo que puede ser calentado selectivamente por exposición a radiación. En una realización, el resto no proteináceo 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, longitudes de onda que no dañen las células ordinarias, pero que calienten el resto no proteináceo a una temperatura a la que las células proximales al anticuerpo-resto no

30 proteináceo se destruyen.

B. Ciertos métodos para producir anticuerpos

1. Ciertos métodos basados en hibridomas

35 Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden producir utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez 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, 2ª ed. 1988); Hammerling et al., en: Monoclonal Antibodies y T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), y Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4): 265-268 (2006) con respecto a los hibridomas humanos-humanos.

Los métodos adicionales incluyen los que se describen, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. Nº 7.189.826 con respecto a la producción de anticuerpos IgM monoclonales naturales humanos de líneas celulares de hibridoma. La tecnología de hibridoma humano (tecnología trioma) se describe en Vollmers y Brandlein, Histology and

45 Histopathology, 20(3): 927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, Methods y Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3): 185-91 (2005).

En referencia a otras técnicas de hibridoma, véase, por ejemplo, los documentos US 2006/258841; US 2006/183887 (anticuerpos humanos completos), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; y las Patentes de EE. UU. Nº 7.078.492 y 7.153.507. Un protocolo a modo de ejemplo para producir anticuerpos monoclonales que utilizan el método del hibridoma se describe a continuación. En una realización, se inmuniza un

50 ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, para dar lugar a linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Los anticuerpos se producen en los animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de un polipéptido que comprende un SMO mutante o un fragmento del mismo, y un adyuvante, tal como monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trealosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT). Un polipéptido que comprende un SMO mutante o un fragmento del mismo se puede preparar utilizando métodos bien conocidos en la

55 técnica, tales como métodos recombinantes, algunos de los cuales se describen adicionalmente en el presente documento. El suero de los animales inmunizados se ensaya en cuanto a los anticuerpos anti-SMO mutante, y se administran opcionalmente inmunizaciones de refuerzo. Los linfocitos de los animales que producen anticuerpos anti-SMO mutante se aíslan. De maneja alternativa, se pueden inmunizar los linfocitos *in vitro*.

60

Los linfocitos se fusionen entonces con las células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Véase por ejemplo, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles y Practise, pp. 59-103 (Academic Press, 1986). Las células de mieloma se pueden utilizar las que se fusionen eficazmente, soporten una producción de alto nivel estable de anticuerpos por las células productoras del anticuerpo

65

seleccionado, y sean sensibles a un medio tal como un medio HAT. Las células de mieloma a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, líneas de mieloma murino, tal como los derivados de tumores MOPC-21 y MPC-11 de ratón disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección americana de cultivos tipo, Rockville, Maryland USA. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Las células de hibridoma preparadas de esta forma se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contiene una o más sustancias que inhiben 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 hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT. Preferentemente, los métodos de cultivo celular de hibridoma libre de suero se utilizan para reducir el uso de suero derivado de animales tal como el suero bovino fetal, como se describe, por ejemplo, en Even et al., Trends in Biotechnology, 24(3), 105-108 (2006).

Se han descrito oligopéptidos como herramientas para mejorar la productividad de los cultivos celulares de hibridoma 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 proteína hidrolizada, y se puede suprimir la apoptosis significativamente por oligopéptidos sintéticos, constituidos de tres a seis restos de aminoácidos. Los péptidos están presentes en concentraciones milimolares o mayores.

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan se pueden ensayar en cuanto a la producción de anticuerpos monoclonales que se unen al SMO mutante. La especificidad de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se puede determinar por inmunoprecipitación o por 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 se puede determinar, por ejemplo, por el análisis de Scatchard. Véase, por ejemplo, Munson et al., Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

Después de identificarse las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad afinidad y/o actividad deseada, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y se cultivan por métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Goding, *supra*. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluye, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores de ascitis en un animal. Los anticuerpos secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico, o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencional tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxilapatita electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad. UN procedimiento para el aislamiento de proteínas de las células de hibridoma se describen en el documento US 2005/176122 y Patente de EE. UU. Nº 6.919.436. El método incluye sales mínimas, tales como sales liotrópicas, en el proceso de unión y preferentemente también se utilizan pequeñas cantidades de disolventes orgánicos en el proceso de elución.

2. Métodos para cribar ciertas bibliotecas

Los anticuerpos de la invención se pueden producir utilizando bibliotecas combinatoriales para cribar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, varios métodos que se conocen en la técnica para generar bibliotecas de fagos de presentación y cribar dichas bibliotecas por anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos métodos se describen generalmente 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 parara generar los anticuerpos de interés es mediante el uso de una biblioteca de fagos de anticuerpos como se describe en Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93.

En principio, los clones de anticuerpo sintético se seleccionan por cribado en bibliotecas de fagos que contienen fagos que presentan distintos fragmentos de la región variable (Fv) de anticuerpo fusionados con la proteína de revestimiento del fago. Dichas bibliotecas de fago se seleccionan por cromatografía de afinidad frente al antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y así se separan de los clones de no unión de la biblioteca. Los clones de unión se eluyen entonces del antígeno, y se pueden enriquecer por ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. Cualquiera de los anticuerpos de la invención se pueden obtener diseñando un procedimiento adecuado de cribado del antígeno para seleccionar el clon de fagos de interés seguido por la construcción de un clon de anticuerpo de longitud completa utilizando las secuencias del clon de fago de interés y las secuencias de una región constante adecuada (Fc) descritas en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

En ciertas realizaciones, el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, cada una de las cuales de una cadena ligera (VL) y una

cadena pesada (VH), que presentan ambas tres bucles hipervariables (HVR) o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los dominios variables se pueden presentar funcionalmente en un fago, como fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), en los que VH y VL están unidos covalentemente por medio de un péptido flexible corto, o como fragmentos Fab, en los que se fusionan cada uno en un dominio constante e interactúan no covalentemente, como se describe en Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Como se utiliza en el presente documento, se hace referencia a los clones de fago que codifican scFv y clones de fago que codifican Fab como "clones de fago Fv" o "clones Fv".

Los repertorios de genes VH y VL se pueden clonar por separado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que entonces se pueden buscar los clones de unión al antígeno como se describe en Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). De manera alternativa, el repertorio intacto se puede clonar para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos contra un amplio intervalo de auto-antígenos y también no auto-antígenos sin inmunización como describe Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las bibliotecas intactas también se pueden producir sintéticamente clonando los segmentos de genes V no reordenados de las células madre, y utilizando cebadores de PCR que contiene una secuencia aleatoria que codifica las regiones CDR3 altamente variables y para conseguir el reordenamiento *in vitro* como describen Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

En ciertas realizaciones se utilizan fagos filamentosos para presentar fragmentos de anticuerpo por fusión de la proteína menor de la envoltura pIII. Los fragmentos de anticuerpo se pueden presentar como fragmentos Fv de cadena sencilla, en las que los dominios VH y VL se conectan a la misma cadena polipeptídica por un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, como describen Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona a pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula huésped donde el ensamblaje con una proteína de revestimiento-Fab se presenta en la superficie del fago por desplazamiento de alguna de las proteínas de revestimiento del 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 recolectadas de seres humanos o animales. Si se desea una biblioteca se desvía a favor de los clones anti-SMO mutantes, el sujeto se inmuniza con SMO mutante para generar una respuesta de anticuerpos, y las células esplénicas y/o células B circulantes distintas de los linfocitos de sangre periférica (PBL) se recuperan por la construcción de la biblioteca. En una realización preferida, se obtiene una biblioteca de fragmento genético de anticuerpo humano que se desvía a favor de clones anti-SMO mutantes generando una respuesta de anticuerpo anti-SMO mutante en ratones transgénicos que portan una matriz génica de inmunoglobulina humana (y carece de un sistema de producción de anticuerpos endógeno funcional) de manera que la inmunización de SMO mutante da lugar a células B que producen anticuerpos humanos contra el SMO mutante. La generación de ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos se describe posteriormente.

Se puede obtener el enriquecimiento adicional de poblaciones reactivas anti-SMO mutante utilizando un procedimiento de cribado adecuado para aislar células B que expresan anticuerpos unidos a la membrana específicos de SMO mutante, por ejemplo, por separación celular utilizando cromatografía de afinidad al SMO mutante o la adsorción de células de SMO mutante marcado con fluorocromo seguido por clasificación celular activada por flujo (FACS).

De manera 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 anticuerpo, y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpo utilizando cualquier especie animal (humano o no humano) en la que el SMO mutante no es antigénico. Para las bibliotecas que incorporan una construcción génica de anticuerpo *in vitro*, se recolectan las células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos de genes de anticuerpo sin reordenar. Las células inmunitarias de interés se pueden obtener a partir de varias especies animales, tales como seres humanos, ratón, rata, lagomorfos, caprinos, caninos, felinos, porcinos, bovinos, equinos, y especies aviarias, etc.

El ácido nucleico que codifica los segmentos de genes variables de anticuerpo (incluyendo los segmentos VH y VL) se recuperan de las células de interés y se amplifican. En el caso de bibliotecas génicas de VH y VL reordenadas, el ADN deseado se puede obtener aislando ADN o ARNm de los linfocitos seguido por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que coinciden con los extremos 3' y 5' de los genes VH y VL reordenados como se describe en Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), produciendo de esa manera repertorios génicos V diversos para la expresión. Los genes V se pueden amplificar a partir de ADNc y ADN genómico, con cebadores inverso 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 del ADNc, los cebadores inversos se pueden basar también en el exón líder como se describe en Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991), y los cebadores directos con la región constante como se describe en Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar la degeneración en los cebadores como se describe en Orlandi et al. (1989) o Sastry et al. (1989). En ciertas realizaciones se maximiza la diversidad de la biblioteca utilizando cebadores

de PCR dirigidos a cada familia de genes –V con el fin de amplificar todas las disposiciones de VH y VL presentes en la muestra de ácido nucleico de la célula inmune, 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 la clonación del ADN amplificado en los vectores de expresión, se pueden introducir sitios de restricción en el cebador de PCR como un marcador en un extremo como se describe en Orlandi et al. (1989), o por amplificaciones por PCR adicionales con un cebador marcado como se describe en Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991).

Los repertorios de genes V reordenados sintéticamente se pueden derivar *in vitro* de segmentos de genes V. La mayoría de los segmentos de genes VH humanos se han clonado y secuenciado (expuestos en Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)), y mapeados (expuesto en Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)); estos segmentos clonados (que incluyen todas las conformaciones principales de los bucles H1 y H2) se pueden utilizar para generar distintos repertorios de genes VH con cebadores de PCR que codifican los bucles H3 de distintas secuencia y longitud como se describen en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Los repertorios VH también se pueden hacer con toda la diversidad de secuencia enfocada en un bucle HE largo de una única longitud como se describe en Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos Vk y Vλ humanos se han clonado y secuenciado (expuesto en Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) y se pueden utilizar para producir repertorios de cadena ligera sintéticos. Los repertorios de genes V sintéticos, basado en un intervalo de pliegues VH y VL y longitudes L3 y H3, codificarán anticuerpos de diversidad estructural considerable. Después de la amplificación de los ADN que codifican el gen-V, los segmentos del gen-V de la línea germinal se pueden reordenar *in vitro* de acuerdo con los métodos de Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Los repertorios de fragmentos de anticuerpo se puede construir combinando juntos los repertorios de genes VH y VL de varias maneras. Cada repertorio se puede crear en diferentes vectores, y los vectores recombinados *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). La estrategia de combinación *in vivo* explota la naturaleza de dos cadenas de los fragmentos Fab para superar el límite del tamaño de la biblioteca impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Los repertorios VH y VL intactos se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector fago. Las dos bibliotecas se combinan entonces por infección por el fago de las bacterias que contienen fagémidos de manera que cada célula contiene una combinación diferente y el tamaño de la biblioteca solo se limita por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de manera que los genes VH y VL se recombinan en un único replicón y se co-empaquetan en viriones de fago. Estas grandes bibliotecas proporcionan una gran cantidad de anticuerpos diversos con buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^8 M).

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

Los anticuerpos producidos por bibliotecas intactas (sean naturales o sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M⁻¹), pero la maduración de afinidad también se puede imitar *in vitro* construyendo y re-seleccionando de bibliotecas secundarias como se describe en Winter et al. (1994), *supra*. Por ejemplo, la mutación se puede introducir aleatoriamente *in vitro* utilizando la polimerasa proclive a errores (expuesto 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). Adicionalmente, la maduración de afinidad se puede llevar a cabo mutando aleatoriamente una o más CDR, por ejemplo, utilizando la PCR con cebadores que portan la secuencia aleatoria que comprende la CDR de interés, en clones Fv individuales seleccionados y cribado por los clones de mayor afinidad. El documento WO 9607754 (publicado el 14 marzo de 1996) describe 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. Otra estrategia eficaz es recombinar los dominios VH o VL seleccionados por fagos de presentación con repertorios de variantes del dominio V de origen natural obtenidas de donantes sin inmunizar y cribado por alta 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.

El cribado de las bibliotecas se puede conseguir por distintas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, el SMO mutante se puede utilizar para revestir los pocillos de placas de adsorción, que se expresa en células huésped fijadas en las placas de adsorción utilizadas en la clasificación celular, o conjugarse con biotina para la captura con perlas revestidas de estreptavidina, o utilizarse en cualquier otro método de selección en bibliotecas de fagos de presentación.

Las muestras de la biblioteca de fagos se pone en contacto con el SMO mutante en condiciones adecuadas para unirse al menos a una parte de las partículas del fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, que incluyen el pH, fuerza iónica, temperatura y similares se selecciona para imitar las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y luego se eluyen con ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), o en álcalis, por ejemplo, como se describe en Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o por competición antigénica por el SMO mutante, por ejemplo, en un procedimiento similar al método de competición antigénica de Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer de 20-1000 veces en una única ronda de selección. Además, los fagos enriquecidos se pueden cultivar en un cultivo bacteriano y someterlos a rondas adicionales de selección.

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

Es posible seleccionar entre anticuerpos fagos de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, por el SMO mutante. Sin embargo, la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como se lleva a cabo en algunas técnicas de maduración de afinidad) es probable que dé lugar a muchos mutantes, la mayoría que se unen al antígeno, y unos pocos con alta afinidad. Con SMO mutante limitantes, pocos fagos de alta afinidad podría competir. Para retener los mutantes de alta afinidad, los fagos se pueden incubar con un exceso de SMO mutantes biotinilados, pero con el SMO mutante biotinilado a una concentración de menos molaridad que la constante de afinidad molar diana para el SMO mutante. Los fagos de alta afinidad de unión se puede entonces capturar por perlas paramagnéticas revestidas con estreptavidina. Dicha "captura de equilibrio" permite que los anticuerpos se seleccionen de acuerdo con su afinidad de unión, con una sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con una afinidad mayor hasta de dos veces a partir de un gran exceso de fagos con baja afinidad. Las condiciones que se utilizan en el lavado de fagos unidos a una fase sólida se pueden también manipular para discriminar sobre la base de la cinética de disociación.

Los clones anti-SMO mutante se pueden seleccionar basándose en su actividad. En ciertas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos anti-SMO mutante que se unen a las células vivas que expresan naturalmente SMO mutantes, tal como las células tumorales resistentes a GDC-0449. En una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-SMO mutantes, que se unen a la misma región que se une el GDC-0449 en el SMO tipo silvestre. Los clones Fv correspondientes a dichos anticuerpos anti-mutantes SMO se pueden seleccionar por (1) aislar los clones anti-mutantes SMO de una biblioteca de fagos como se describe anteriormente, y opcionalmente amplificar la población aislada de clones fagos cultivando la población en un huésped bacteriano adecuado; (2) seleccionar el mutante SMO y una segunda proteína en contra cuya actividad bloqueante y no bloqueante, respectivamente, se desea; (3) adsorber los clones fagos anti-mutante SMO para inmovilizar el mutante SMO; (4) utilizar un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconoce los determinantes de unión a SMO mutante que se solapan o se comparten con los determinantes de unión de la segunda proteína, y (5) eluir los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades bloqueantes/no bloqueantes deseadas se pueden enriquecer 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 clones Rv de fagos de presentación de la invención se aíslan fácilmente y se secuencian utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando cebadores oligonucleotídicos designados para amplificar específicamente las regiones codificantes de la cadena pesada y ligera de interés de la matriz ADN de fago o hibridoma). Una vez que se aísla, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que se transfectan entonces en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen inmunoglobulina proteica de otra manera, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión de la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican anticuerpos incluyen Skerra et al., Curr. Opin. Immunol., 5: 256 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992).

El ADN que codifica los clones Fv de la invención se pueden combinar con secuencias conocidas de ADN que codifican las regiones constantes de la cadena pesada y/o la cadena ligera (por ejemplo, las secuencias de ADN apropiadas se pueden obtener en Kabat et al., *supra*) para formar clones que codifican cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa o parciales. Se apreciará que las regiones constantes de cualquier isotipo se pueden utilizar para este fin, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, y esas dichas regiones constantes se pueden obtener a partir de cualquier especie humana o animal. Un clon Fv derivado del ADN del dominio variable de una especie animal (tal como un ser humano) y luego se fusiona con el ADN de región constante de otra especie

animal para formar secuencias codificantes para "hibridar" cadenas pesadas y/o cadenas ligeras de longitud completa se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" o "híbrido" que se utiliza en el presente documento. En ciertas realizaciones, un clon Fv derivado de ADN variable humano se fusiona con un ADN de región constante humana para formar secuencias codificantes para cadenas ligeras y/o pesadas humanas de longitud completa o parcial.

El ADN que codifica el anticuerpo anti-SMO mutante derivado de un hibridoma de la invención también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanas en lugar de secuencias homólogas murinas 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 SDN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado de un clon Fv o de hibridoma se puede modificar adicionalmente por la unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulina. De esta manera, anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" se prepararon que tienen la especificidad de unión de los anticuerpos de la invención derivados de un clon de hibridomas o clon de Fv.

3. Vectores, células huésped, y métodos recombinantes

Los anticuerpos se pueden producir también utilizando métodos recombinantes. Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-SMO mutante, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se aísla y se inserta en un vector replicable para clonar adicionalmente (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo puede aislarse fácilmente y secuenciarse utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Muchos vectores están disponibles. Los componentes del vector incluyen en general, pero no se limitan a, uno o más de las siguientes secuencias de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento de aumento, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

a) Componente de secuencia de señal

Un anticuerpo de la invención se puede producir recombinantemente no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia de señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia de señal heteróloga que se selecciona preferentemente es la que se reconoce y procesa (es decir se escinde por una peptidasa de señal) por la célula huésped. Para las células huésped procariontes que no reconocen y procesan una señal de secuencia de anticuerpo nativa, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal procarionte que se selecciona, por ejemplo, de entre el grupo de los líderes fosfatasa alcalina, penicilasa, lpp, o enterotoxina II estable al calor. Para la secreción en levaduras la secuencia de señal nativa se puede sustituir por ejemplo, por el líder invertasa de levadura, líder factor α , o líder fosfatasa ácida, el líder glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión en células de mamífero, las secuencias de señal de mamífero así como los líderes secretores víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simple, están disponibles.

b) Origen de replicación

Tanto los vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que hacen posible que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. En general, en los vectores de clonación esta secuencia es la que hace posible que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias se conocen para varias 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 2 μ es adecuado para levaduras, y distintos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o PBV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. En general, el componente de origen de replicación no se necesita para los vectores de expresión en mamíferos (el origen SV40 se puede utilizar normalmente solo porque contiene el promotor temprano).

c) Componente de selección génica

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también llamado marcador seleccionable. Los típicos genes de selección codifican proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) deficiencias del complemento auxotrófico, o (c) suministro de nutrientes críticos no disponibles en los medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco que detiene el crecimiento de una célula huésped. Las células que se transforman satisfactoriamente con un gen heterólogo produce una proteína que confiere resistencia a fármacos y por lo tanto sobrevive en el régimen de selección. Ejemplos de dicha selección dominante utiliza los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables para células de mamífero son las que hacen posible la identificación de células competentes para la captación de ácido nucleico que codifica el anticuerpo, tal como DHFR, glutamina

sintetasa (GS), timidina cinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

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

Alternativamente, las células transformadas con el gen GS se identifican cultivando la transformantes en un medio de cultivo que contenía L-metionina sulfoximina (Msx), un inhibidor de la GS. En estas condiciones, se amplifica el gen GS junto con cualquier otro ácido nucleico transformado. El sistema de selección/amplificación de GS se puede utilizar en combinación con el sistema de selección/amplificación de DHFR descrito anteriormente.

De manera alternativa, las células huésped (particularmente los huéspedes de tipo silvestre que contienen DFHR endógeno) se transformaron o co-transformaron con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de interés, el gen DHFR tipo silvestre, y otro marcador seleccionable tal como el aminoglucósidos 3'-fosfotransferasa (APH) se puede seleccionar por cultivo celular en un medio que contiene un agente de selección por el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucósido, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la Patente de EE. UU. N° 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levaduras YRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282: 39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics, 85: 12 (1977). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula huésped de levaduras proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por el crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan con plásmidos conocidos que albergan el gen *Leu2*.

Además, los vectores derivados del plásmido pKD1 circular de 1,6 μ m se puede utilizar para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. De manera alternativa, un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternera recombinante se expuso para *K. lactis*. Van den Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990). Los vectores de expresión multi-copia estables para la secreción de seroalbúmina sérica humana recombinante madura por las cepas industriales de *Kluyveromyces* también se han desvelado. Fleer et al., Bio/Technology, 9: 968-975 (1991).

d) Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación generalmente contienen un promotor que es reconocido por los organismos huésped y que están unidos operativamente al ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Los promotores adecuados para su uso en huéspedes procariotas incluyen el promotor *phoa*, sistemas de promotor de β -lactamasa y lactosa, promotor de fosfatasa alcalina, un sistema de promotor triptófano (*trp*), y promotores híbridos tal como el promotor *tac*. Sin embargo, se conocen otros promotores bacterianos adecuados. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contienen una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) unido operativamente al ADN que codifica un anticuerpo.

Se conocen secuencias de promotor para eucariotas. Virtualmente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases corriente arriba desde el sitio en que 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 en la que N puede ser cualquier nucleótido. El extremo 3' de la mayoría de los genes de eucariotas es 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 son adecuadamente insertadas en los vectores de expresión para eucariotas.

Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso en huéspedes levaduras incluye los promotores de la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como la enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafofosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucocinasa.

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

La transcripción de anticuerpos a partir de vectores en células huésped de mamífero se pueden controlar, por ejemplo, por promotores que se obtienen de genomas de virus tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B, virus 40 de simio (SV40), o de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulinas, a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatible con los sistemas de célula huésped.

Los promotores temprano y tardío del virus SV 40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción SV40 que también contiene el origen de replicación del virus SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción con HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos que utilizan el virus del papiloma bovino como un vector se desvela en la Patente de EE. UU. N° 4.419.446. Una modificación de ese sistema se describe en la Patente de EE. UU. N° 4.601.978. Véase también Reyes et al., Nature 297: 598-601 (1982) sobre la expresión de un ADNc del interferón β humano en células de ratón bajo el control de un promotor timidina cinasa del virus del herpes simple. De manera alternativa, se puede utilizar la larga repetición terminal del virus del sarcoma de Rous como promotor.

e) Componente de elemento amplificador

La transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores a menudo se aumenta insertando una secuencia amplificadora en el vector. Se conocen actualmente muchas secuencias amplificadoras para genes de mamífero (globina elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Normalmente, sin embargo, se utilizará un amplificador de un virus de célula eucariota. Ejemplos incluyen el amplificador de SV40 en el último lado del origen de replicación (pb 100-270), el amplificador del promotor temprano de citomegalovirus, el amplificador del poliovirus en el último lado del origen de replicación, y amplificadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) sobre los elementos amplificadores para la activación de los promotores eucariotas. El amplificador puede ser cortado y empalmado en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificadora del anticuerpo, pero es preferible colocarlo en el sitio 5' del promotor.

f) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión que se utilizan en células huésped eucariotas (levaduras, hongos, de insecto, vegetales, de animales, de seres humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán también secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles a partir del 5' y, ocasionalmente, el 3' de regiones no traducidas de ADN o ADNc de eucariotas o virus. Estas regiones contienen segmentos de nucleótido transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte sin traducir del ARNm que codifica el anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión que se desvela en el presente documento.

g) Selección y transformación de células huésped

Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión de ADN en los vectores del presente documento son células procariotas, de levaduras o eucariotas superiores que se han descrito anteriormente. Las procariotas adecuadas para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-positivos o Gram-negativos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens*, y *Shigella*, así como Bacilli tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *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 huésped de clonación preferido de *E. coli* es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes.

el anticuerpo de longitud completa, las proteínas de fusión de anticuerpo, y los fragmentos de anticuerpo se pueden producir 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 tóxico (por ejemplo, una toxina) que por sí misma muestra una eficacia en la destrucción de la célula tumoral. Los anticuerpos de longitud completa tienen una semivida mayor en la circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y barata. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, documentos U.S. 5.648.237 (Carter et al.), U.S. 5.789.199 (Joly et al.), U.S. 5.840.523 (Simmons et al.), que describe la región de inicio de la traducción (TIR) y secuencias de 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), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmento de anticuerpo en *E. coli*. Tras la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta celular de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar mediante, por ejemplo una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo al igual que el proceso para purificar el anticuerpo purificado, por ejemplo, en células CHO.

Además de las procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o levaduras son adecuados huéspedes de expresión o clonación para vectores que codifican anticuerpos. El *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es la más utilizada comúnmente entre los microorganismos eucariotas inferiores huéspedes. Sin embargo, varios otros géneros, especies y cepas están disponibles comúnmente y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; Huéspedes de *Kluyveromyces* 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. drosophilae* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Para una revisión que trata sobre el uso de levaduras y hongos filamentosos para la producción de proteínas terapéuticas, véase, por ejemplo, Gerngross, Nat. Biotech. 22: 1409-1414 (2004).

Se pueden seleccionar ciertas cepas de hongos y levaduras en las que las rutas de glicosilación se han "humanizado" dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación completa o parcialmente humano. Véase, por ejemplo, Li et al., Nat. Biotech. 24: 210-215 (2006) (que describe la humanización de la ruta de glicosilación en *Pichia pastoris*); y Gerngross et al., *supra*.

Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpo glicosilado también se derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Ejemplos de células de invertebrado incluyen las células vegetales y de insectos. Se han identificado muchas cepas baculovíricas y variantes y las correspondientes células huésped permisivas de insecto correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Está públicamente disponible varias cepas víricas para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden utilizar como los virus del presente documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección en células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos celulares vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, lenteja de agua (Lemnaceae), alfalfa (*M. truncatula*), y tabaco se pueden utilizar también como huéspedes. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. Nº 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978, y 6.417.429 (que describe la tecnología de los PLANTIBODIES™ para la producción de anticuerpos en plantas transgénicas).

Se pueden utilizar células de vertebrado como huéspedes, y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al., J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de hámster recién nacido (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 de cuello de útero 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 humanas de pulmón (W138, ATCC CCL 75); células humanas de hígado (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; FS4 células; y una línea humana de hepatoma (Hep G2). Otras líneas celulares huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que incluyen células CHO-DHFR (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como NS0 y sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas celulares de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpo, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 255-268.

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para inducir los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

h) Cultivo de células huésped

Las células huésped que se utilizan para producir un anticuerpo de la presente invención se pueden cultivar en varios medios. Los medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Mínimo Esencial (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), Sigma son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patentes de EE. UU. Nº 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documento WO 90/03430; documento WO 87/00195; o Patente de EE. UU. Nº 30.985 se pueden utilizar como medio de cultivo para células huésped. Cualquiera de estos medios se puede suplementar si fuera necesario con hormonas y otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como

HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos que están presentes habitualmente en concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario se puede también incluir en las concentraciones apropiadas que serían conocidas para los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las que se utilizan previamente en la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán aparentes para el facultativo experto habituado.

i) Purificación del anticuerpo

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretado directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, en una primera etapa, los residuos particulados, bien las células huésped o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *Bio/Tech-nology* 10: 163-167 (1992) describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan en el espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA, y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los residuos celulares se pueden eliminar por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran primero utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo preparado a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una de las etapas de purificación normalmente preferida. La idoneidad de la Proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cada dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas $\lambda 1$, $\lambda 2$ o $\lambda 4$ humanas (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para la $\lambda 3$ humana (Guss et al., *EMBO J.* 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es más a menudo agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como cristal de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permite caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se consiguen con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación proteica tal como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía SEPHAROSE™ sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, y precipitación en sulfato amónico también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se vaya a recuperar.

A continuación de cualquiera de las etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes se pueden someter a cromatografía de interacción hidrófoba a bajo pH utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5- 4,5 preferiblemente llevado a cabo a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, desde aproximadamente 0- 0,25 M de sal).

En general, están bien establecidas en la técnica distintas metodologías para la preparación de anticuerpos para su uso en investigación, ensayo, y clínica, consistentes con las metodologías descritas anteriormente y/o como se considere apropiado por un experto en la técnica para el anticuerpos particular de interés.

C. Inmunoconjugados

La invención también proporciona Inmunoconjugados (a los que se hace referencia de manera intercambiable como "conjugados anticuerpo-fármaco" o "ADC") 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 proteica, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngica, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Los inmunoconjugados se habían utilizado para el suministro local de agentes citotóxicos, 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 EE. UU. N° 4.975.278). Los inmunoconjugados permiten el suministro dirigido de un resto farmacológico a un tumor, y la acumulación intracelular en él, donde la administración sistémica de fármacos no conjugados pueden dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para las células así como las células tumorales que se desea eliminar (Baldwin et al., *Lancet* (Mar. 15, 1986) pp. 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) pp. 475-506. Tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales se ha expuesto que son útiles en esas estrategias (Rowland et al., (1986) *Cancer*

Immunol. Immunother. 21: 183-87). Los fármacos que se utilizan en esos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland et al., (1986) *supra*). Las toxinas que se utilizan en los conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como la toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricino, toxinas de molécula pequeña tal 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 por mecanismos que incluyen la unión de tubulina, unión de ADN, o inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienen a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con grandes ligandos del receptor de anticuerpos o proteínas.

El ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetano, Biogen/Idec) es un conjugado anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 murino que se dirige contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de linfocitos B normales y malignos y un radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y unido por un quelante de enlazador de 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 el ZEVALIN tiene actividad contra las células B del linfoma no de Hodgkin (NHL), la administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. El MYLOTARG® (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo huCD33 unido a caliqueamicina se aprobó en 2000 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7): 686; Patentes de EE. UU. N° 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). La maitansina catizumba (Immunógena, Inc.), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 unido por medio de un enlace disulfuro SPP al resto farmacológico maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el tratamiento potencial de tumores prostáticos. Los péptidos auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron en anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para los carcinomas Y de Lewis) y cAC10 (específico para CD30 en cánceres malignos hematológicos) (Doronina et al (2003) Nature Biotechnol. 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 activas enzimáticamente y los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no unidos de la toxina diftérica, la cadena de endotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricino A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de la mo-mordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de la *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. Varios radionúclidos están disponibles para la producción de conjugados de anticuerpo. Ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y un agente citotóxico se producen utilizando varios agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridiltiol) (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 (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de fluro bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno. Por ejemplo, una inmunotoxina ricino que se puede preparar como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). Carbono-14 marcado, ácido 1-isotiociantobencil-3-metildietileno ácido triaminoentaacético (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo. Véase el documento WO 94/11026.

Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tal como una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatina, auristatinas, un tricoterceno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad toxina, también se contemplan en el presente documento.

1. Maitansina y maitansinoides

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

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo al polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez de un arbusto del este de África *Maytenus serrata* (Patente de EE. UU. N° 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producían maitansinoides, tales como el maitansinol y ésteres del maitansinol C-3 (Patente de EE. UU. N° 4.151.042). Los maitansinoides sintéticos y derivados y análogos de los mismos se desvelan en, por ejemplo, Patentes de EE. UU. N° 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 farmacológicos maitansinoides son restos farmacológicos atractivos en conjugados anticuerpo fármaco debido a que son: (i) relativamente accesibles para prepararlos por fermentación o modificación química, derivación

de productos de fermentación, (ii) dispuesto para la derivación con grupos funcionales adecuados por conjugación por medio de enlaces no disulfuro a los anticuerpos, (iii) estables en el plasma, y (iv) eficaces contra varias líneas celulares tumorales.

- 5 Los immunoconjugados que contienen maitansinoides, los métodos para producir los mismos, y su uso terapéutico se desvelan, por ejemplo en las Patentes de EE. UU. Nº 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) describían immunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado DM1 unido al anticuerpo C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. SE descubrió que el conjugado era altamente citotóxico contra las células cultivadas de cáncer de colon, y presentaba actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992) describe los immunoconjugados en los que el maitansinoide se conjugó por medio de un enlazador disulfuro con el anticuerpo murino Ay que se une a un antígeno en las líneas celulares humanas de cáncer de colon, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA1 que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA-1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en una línea celular SK-BR-3, de cáncer de mama humano, que expresa 3×10^5 antígenos HER-2 de superficie por célula. El conjugado con el fármaco alcanzaba un grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, que se podía aumentar aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide presentaba baja citotoxicidad sistémica en ratones.

- 20 Los conjugados anticuerpo-maitansinoide se preparan por unión química de un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o de la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nº 5.208.020 y en otras patentes y publicaciones no patentes a los que se hace referencia anteriormente en el presente documento. Una media de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha demostrado que es eficaz en el aumento de la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente la función o solubilidad del anticuerpo, aunque incluso una molécula de toxina/anticuerpo se debería esperar que aumentara la citotoxicidad con respecto al uso de un anticuerpo desnudo. Los maitansinoides se conocen bien en la técnica y se pueden sintetizar por técnicas conocidas o aislar de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se desvelan, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. Nº 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones no patentes a los que se hace referencia anteriormente en el presente documento. Los maitansinoides preferidos son el maitansinol y análogos del maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula del maitansinol, tal como distintos ésteres de maitansinol.

- 35 Existen muchos grupos de unión que se conocen en la técnica para producir conjugados anticuerpo –maitansinoide, que incluyen, por ejemplo, las que se desvelan en la Patente de EE. UU. Nº 5.208.020 o Patente EP 0 425 235 B1, Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992), y la Solicitud de Patente Nº 10/960,602, presentada el 8 de oct de 2004. Los grupos de unión incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos de ácido lábiles, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasa, o grupos lábiles a esterasa, como se desvela en las patentes identificadas anteriormente, siendo preferidos los grupos disulfuro y tioéter. Los grupos de unión adicional se describen y ejemplifican en el presente documento.

- 40 Los conjugados del anticuerpo y maitansinoide se pueden producir utilizando varios agentes de acoplamiento proteicos bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridiltilio) (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolato (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de fluoro bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Agentes de acoplamiento preferidos incluyen propionato de N-succinimidil-3-(2-piridiltilio) (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173: 723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridilthio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

- 50 El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en distintas posiciones, dependiendo del tipo de unión. Por ejemplo, se puede formar un enlace éster por reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetil, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 tienen un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o análogo de maitansinol.

2. Auristatínas y dolastatínas

- 60 En algunas realizaciones, el immunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con dolastatínas o análogos peptídicos de dolastatina y derivados, las auristatínas (Patentes de EE. UU. Nº 5635483; 5780588). Se ha demostrado que las dolastatínas y auristatínas interfieren con la dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP, y división nuclear y celular (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584) y tienen actividad anticáncer (documento US 5663149) y antifúngica (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2961-2965). El resto de fármaco dolastatina y auristatina se puede unir al anticuerpo por medio del extremo N (amino) o el extremo C (carboxilo) del resto farmacológico peptídico (documento WO 02/088172).

Las realizaciones de auristatina a modo de ejemplo incluyen los restos de monometilauristatina DE y DF unidos al extremo N que se desvelan en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US Ser. No. 10/983,340, presentado el 5 de nov. de 2004.

- 5 Normalmente, los restos farmacológicos basados en péptidos se pueden preparar formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pp. 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocida en el campo de la química peptídica. Los restos farmacológicos auristatina/dolastatina se pueden preparar 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; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US Ser. No. 10/983,340, presentada el 5 de nov. de 2004 (que devela, por ejemplos, enlazadores y métodos para preparar compuestos de monometilvalina tal como MMAE y MMAF conjugados a enlazadores).

3. Caliqueamicina

- 20 En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos caliqueamicinas son capaces de producir roturas en la doble cadena de ADN a concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de las caliqueamicinas, véase las Patentes de EE. UU. Nº 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas ellas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, γ 11, α 2I, α 3I, N-acetil- γ 11, PSAG y θ 11 (Hinman et al., Cancer Research 53: 3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de EE. UU. mencionadas anteriormente para American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral al que se puede conjugar el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes por medio de internalización mediada por anticuerpos aumenta mucho sus efectos citotóxicos.

4. Otros agentes citotóxicos

- 35 Se pueden conjugar otros agentes antitumorales con los anticuerpos que incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes que se conocen colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en las Patentes de EE. UU. Nº 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (Patente de EE. UU. Nº 5.877.296).

- 40 Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no unidos de la toxina diftérica, la cadena de endotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricino A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas diantina, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de la mo-mordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de la 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.

- 45 La presente invención contempla un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

- 50 Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente reactivo. Hay disponible varios 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 radioactivos de Lu. Cuando el conjugado se utiliza para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para los estudios centellográficos, por ejemplo, ^{99m}Tc o I^{123} , o un marcador de espín para resonancia magnética nuclear (NMR) por imagen (también conocida como imagen de resonancia magnética, mri), tal como iodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

- 55 Los radiomarcadores u otros marcadores se pueden incorporar en el conjugado por maneras que se conocen. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar por síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores tales como ^{99m}Tc o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} se pueden fijar por medio de un resto de cisteína en el péptido. El Ytrio-90 se puede fijar por medio de un resto de lisina. El método IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) se puede utilizar para incorporar el yodo-123. El documento "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos con detalle.

- 65 Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se puede hacer utilizando varios agentes de acoplamiento proteico bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridiltiol) (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 (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de fluoro bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzén. Por ejemplo, una inmunotoxina ricina que se puede preparar como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). Carbono-14 marcado, ácido 1-isotiociantobencil-3-metildietileno ácido triaminoentaacético (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo. Véase el documento WO 94/11026. El enlazador puede ser un enlazador "escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil a ácidos, un enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotolábil, enlazador dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992); Patente de EE. UU. Nº 5.208.020).

Los compuestos que se contemplan expresamente, pero no se limitan a ADC preparado con reactivos entrecruzadores; 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 comercio (por ejemplo en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.A). Véanse las páginas 467-498, Manual de aplicaciones y catálogo 2003-2004.

5. Preparación de conjugados anticuerpo fármaco

En los conjugados anticuerpo fármaco (ADC), se conjuga un anticuerpo (Ab) con uno o más restos farmacológicos (D), por ejemplo, aproximadamente 21 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo, por medio de un enlazador (L). El ADC de fórmula I se puede preparar por varias rutas, empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen: (1) la reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar Ab-L, por medio de un enlace covalente, seguido por la reacción con un resto farmacológico D; y (2) la reacción de un grupo nucleofílico e un resto farmacológico con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L por medio de un enlace covalente, seguido por la reacción con el grupo nucleofílico de un anticuerpo. Se describen métodos adicionales para preparar ADC en el presente documento.



El enlazador puede estar compuesto por uno o más componentes de enlazador. Los componentes de enlazador a modo de ejemplo incluyen 6-maleimidocarboxil ("MC"), maleimidopropanoil ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-amonobenziloxycarbonilo ("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"). Componentes de enlazador adicionales se conocen en la técnicas y algunos se describen en el presente documento. Véase también, "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US Ser. No. 10/983.340, presentado el 5 de nov. de 2004.

En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender restos de aminoácido. Componentes de enlazador con aminoácidos a modo de ejemplo incluyen un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido o pentapéptido. Los dipéptidos a modo de ejemplo incluyen: valina-citrulina, (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos a modo de ejemplo incluyen; glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los restos de aminoácido que comprenden un componente enlazador de aminoácidos incluyen los de origen natural, así como aminoácidos menores y los análogos de aminoácidos que no existen naturalmente, tales como citrulina. Los componentes de enlazador se pueden diseñar y optimizar en cuanto a su selectividad por la escisión enzimática con enzimas particulares, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, cathepsina B, C y D, o una plasmina proteasa.

Los grupos nucleofílicos de los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amino del extremo N, (ii) grupos amino de cadenas laterales, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos azúcar hidroxilo o amino en donde el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amino, tiol, e hidroxilo son grupos nucleofílicos capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos o restos enlazadores y reactivos enlazadores que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos, y hálidos ácidos; (ii) alquil y bencil hálidos tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimido. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden ser reactivos por la conjugación con reactivos enlazadores con el tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Cada puente de cisteína formará, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Los grupos nucleofílicos adicionales se pueden introducir por medio de la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) que resulta en la conversión de una amina en tiol. los grupos de tiol reactivos se pueden introducir 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 del aminoácido cisteína no nativos).

Los conjugados de anticuerpo fármaco también se puede producir por modificación del anticuerpo para introducir restos electrofílicos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleofílicos en el reactivo enlazador o fármaco. Los azúcares de los anticuerpos glicosilados se pueden oxidar, por ejemplo con reactivos de oxidación de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amino de reactivos enlazadores o restos

de fármaco. Los grupos resultantes de bases de Schiff iminina puede formar un enlace estable, o se puede reducir, por ejemplo por reactivos borhídridos para formar enlaces amina estables. En una realización, la reacción de la parte carbohidrato de un anticuerpo glicosilado con galactosa oxidasa o meta-peryodato sódico puede dar lugar a grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que puede reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen restos de serina o treonina en el extremo N pueden reaccionar con meta-peryodato sódico, 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 reaccionar con un resto farmacológico o enlazador nucleófilo.

Al igual, los grupos nucleofílicos en un resto farmacológico, pero no se limita a: amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina, y grupos arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en restos enlazadores y reactivos enlazadores que incluyen (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos, y hálidos ácidos; (ii) alquil y bencil hálidos tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehído, cetona, carboxilo y maleimido.

De manera alternativa, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y el agente citotóxico se puede construir, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud de ADN puede comprender regiones respectivas que codifiquen las dos porciones del conjugado adyacentes entre ellas o separadas por una región que codifica un enlazador peptídico que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como estreptavidina) para la utilización en el pre-direccionamiento hacia el tumor en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido por la eliminación del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente de aclarado y luego la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionúclido).

IV. Métodos

A. Métodos de diagnóstico 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 utiliza en el presente documento engloba la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como un tejido tumoral.

Se desvela en el presente documento un método de diagnóstico de un trastorno asociado con la expresión de SMO mutante. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula de ensayo con un anticuerpo anti-SMO mutante en condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti-SMO mutante con el SMO mutante, y detectar si se ha formado un complejo entre el anticuerpo anti-SMO mutante y el SMO mutante.

Se desvela en el presente documento un método para diagnosticar un trastorno asociado con la expresión de un 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 (cuantitativamente o cualitativamente) de SMO mutante por la célula de ensayo detectando la unión del anticuerpo anti-SMO mutante al SMO mutante; y comparar el nivel de expresión del SMO mutante por la célula de ensayo con el nivel de expresión de 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 expresa SMO de tipo silvestre a niveles comparables a dicha célula normal), en que un nivel más alto de la expresión de un SMO mutante por la célula de ensayo en comparación con la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado con el aumento de expresión de SMO mutante. En ciertas realizaciones, la célula de ensayo se obtiene de un individuo sospechoso de tener un trastorno asociado con el aumento de la expresión de SMO mutante. En ciertas realizaciones, el trastorno es un trastorno proliferativo celular, tal como un cáncer o un tumor.

Los trastornos a modo de ejemplo que se pueden diagnosticar que utilizan un anticuerpo de la invención incluye, pero no se limitan a meduloblastoma, cáncer pancreático, carcinoma de células basales.

Ciertos otros métodos se pueden utilizar para detectar la unión de anticuerpos al SMO mutante. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión al antígeno que son bien conocidos en la técnica, tal como transferencia de western, radioinmunoensayos, ELISA, (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos de fluorescencia, inmunoensayos de Proteína A, e inmunohistoquímica (IHC).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos están marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tal como marcadores fluorescentes, cromofóricos, electrodensos, quimioluminiscentes y radioactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, por medio de reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , y ^{131}I , fluoróforos tales como quelados

de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansil, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Pat. de EE. UU. N° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, peroxidasa de rábano rústico (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, 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 de colorante tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores espines, marcadores bacteriófagos, radicales libres estables, y similares.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos se inmovilizan en una matriz insoluble. La inmovilización puede implicar la separación de un anticuerpo anti-SMO mutante de cualquier SMO mutante que permanece libre en solución. Esto se consigue convencionalmente insolubilizando el anticuerpo anti-SMO mutante antes del procedimiento de ensayo, o por absorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich et al., documento U.S. 3.720.760), o por acoplamiento covalente (por ejemplo, utilizando un entrecruzamiento con glutaraldehído), o por insolubilización del anticuerpo anti-SMO mutante tras la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-SMO mutante y el SMO mutante, por ejemplo, por inmunoprecipitación.

Se entiende que cada una de las realizaciones anteriores de diagnóstico o detección se pueden llevar a cabo utilizando un inmunocóncugado de la invención en lugar de o en adición a un anticuerpo anti-SMO mutante.

B. Métodos para detectar 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 un ácido nucleico SMO en una muestra biológica. El término "detectando" como se utiliza en el presente documento engloba la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o un tejido, tal como un tejido tumoral.

En un aspecto, la invención proporciona un método para detectar la presencia de un ácido nucleico que codifica un SMO mutante en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto un 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 que permitan la hibridación en condiciones rigurosas, y detectar si se ha formado un complejo entre la sonda y la muestra de ácido nucleico.

El ácido nucleico SMO mutante se puede detectar utilizando cualquier metodología que se conocen en la técnica que incluye, pero no se limita al uso de sondas como se describe en el presente documento, o por amplificación por PCR, secuenciación por rtPCR, polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP), digestión de ADN por restricción diferencial, hibridación, o cualquier otro método conocido en la técnica.

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

Los trastornos a modo de ejemplo que se pueden diagnosticar utilizando un anticuerpo de la invención incluye, pero no se limita a meduloblastoma, cáncer pancreático, carcinoma de células basales.

C. Métodos de detección de SMO mutante en ensayos basados en células

El SMO mutante se puede detectar en ensayos basados en células como se conoce en la técnica incluyendo, pero no limitado a la unión de un anticuerpo de detección de SMO mutante a la superficie de una muestra celular, tal como una muestra de tumor *in vitro* por tinción inmunohistoquímica de preparaciones histológicas de preparaciones de muestras tumorales o tejido sospechoso de contener un SMO mutante. Los ensayos funcionales en los que una muestra de tejido se pone en contacto con GDC-0449 y una hedgehog para determinar si se produce la señalización Hh (por ejemplo, midiendo la activación de los componentes de la ruta, expresión de Gli, y similares). Cualquier ensayo funcional que utiliza la ruta de la señalización Hh que se puede alterar utilizando GDC-0449 se puede utilizar en un método de la invención para determinar la presencia de un 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 al SMO mutante. Sin quedar unidos a cualquier modo de operación, se espera que tanto de la manera en que el GDC-0449 se une al SMO de tipo silvestre y no se une al SMO mutante, un compuesto que actúa como un inhibidor de SMO mutante se debería unir al SMO mutante en la misma región de la parte del extremo carboxilo del dominio transmembrana n° 6 (TM6). Por lo tanto, se puede expresar esta región de la proteína SMO mutante y ejecutar ensayos de unión utilizando una biblioteca de compuestos por medios conocidos en la técnica. También se puede utilizar una biblioteca más pequeña de compuestos representa dos por variaciones de GDC-0449 utilizando una estrategia de modelado basada en los potenciales puntos de contacto de GDC-0449 y luego modelando puntos de contacto similares para el SMO mutante y variaciones de GDC-0449. Dichos

programas de modelado y los algoritmos pueden ser cualquiera de los que se conocen en la técnica. Los compuestos que se unen a SMO mutante y SMO tipo silvestre se pueden identificar que son inhibidores de ambos SMO mutante y tipo silvestre. Alternativamente, los compuestos se pueden descubrir porque se unen a SMO mutante, pero no se unen a SMO tipo silvestre y por tanto son solo inhibidores de SMO mutante.

En una realización, los compuestos que se van a cribar son compuestos de molécula pequeña tal como variantes de GDC-0449. En otras realizaciones, los compuestos que se unen a SMO mutante son anticuerpos que reconocen específicamente un epítipo que está en la misma región que el sitio de unión de GDC-0449 al SMO tipo silvestre. En una realización los anticuerpos se unen a una región en la parte del extremo carboxilo de TM6 de SMO mutante e inhibe la actividad de SMO.

Los compuestos pueden alternativamente, o adicionalmente cribarse por su capacidad para inhibir la actividad de SMO mutante. En estas realizaciones, se puede evaluar la capacidad de estos compuestos para inhibir la ruta de señalización de hedgehog en células que expresan el SMO mutante. Estos ensayos se pueden llevar a cabo en células que tienen una ruta de señalización hedgehog intacta pero que expresa un SMO recombinante que alberga la mutación en lugar de, o además del SMO tipo silvestre. En estos ensayos se determina la capacidad de la célula para tener señalización hedgehog activa cuando se incuba con hedgehog en presencia o ausencia del candidato a inhibidor. Si la señalización hedgehog se inhibe en presencia del compuesto candidato, dicho compuesto es un inhibidor de hedgehog. En algunas realizaciones, las células expresan solo SMO mutante y se puede incubar con un Hh y el inhibidor del candidato solo (es decir, en ausencia de GDC-0499). El compuesto es un inhibidor del SMO mutante si la señalización Hh se reduce o se inhibe en dichas células.

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

Se desvelan en el presente documento métodos para tratar a un paciente que tiene un tumor dependiente de la señalización de hedgehog que es resistente a compuestos quimioterápicos tales como GDC-0449 con un compuesto que se une a SMO mutante.

1. Métodos terapéuticos

Un anticuerpo de la invención se puede utilizar, 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*, el método comprende la exposición de una célula a un anticuerpo de la invención en condiciones que permiten la unión del anticuerpo a la SMO mutante. En ciertas realizaciones, la célula es una célula de leucemia mielógena, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer renal, y una célula de glioblastoma. En una realización, un anticuerpo de la invención se puede utilizar para inhibir una actividad de SMO mutante, el método comprende la exposición a un SMO mutante de un anticuerpo de manera que se inhibe la actividad del SMO mutante.

Se desvelan en el presente documento métodos para tratar el cáncer que comprende la administración a un individuo de una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención. Se desvela en el presente documento un método para tratar el cáncer que comprende la administración a un individuo de una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional, tal como las que se proporcionan posteriormente.

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

Dichas terapias de combinación señaladas anteriormente engloban la administración (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma formulación o por separado), y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención se puede producir antes, simultáneamente, y/o después, de la administración del agente terapéutico adicional y/o el adyuvante. Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar también en combinación con terapia por radiación.

Como se desvela en el presente documento, un anticuerpo de la invención se puede utilizar en un método para unir un SMO mutante en un individuo que padece un trastorno asociado con un aumento de expresión y/o actividad del SMO mutante, comprendiendo el método la administración al individuo del anticuerpo de manera que se une al SMO mutante. En una realización el SMO mutante es un SMO mutante humano, y el individuo es un ser humano.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico o adyuvante) se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo el parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra adecuadamente por infusión pulsada, particularmente con dosis descendentes del anticuerpo. La dosificación puede

ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

La localización de la diana de unión de un anticuerpo de la invención se tiene que tener en consideración en la preparación y administración del anticuerpo. Cuando la diana de unión es una molécula intracelular, ciertas realizaciones de la invención proporcionan que el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo se introduzca en la célula donde se localiza la diana a unir. En una realización, un anticuerpo de la invención se puede expresar intracelularmente como un intracuerpo. El término "intracuerpo", como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo o parte de unión al 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); Kontermann, Methods 34: 163-170 (2004); Patentes de EE. UU. N° 6.004.940 y 6.329.173; Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N° 2003/0104402, y Publicación PCT N° WO2003/077945. Véase también, por ejemplo, el documento WO96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996, que se refiere al uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

La expresión intracelular de un anticuerpo se puede efectuar introduciendo un ácido nucleico que codifica el anticuerpo deseado o una parte de unión al antígeno del mismo (que carece de la secuencia líder de tipo silvestre y las señales secretoras asociadas normalmente con el gen que codifica el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno) en una célula diana. Se pueden suministrar uno o más ácidos nucleicos que codifican todo o una parte de un anticuerpo de la invención a una célula diana, de manera que se expresen uno o más intracuerpos que sean capaces de unirse a un polipéptido diana intracelular y modular la actividad del polipéptido diana. Se puede utilizar cualquier método convencional para introducir ácidos nucleicos en una célula, incluyendo, pero si limitarse a, microinyección, inyección balística, electroporación, precipitación en fosfato cálcico, liposomas, y transfección con vectores retroviral, adenoviral, vírico adenoasociado y vacunales que portan el ácido nucleico de interés.

El ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) se puede introducir en las células del paciente, por métodos *in vivo* y *ex vivo*. En un ejemplo de suministro *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, por ejemplo en el sitio donde se necesita la intervención terapéutica. En un ejemplo adicional de suministro *in vivo*, el ácido nucleico se introduce en una célula utilizando la transfección con vectores víricos (tales como adenovirus, virus del herpes simple I, o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos /los lípidos adecuados para la transferencia del gen mediada por lípidos son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). Para una revisión de ciertos protocolos de marcación de genes y terapia génica, véase Anderson et al., Science 256: 808-813 (1992), y documento WO 93/25673 y las referencias citadas en el mismo. En un ejemplo de tratamiento *ex vivo*, una célula del paciente se retira, se introduce el ácido nucleico en las células aisladas, y las células modificadas se administran al paciente directamente o, por ejemplo, encapsuladas en membranas porosas que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N° 4.892.538 y 5.283.187). Un vector que se utiliza comúnmente para el suministro *ex vivo* de un ácido nucleico es un vector retroviral.

En una realización, se proporcionan anticuerpos de internalización. Los anticuerpos pueden poseer ciertas características que aumenten del suministro de los anticuerpos en las células, o se pueden modificar para poseer dichas características. Las técnicas para conseguir esto se conocen en la técnica. Por ejemplo, se sabe que la catiónización de un anticuerpo facilita su captación en las células (véase, por ejemplo la Patente de EE. UU. N° 6.703.019). También se pueden utilizar las lipofecciones o liposomas para suministrar el anticuerpo en las células. Cuando se utilizan 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, se pueden diseñar moléculas peptídicas que mantengan la capacidad para unirse a la secuencia proteica diana. Dichos péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o producirse por 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 la célula diana se puede aumentar por otros métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, ciertas secuencias, tales como las derivadas de VIH tat o la proteína del homeodominio Antennapedia son capaces de una captación directa eficaz de proteínas heterólogas a través de las membranas celulares. Véase, por ejemplo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96: 4325-4329.

Cuando la diana de unión de un anticuerpo se localiza en el cerebro, ciertas realizaciones de la invención proporcionan un anticuerpo que atraviesa la barrera hematoencefálica. Existen varias estrategias conocidas en la técnica para transportar moléculas a través de la barrera hematoencefálica, pero no se limitan a, métodos físicos, métodos basados en lípidos, métodos basados en células madre, y métodos basados en receptor y canal.

Los métodos físicos para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, rodear la barrera hematoencefálica completamente, o crear aperturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos de rodeo incluyen pero no se limitan a, inyección directa en el cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou et al., Gene Therapy 9: 398-406 (2002)), aumento de suministro de infusión intersticial/convección (véase, por ejemplo, Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994)), e implante de un dispositivo de suministro en el cerebro (véase, por ejemplo, Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos para crear aperturas en la barrera incluyen, pero no se limitan a, ultrasonidos (véase,

por ejemplo, Publicación de Patente de EE. UU. N° 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, por administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols. 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989)), permeabilización, por ejemplo, por bradiquinina o permeabilizador A-7 (véase, por ejemplo, Patentes de EE. UU. N° 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206, y 5.686.416), y transfección de neuronas que ocupan la berrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo (véase, por ejemplo, Publicación de Patente de EE. UU. N° 2003/0083299).

Los métodos basados en lípidos para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, encapsular el anticuerpo en liposomas que se acoplan a los fragmentos de unión al antígeno que se une a los receptores del endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Publicación de solicitud de Patente de EE. UU. N° 20020025313), y revestimiento del anticuerpo con partículas de lipoproteína de baja densidad (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N° 20040204354) o apolipoproteína E (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N° 20040131692).

Los métodos basados en células madre para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica conlleva la modificación génica de las células neurales progenitoras (NPC) para expresar el anticuerpo de interés y luego implantar las células madre en el cerebro del individuo que se va a tratar. Véase Behrstock et al. (2005) Gene Ther. 15 Dic. 2005, publicación adelantada en internet (que expone que las NPC modificadas genéticamente para que expresen el factor GDNF neurotrófico reducen los síntomas de la enfermedad de Parkinson cuando se implantaba en los cerebros de modelos de roedores y primates).

Los métodos basados en receptor y canal para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan al uso de bloqueadores glucocorticoides para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N° 2002/0065259, 2003/0162695, y 2005/0124533); canales de potasio activadores (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N° 2005/0089473), inhibición de transportadores farmacológicos ABC (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N° 2003/0073713); revestimiento de los anticuerpos con una transferrina y modulación de actividad de uno o más receptores de transferrina (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N° 2003/0129186), y cationizando los anticuerpos (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. N° 5.004.697).

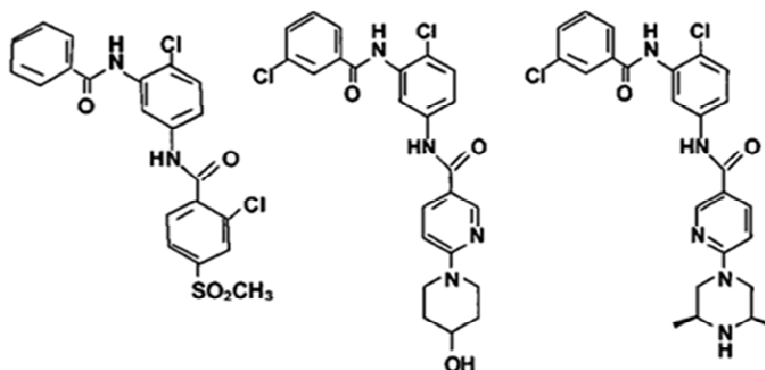
Los anticuerpos de la invención se formularían, dosificarían, y administrarían de manera consistente con las buenas prácticas médicas. Los factores para la consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero particular que se va a tratar, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, la programación de administración y otros factores conocidos por los médicos facultativos. El anticuerpo no necesita ser, pero se formula opcionalmente con uno o más agentes que se utilizan 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, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores expuestos anteriormente. Se utilizan generalmente en las mismas dosificaciones y con las vías de administración que se describen en el presente documento, o desde aproximadamente un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine apropiada empíricamente/clínicamente.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se utiliza sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerán del tipo de enfermedad a tratarse, el tipo de anticuerpo, la gravedad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, las terapias previas, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico encargado. El anticuerpo se administra al paciente adecuadamente de una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, de 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación inicial candidata para la administración al paciente, sea por ejemplo, por una o más administraciones por separado, o infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar desde aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se sostendría generalmente hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación a modo de ejemplo del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a 10 mg/kg. Por lo tanto, se pueden administrar 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 se pueden administrar 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). Se puede administrar una dosis de carga inicial más alta, seguida por una o más dosis más bajas. Un régimen de dosificación a modo de ejemplo comprende la administración de la dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido por una dosis semanal de mantenimiento de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por ensayos y técnicas convencionales.

Se entiende que cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores se pueden llevar a cabo utilizando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-SMO mutante.

Compuestos para tratar tumores resistentes a GDC-0449

Entre los compuestos de molécula pequeña que se pueden utilizar para tratar los tumores resistentes a GDC-0449 debido a una mutación en la posición del aminoácido 473 de smoothened están los siguientes:



Fórmula I

Fórmula II

Fórmula III

La molécula pequeña se proporciona en una cantidad eficaz para inhibir la actividad del SMO mutante sin producir efectos no deseados en el sujeto al que se administra el compuesto. El compuesto se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo el parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea un tratamiento local, la administración intralésional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como las inyecciones intravenosa o subcutánea, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

Los compuestos de la invención se pueden administrar con un inhibidor de PI3K. La administración del inhibidor de PI3K evita o retrasa mutagénesis adicionales de la proteína SMO y la resistencia adquirida a inhibidores de Smo. Los inhibidores de PI3K adecuados incluyen cualquiera conocido en la técnica incluyendo pero sin limitación los que se describen en Maira S-M et al. (2009) "PI3K Inhibitors for Cancer Treatment: Where Do We Stand?" Biochem. Soc. Trans. 37: 265-272.

Ejemplos

Introducción

Se ha demostrado recientemente que el tratamiento de un paciente de meduloblastoma que alberga una enfermedad metastásica diseminada con el nuevo inhibidor de la ruta Hh, el GDC-0449, daba como resultado una respuesta drástica y rápida al tratamiento (Charles M. Rudin et al. (2009) N. Engl. J. Med. 361: 1173-1178). El GDC-0449 se dirige al receptor tipo acoplado a Proteína G, Smoothened (SMO) que se convierte en activado 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 de este tumor meduloblastoma primario y metastático del paciente tomado antes del tratamiento con GDC-0449 revelaba una mutación somática subyacente en PTCH1 (PTCH1-W844C), así como la expresión regulada positivamente de los genes diana de la ruta Hh, apoyando la hipótesis de que el tumor se dirigía por una señal Hh mal regulada (C. M. Rudin et al. (2009) N. Engl. J. Med. 361: 1173-1178) **Fig. 4**. La mutación PTCH1-W844C no era capaz de suprimir la actividad de SMO que responde a Hh, la línea celular indicadora con GLLuciferasa (fibroblastos C3H10T©) cuando se co-transfectaba junto con la SMO de tipo silvestre (TS), indicaba que esta mutación específica puede inhibir la capacidad de PTCH1 para reprimir el SMO y por lo tanto da lugar a una activación aberrante independiente de ligando de la ruta Hh (**Fig. 5**). A pesar de la disminución del tumor marcado que se observaba inicialmente en este paciente, los escáneres PET tomados ~ 3 meses después del inicio del tratamiento indicaban una progresión de la enfermedad. Se obtuvo un aspirado con agua fina de una lesión en progreso para la confirmación de la recurrencia de la enfermedad y para el perfil molecular posterior para cribar mecanismos de resistencia adquirida a GDC-0449. La secuenciación de PTCH1 confirmada la presencia de la mutación homocigota PTCH1-W844C detectada previamente, acompañada por pérdida de heterocigosidad (**Fig. 4**).

Para caracterizar el mecanismo de recidiva, en la presente solicitud, los inventores evaluaron el estado de componentes conocidos de la ruta Hh que incluye el SMO, la diana directa de GDC-0449.

Materiales y métodos

Reactivos y construcciones. Se adquirió la KAAD-Ciclopamina en Toronto Research Chemicals Inc. (nº de cat. K171000). el GDC-0449 se produjo en Genentech (A. Molckovsky y L.L. Siu (2008) J. Hematol. Oncol. 1: 20). Todos los inhibidores de Hh se almacenaron en reservas de 30 mM en un 100 % de DMSO (Sigma) a -20 °C. El SMO humano, PTCH1 humano (variante de transcripción 1b, GenBank NM_000264.3) y eGFP se clonaron en pRK5 (BD Biosciences) y se expresaron a partir del promotor CMV. Las mutaciones puntuales se introdujeron con el Kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange II de Stratagene (nº de cat. 200524), y se introdujo el marcador FLAG en el extremo carboxilo del SMO de tipo silvestre y mutante humanos por PCR utilizando ADN Polimerasa Taq Platino de Invitrogen (nº de cat. 11304-011) (Murone et al. (1999) Curr Biol. 9: 76-84) descrito previamente en Gli-BS con indicador luciferasa de Hh y el plásmido de control de transfección Renilla (pRL-TK) son de Promega (nº de cat. E2241). Todas las construcciones se confirmaron por secuenciación.

Mutagénesis por cribado de alanina. Los mutantes SMO se generaron a partir de pRK5-SMO como se ha descrito anteriormente. Las alaninas se mutaron con leucina (CTG), mientras que los otros restos se mutaron a alanina (GCA).

Estado genético de la ruta Hedgehog. Los exones que cubren la fase de lectura abierta de SMO/SMO del ratón y humano, además del exón 15 de PTCH1, se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico utilizando un par de cebadores hibridados. El par interno de cebadores utilizados en la amplificación contenían las secuencias m13 de cebador directo o m13 inverso. Tras la PCR, los nucleótidos libres y el exceso de cebador se eliminaron utilizando el kit ExoSAP-IT (USB); los productos de la PCR se secuenciaron en ambas direcciones utilizando los cebadores de secuenciación m13. Los productos de la PCR se secuenciaron en ciclo utilizando el Kit BigTerminator (Applied Biosystems). Todos los productos de la secuenciación se disolvieron en una máquina de secuenciación 3730x1 ((Applied Bio-systems). Los archivos de traza de secuencia se analizaron utilizando Sequencher (GeneCodes) y/o el Mutation Surveyor (SoftGenetics LLC). La mutación SMO D473H se confirmó adicionalmente por extensión de cebador y espectroscopia de masas MALDO-TOF del ADN amplificado (MassARRAY, Sequenom, San Diego, California). Se utilizaron los siguientes cebadores: cebador extendido (UEP.D473H): TCAGCTGCCACTTCTAC (5081,3 Da) (SEQ ID NO: 13); Analito G: TCAGCTGCCACTTCTACG (5368,5 Da) (SEQ ID NO: 14); Analito C: TCAGCTGCCACTTCTACC (5328,5 Da) (SEQ ID NO: 15). La mutación SMO D473H se informó previamente como un SNP raro (ref. SNP ID: rs17710891), sin embargo los inventores fueron incapaces de confirmar este genotipo en el ADN obtenido del individuo afectado o su genealogía.

Secuenciación profunda. La región que rodea el sitio mutacional del exón 8 de SMO se amplificó por PCR a partir del ADN de la biopsia de la enfermedad primaria, el ADN de la biopsia de la enfermedad metastática y un ADN de control normal (Promega, WI), se agruparon y analizaron en un Analizador de Genoma Illumina. Se añadió un código de barras de secuencia 'AACGCA' para el ADN de la enfermedad primaria, 'AACTGC' para el ADN de la enfermedad metastática y 'AAGCCT' para el ADN normal se añadió como parte del proceso PCR y esta secuencia se utilizó para ordenar las secuencias en las tres categorías tras la secuenciación. Un total de 57 millones de lecturas de 36 pb que cubrían la región diana se analizó por la presencia del alelo mutado (G>C). Los inventores alinearon un 93,5 % de las lecturas cortas con la diana, que necesitaba una coincidencia perfecta con uno de los tres códigos de barras, y permitían dos faltas de coincidencia después de enmascarar la posición del alelo mutante. Se llevaron a cabo los alineamientos utilizando MAQ con los criterios por defecto para filtrar los alineamientos de poca calidad (s1). El análisis se restringía a las bases que tenían una puntuación de calidad de ≥ 30 , y en cada posición, se computó la proporción de lecturas que contenían variantes alélicas. El alelo mutante G>C de interés existía en el 0,029 % de las lecturas en las muestras primarias (de 11,2 millones de lecturas con calidad ≥ 30), el 0,02 % en la muestra metastática (de 13,7 millones de lecturas), y el 0,02 % en la muestra normal (de 10,2 millones de lecturas). Utilizando la región del código de barras y la secuencia fuera de la posición de interés los inventores estimaron que la tasa de error de fondo de secuenciación era del 0,02 %, que representa el umbral de detección utilizando esta tecnología. Un ensayo binomial ($p \sim 0$) excluye la presencia del alelo mutante en un nivel del 0,1 % o mayor en cualquiera de las muestras.

Ensayos de Luciferasa indicadora. Se sembraron células C3H10T1/2 (ATCC, nº de cat. CCL-226) en placas de seis pocillos a $1,5 \times 10^5$ células/pocillo en DMEM alto en glucosa con 4 mM de glutamina, 10 mM de Hepes pH 7,2 y un 10 % de FBS la tarde anterior a la transfección. Las células se transfectaron la mañana siguiente con 400 ng de la construcción de expresión, 400 ng de Gli-BS y 200 ng de pRL-TK por pocillo utilizando el Reactivo de transfección GeneJuice (Novagen, nº de cat. 70967). Para los experimentos de inhibición de PTCH1, las células se transfectaron con unos 200 ng adicionales de ADN que contenía distintas proporciones de construcciones de expresión PTCH1 respecto a eGFP. Para los ensayos de indicador NF-KB y SV40, se sustituyó el Gli-BS con pGL4.32 o promotor pGL3. Seis horas más tarde, se recolectaron las células por tratamiento con tripsina y cada pocillo se redistribuyó sobre cuatro pocillos de una placa de 12 pocillos. El contenido de FBS del medio de cultivo se redujo hasta un 0,5 % a la mañana siguiente para inducir la formación de cilios primarios, y se añadieron los inhibidores de Hh de molécula pequeña en las concentraciones indicadas. Se determinó la actividad de luciferasa 48 horas más tarde con el Sistema de ensayo luciferasa Dual-Glo (Promega, nº de cat. E2940). Se dividieron los valores por las actividades de luciferasa Renilla para normalizarlas con la eficacia de transfección y se muestra como la media de tres experimentos separados ± 1 desviación estándar.

Ensayo de *Gli*-luciferasa indicadora par mutantes D473 (todas las posibilidades de aminoácidos). Los ensayos de *Gli*-luciferasa indicadora se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente (Rudin, C.M. et al. (2009) N. Engl. J. Med. 361: 1173-1178) con las siguientes modificaciones; las células C3H10T1/2 (ATCC, CCL-226) se sembraron en placas de seis pocillos a $1,85 \times 10^5$ células/pocillo y los valores se muestran como la media de cuatro experimentos por separado ± 1 desviación estándar (SD).

Ensayos de unión a [^3H]-GDC-0449. SE transfectaron células HEK-293 con las construcciones de expresión de SMO, se recolectaron, fijaron y lavaron como se había descrito anteriormente. Las células se re-suspendieron en PBS, se sembraron en placas de seis pocillos (2×10^6 células/pocillo) y se incubaron durante 1 h a 37°C con 5 nM de [^3H]-GDC-0449 (0,05 μCi /pocillo; Tritec, Teufen, Switzerland) en presencia o ausencia de $50 \mu\text{M}$ de GDC-0449 sin marcar. Las células se transfirieron a placas filtro Perkin Elmer n° 6005174) utilizando un recolector celular (Wallac) y se lavó 5 veces con agua. Las placas se secaron y la radioactividad unida se midió utilizando un contador de centelleo Topcount y un coctel de centelleo Microscint-20 (ambos de Perkin Elmer). Los datos se presentaron como recuentos brutos, o se normalizaron a SMO-TS tras la sustracción de los valores de fondo (que se obtenían de células sin transfectar).

Análisis FACS de los SMO mutantes. Se llevó a cabo el análisis FACS para determinar la expresión de SMO mutantes de la superficie celular como se ha descrito anteriormente. El porcentaje de células positivas a SMO se normalizó respecto a los controles SMO-TS.

Transferencia de western para la expresión de SMO y Flag en células 10T1/2. Las células 10T1/2 se transfectaron transitoriamente utilizando el reactivo de transfección Genejuice (Novagen 70967) con SMO TS, SMO mut, o vector pRK5 vacío durante 48 horas. Se llevó a cabo la transferencia de western utilizando los métodos publicados convencionales utilizando un gel Glicina-Tris al 4-12 % y una membrana de nitrocelulosa. Se detectó la proteína utilizando un anticuerpo M2 anti-Flag (Sigma F3165) con un Alexa 488 secundario anti-ratón (Molecular Probes A11001). Las transferencias se visualizaron por fluorescencia utilizando un Trio Typhoon de Amersham Biosciences. Para el análisis FACS, las células transfectadas se desalojaron en 1 mM de EDTA/PBS y posteriormente se incubaron con un anticuerpo SMO 2D11 ($\mu\text{g/ml}$) seguido por incubaciones de 20 min con AffiniPure de cabra anti-IgG de ratón conjugado con SP-biotina (1:100, Jackson ImmunoResearch Labs 115-065-071) y Estreptavidina conjugada con R-Ficoeritrina (1:50, Jackson ImmunoResearch Labs 016-110-084). Tras la re-suspensión en PI (500 ng/ml), las células se analizaron utilizando un FacsCalibur HTS de BD Biosciences.

Unión y competición de ^{14}C -GDC0449. Se transfectaron transitoriamente células 293 utilizando Genejuice con SMO TS o SMO mut durante 48 horas. Tras la recolección en 1 mM de EDTA en PBS, se fijaron 10 millones de células con un 4 % de PFA durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavó 3x con 1 mM de EDTA en PBS y luego se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con ^{14}C -GDC0449 (5 nM), con o sin $50 \mu\text{M}$ de GDC-0449 frío. Las células se lavaron 3x con PBS y luego se transfirieron a un vial de centelleo. Se añadieron 15 ml de PicoFluor 40 y se evaluaron los recuentos por minuto utilizando un analizador líquido de centelleo PerkinElmer Tri-Carb 2900TR. Todas las muestras se hicieron por triplicado.

Generación de modelos de meduloblastoma de ratón de la resistencia a GDC-0449. Comenzando a las 4 semanas de edad, los ratones Ptch1^{-/-};p53^{-/-} en un entorno C57BL/6 se controlaron semanalmente por la presencia de meduloblastomas por MRI. Todos los ratones se controlaron diariamente por signos de comportamiento anormal indicativo de implicación del SNC. Los ratones con tumores bien definidos detectados por MRI se sacrificaron y se disecaron los tumores del cerebelo normal, se disociaron mecánicamente, y se inyectaron 5×10^6 células en la región torácica lateral de ratones desnudos CD-1 (CRL). Se permitió que los tumores progresaran hasta aproximadamente 400 mm^3 de tamaño en cuyo momento se trataron los ratones con 75 mg/kg de GDC-0449 (equivalentes de base libre) una vez al día hasta que los tumores disminuían de tamaño a aproximadamente 100 mm^3 . A los ratones se les dio entonces un descanso en la dosificación hasta que se producía el re-crecimiento. Se aplicaron rondas secuenciales de tratamiento y re-crecimiento hasta que los tumores no respondían más a la dosificación diaria en cuyo momento la frecuencia se incrementó a dos veces al día a 75 mg/kg. La resistencia se desarrollaba a las 7-10 semanas en estos modelos los que sugería que la dosis subóptima de GDC-0449 podía llevar rápidamente a la resistencia. Los tumores que no respondían a esta dosis y frecuencia se recolectaron entonces para el análisis molecular y al pasaje (primer pasaje) subcutáneamente en ratones adicionales para la expansión. Con el fin de analizar la modulación de la ruta en la respuesta a GDC-0449, los ratones que albergaban los tumores en el segundo pasaje se dosificaron una vez con 75 mg/kg de GDC-0449 y se recolectaron 6 horas tras la dosis para el análisis. Todos los ratones se albergaron y mantuvieron de acuerdo con las normas de uso de animales de Genentech, Inc., conformes con las prácticas legales y éticas del estado de California. Referencias para la Fig. 4: H. Li, J. Ruan y R. Durbin (2008) Genome Res. 18: 1851.

Estudios farmacocinéticos en ratón. Los estudios farmacocinéticos en ratón con los compuestos 4 y 5 se llevaron a cabo esencialmente como se describe para el GDC-0449 (Wong H., et al. (2009) Xenobiotica 39: 850-861). En resumen, se les dieron a 24 ratones CD-1 hembras que pesaban entre 25 y 33 g al inicio del estudio una dosis única oral de 100 mg kg^{-1} del compuesto 4 o 5 como una suspensión en un 0,5 % de metilcelulosa con un 0,2 % de Tween-80 (MCT). Se recolectaron muestras de sangre ($n = 3$ ratones por punto de tiempo) en tubos que contenían EDTA como anticoagulante por punción cardíaca terminal bajo isoflurano en los siguientes puntos de tiempo: 5, 15

y 30 min; y 1, 3, 6, 9 y 24 h tras la dosis. Las muestras de sangre se centrifugaron para recolectar el plasma, que se almacenó a -80 °C hasta que se cuantificaran las concentraciones de fármaco por LC/MS/MS.

Tratamiento farmacológico de animales con aloinjertos de MB. Los animales portadores de tumor se generaron por medio de propagación en serie en líneas tumorales MB de *Ptch+/-;p53-/-* murinas (Wetmore C. et al. (2001) Cancer Res. 61: 513-516). Los tumores subcutáneos de 1500-2000 mm³ se extirparon de los ratones donantes en condiciones asépticas, se molieron en DMEM alto en glucosa por loncheado y machacado con dos bisturís del nº 10 y se pasaron por medio de un tamiz de disociación celular (Sigma, CD1-1KT). La suspensión resultante de células únicas se lavó dos veces en DMEM alto en glucosa y se filtró a través de un filtro de nilón de 70 µm (BD Falcon) antes del recuento en un analizador de viabilidad celular Vi-CELL (Beckman Coulter). Aproximadamente 2,5-4 x 10⁶ células vivas en un volumen de 100 µl se inyectaron subcutáneamente en el tórax lateral derecho de ratones CD-1 desnudos hembra de 7-10 semanas de edad (CRL). Las dimensiones del tumor se midieron utilizando calibres Ultra Cal IV (Fred V. Fowler Company Inc., Newton, MA) y se calculó el volumen tumoral utilizando la fórmula $v = 0,5 \times a \times b^2$, donde a y b son los diámetros perpendiculares menor y mayor, respectivamente. Cuando los tumores alcanzaban 125-350 mm³ de volumen, los animales se separaron en grupos de tratamiento con tumores de tamaño similar y se inició la administración del fármaco. Los compuestos se formularon en MCT y se administró oralmente a los ratones 0,2 ml de cada vehículo dos veces al día, compuesto 5 a 100 mg kg⁻¹ una vez al día, o HhAntag a 100 mg kg⁻¹ dos veces al día para el estudio HPI, y el vehículo o el fármaco a 8 a 10 mg kg⁻¹ una vez al día para el estudio del inhibidor PI3K. Se practicó la eutanasia en los ratones si los tumores excedían los 2000 mm³ y/o si su peso corporal caía > 20 %. Todos los ratones se albergaron y mantuvieron de acuerdo con las normas de uso de animales de Genentech Inc., conformes con las prácticas legales y éticas del estado de California.

Métodos estadísticos. Las curvas de crecimiento ajustadas se derivaron utilizando el paquete 'nlme' de efecto mixto no lineal, versión 3.1-96 (Pinheiro J. et al. (2009) Package 'nlme', versión 3.1-96) en R versión 2.9.2 (R Development Core Team 2008; R Foundation for Statistical Computing; Viena, Austria).

Aislamiento de ARN y qRT-PCR. El ARN total se extrajo de los tumores utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen 74106). La concentración de ARN se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop y se llevó a cabo la qRT-PCR con 100 ng de ARN en un termociclador 7500 de Applied Biosystems. Los niveles de expresión se normalizaron a Rpl y se presentaron como valores de expresión génica normalizada (2 Δ Ct). Se adquirió un ensayo de expresión génica TaqMan para *Gli1* en Applied Biosystems, para el cual la sonda (ID de ensayo: Mm00494646_g1) abarcaba el exón 3-4 fronterizo. Las secuencias de cebador y sonda para Rpl19 son D: 5'-AGAAGGTGACCTGGATGAGA-3' (SEQ ID NO: 10), I: 5'-TGATACATATGGCGGTC AATCT-3' (SEQ ID NO: 11) y P: 5'-CTTCTCAGGAGATACCGGGA ATCCAAG-3' (SEQ ID NO: 12).

Inmunotinción de Smo. Se colocaron en placas células S12 hasta la confluencia y se privaron de suero durante 16 h $\pm$ 200 ng/ml de octil-Shh en presencia de niveles saturantes de compuesto (5 µM de ciclopamina, 1 µM de los otros). Las células se fijaron entonces en un 100 % de metanol, se tiñeron con anti-Smo (5928B, un pAb de conejo que se produce contra la cola del extremo C del Smo de ratón (Wen X. et al. (2010) Mol. Cell. Biol. 30: 1910-1922) y se detectó con Cy3-anti-conejo [Jackson ImmunoResearch] así como anti-tubulinas acetiladas y anti-tubulinas gamma (mAb 6-11B-1 y GTU88 respectivamente, co-detectado con FITC anti-ratón [todas de Jackson ImmunoResearch] y se visualizó como se ha descrito (Wen X. et al. (2010) Mol. Cell. Biol. 30: 1910-1922). SE analizaron al menos 200 cilios de tres o más experimentos independientes en cuanto a la tinción robusta de Smo a lo largo de todo el eje del ciclo (excluyendo la que tenían señales débiles o la tinción confinada a la base).

Estado génico de la ruta Hh. El ADN genómico se aisló a partir de los tumores con el Kit AllPrep DNA/RNA Mini (Qiagen) y cada exón *Smo*, *Sufu*, y *Gli2* murinos se amplificaron por PCR utilizando un par de cebadores hibridados que contenían secuencias directas e inversas M 13. El exceso de cebadores y los nucleótidos libres se retiraron con el kit ExoSAP-IT (USB) y los productos de la PCR se secuenciaron en ciclos en ambas direcciones utilizando cebadores M13 secuenciadores, un kit BigDye Terminator v3.1 y un analizador de ADN 3730x1 (ambos de Applied Biosystems). Los archivos de secuencia se analizaron utilizando el software Sequencher (GeneCodes) y Mutation Surveyor (SoftGenetics LLC).

Análisis de número de copias génicas. El ADN del tumor se marcó e hibridó a las micromatrices 244K CGH de Genoma de Ratón (Agilent) con los protocolos recomendados por el fabricante, utilizando un ADN genómico de ratón diploide normal como referencia. Los datos se normalizaron con el Software Feature Extraction v9.5 (Agilent) y las regiones de copias de número variable se llamaron en Nexus 4.0.1 (Biodiscovery) utilizando un algoritmo de segmentación de intervalo. Un umbral arbitrario para ganancia del número de copias se fijó como los valores de la relación log2 de 0,6, con un mínimo de 5 sondas por segmento. La ganancia de número de copias se confirmó por PCR cuantitativa (qPCR) en un instrumento qPCR MX3000P (Stratagene) utilizando 25 ng de ADN genómico/reacción. Se compararon los loci diana con elementos murinos SINE1 y se cuantificó en curvas de referencia de ADN de ratón diploide normal como se ha descrito (Zhao X. et al. (2004) Cancer Res. 64: 3060-3071) utilizando los siguientes cebadores:

Gli2 D: 5'- GCAGGACATTCCACACAGTTCTTG-3' (SEQ ID NO: 4),
Gli2 I: 5'-ATAGGTGCTGGGATACAGGC TTG-3' (SEQ ID NO: 5),

Ccnd1 D: 5'-TACCCTGACACCAATCTCCTCAACG-3' (SEQ ID NO: 6),
 Ccnd1 I: 5'-GGAATTCCCATCTTCCCAACTCC-3' (SEQ ID NO: 7),
 Sine1 D: 5'-AGATGGCTGAGTGGGTAAAGG-3' (SEQ ID NO: 8) y
 Sine1 I: 5'-GTGGAGGTCAGAGGACAACTT-3' (SEQ ID NO: 9).

Inmunotransferencia. Las muestras de tumor congeladas se lisaron en el reactivo de extracción proteica en mamíferos M-PER (Pierce) que contenía proteasa e inhibidores de fosfatasa. Los lisados se separaron en un 4-12 % de geles Bis-Tris y las proteínas se transfirieron en membranas PVDF con un iBlot (Invitrogen). Las transferencias se bloquearon e incubaron durante una noche a 4 °C con un 5 % de leche que contenía uno de los siguientes anticuerpos primarios; anti-ciclina D1 (Cell Signaling, nº 2922), anti-fosfo(Ser473)-AKT (Cell Signaling, nº 4060), anti-total AKT (Cell Signaling nº 9272), anti-Gli2 (Cho A. et al. (2008) Dev. Biol. 321: 27-39), o anti-actina (Santa Cruz Biotechnology, sc- 47778), seguido por una incubación de 1 h a TA con anticuerpos secundarios conjugados con HRP. Las interacciones antígeno-anticuerpo se visualizaron con el sustrato de duración extendida West Dura (Pierce).

Ejemplo 1

Análisis de Mutación D473H. Los inventores no detectaron amplificación del locus SMO en el espécimen del paciente de meduloblastoma (**Fig. 6**), pero identificaron una mutación heterocigota de G a C en la posición 1417, que se prevé que cambia el codón 473 de Asp a His (**Fig. 1A**). Este cambio no se detectaba en el espécimen de la enfermedad primaria. Utilizando el genotipado basado en espectrometría de masas, los inventores detectaron el alelo mutante solo en la biopsia tomada tras la recidiva, pero no en la piel normal de este individuo o en las biopsias de enfermedad primaria y metastática tomadas antes del tratamiento con GDC-0449 (**Fig. 7**). Por secuenciación profunda, no se detectó el alelo mutante con una frecuencia de alelo de $\geq 0,1$ % en la biopsia primaria o metastática que se obtenían antes del tratamiento con GDC-0449. El alelo mutante tampoco se detectaba por genotipado basado en espectrometría de masas de 64 especímenes de meduloblastoma depositados.

Para estudiar las consecuencias funcionales de esta mutación, los inventores co-transfectaron células C3H10T© con los vectores de expresión que codificaban SMO-TS o SMO-D473H junto con una construcción indicadora de GLI-luciferasa que responde a Hh. El SMO-TS y SMO-D473H se expresaban a niveles similares como se determinó por transferencia de western (**Fig. 8**) y análisis FACS (**Fig. 9**). La transfección de SMO-D473H inducía la actividad de la ruta Hh a niveles comparables a los que se veían con SMO-TS, lo que demuestra que SMO-D473H es completamente capaz de activar la señalización Hh (**Fig. 2A**). Sin embargo, por el contrario con el mutante SMO-M2 constitutivamente activo (J. Xie et al. (1998) Nature 391: 90), la actividad de SMO-D473H no era significativamente mayor que la de SMO-TS, y demostraba una sensibilidad similar que SMO-TS a PTCH1, sugiriendo que el SMO-D473H no tiene un potencial oncogénico inherente y solamente activará la señalización Hh en ausencia de PTCH1. Para determinar si esta mutación impide la capacidad de GDC-0449 para inhibir la señalización de Hh, la concentración máxima mitad (CI50) de fármaco necesario para inhibir la actividad indicadora de GLI-luciferasa se midió (**Fig. 2B**). Aunque el GDC-0449 inhibía la actividad indicadora a una IC50 de 20 nM en células transfectadas con SMO-TS, no se observaba inhibición en las células transfectadas con SMO-D473H incluso a concentraciones de 3 μ M; indicando que esta mutación confiere resistencia al GDC-0449 sin afectar su capacidad para transmitir la señal Hh. El SMO-D473H también altera la capacidad de un inhibidor de SMO divergente químicamente, KAAD-ciclopamina (J. Taipale et al. (2000) Nature 406: 1005), para inhibir la actividad indicadora de GLI-luciferasa con un cambio de 43 veces en la CI50 (**Fig. 10**).

Ejemplo 2

Análisis funcional de la mutación D473H. En este estudio, los inventores se dirigieron a si la mutación SMO-D473H afectaba la capacidad de receptor para unirse a GDC-0449.

Mientras que el GDC-0449 marcado con 14 C se unía específicamente al SMO-TS, no mostraba una unión específica a SMO-D473H (**Fig. 2C**). Por lo tanto la incapacidad de GDC-0449 para suprimir la señalización Hh en el contexto de la mutación SMO-D473H se asocia con una deficiencia de unión al fármaco.

Para cribar adicionalmente los mecanismos potenciales de la resistencia a GDC-0449 en el meduloblastoma *in vivo*, los inventores desarrollaron derivados resistentes de aloinjertos subcutáneos de tumores de ratones Ptch1 $^{-/-}$;p53 $^{-/-}$ (J. T. Romer et al. (2004) Cancer Cell 6: 229) mediante dosificación intermitente hasta que los tumores no respondían más a una dosificación de dos veces al día de GDC-0449. Utilizando esta estrategia los inventores establecieron tres líneas tumorales resistentes al fármaco separadas, de las que se describe en el presente documento un modelo (SG274) (**Fig. 3A**). La secuenciación del Smo del modelo SG274 revelaba una mutación sin sentido heterocigota A a G en la posición 1944, que resulta en el cambio del ácido aspártico 477 en glicina (D477G), que no se identificó en el modelo parental, sensible a GDC-0449 (**Fig. 3B**). Sorprendentemente, el resto correspondiente en el SMO humano es el ácido aspártico en la posición 473 que se mutaba en el paciente de meduloblastoma recidivado (**Fig. 11**). El GDC-0449 mostró una disminución de 100 veces en la capacidad para suprimir la señalización Hh en células que expresan ectópicamente la variante glicina en esta posición en comparación con el TS (**Fig. 3C**).

Además, el GDC-0449 no suprimía la señalización Hh *in vivo*, como se demuestra por la incapacidad de GDC-0449 para regular negativamente los niveles de Gli1 en tumores SG274 implantados subcutáneamente en ratones (**Fig. 3D**). Los datos de este modelo de ratón proporciona por lo tanto una prueba adicional que la mutación de SMO en este resto específico de ácido aspártico puede conferir resistencia a GDC-0449. Existen mecanismos adicionales de resistencia a GDC-0449, ya que no se identificaron mutaciones de Smo en los otros 2 modelos.

La predicción de topología y el modelado estructural del SMO mapea el resto Asp-473 en el extremo C del sexto segmento transmembrana (TM6), una posición que está altamente conservada a lo largo de los ortólogos SMO y la familia Frizzled relacionada de receptores Wnt (**Fig. 1B, Fig.12**). Se necesita la estructura heptahelicoide de SMO para unirse a la ciclopamina (J. Chen K. et al. (2002) Genes Dev. 16: 2743) y es la diana para los moduladores GPCR orto y alostéricos (Goudet et al. (2004) Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies 1: 125). Como el Asp-473 se posiciona en el labio extracelular de la cavidad central formada por la arquitectura GPCR canónica (Rosenbaum, D.M. et al. (2009) Nature 459: 356) de SMO, la mutación no conservadora de este resto puede potencialmente desestabilizar el empaquetamiento de ectobucles de SMO en la topografía interna del bolsillo de unión protegido.

El estudio de los inventores muestra que las proteínas GPCR pueden convertirse en resistentes al fármaco mediante la adquisición de mutaciones génicas. Estos hallazgos tienen implicaciones directas en el desarrollo clínico de inhibidores del SMO en tumores en los que la ruta Hh ha mutado, y puede ser aplicable para las futuras dianas GPCR en el cáncer como muchos han demostrado que tuene un papel crítico en el crecimiento y metástasis tumorales (R.T. Dorsam y J.S. Gutkind (2007) Nat. Rev. Cancer 7: 79). Además, la demostración de que estas mutaciones no tienen un impacto en la señalización de Hh sigue apoyando el razonamiento para dirigirse a esta ruta, pero también resalta la necesidad de identificar una segunda generación de inhibidores de SMO capaces de superar la resistencia adquirida, identificar los inhibidores que se dirijan a las moléculas de señalización corriente abajo (J.M. Hyman et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106(33): 14132-14137), o iniciar potencialmente un tratamiento precoz, antes de la terapia con radiación u otros agentes perjudiciales para el ADN.

Ejemplo 3

El D473 es importante para la actividad de SMO y la inhibición por GDC-0449. Para caracterizar mejor el papel de D473 en la función de SMO, los inventores sustituyeron este resto con cada aminoácido y analizaron los mutantes resultantes en un ensayo de indicador *Gli*-luciferasa en presencia o ausencia de 1 μ M de GDC-0449 (**Fig. 13A; Fig. 18A**). Aparte de la posibilidad de SMO-D473P mal plegado, todos los mutantes inducían actividad de la ruta Hh y eran menos sensibles a la inhibición de GDC-0449 que el SMO-TS. El mutante D473V que aparentemente respondía era parcialmente resistente al fármaco en un ensayo de respuesta a la dosis (**Fig. 18B**). Sorprendentemente, el mutante SMO-D473E también era resistente a GDC-0449 incluso cuando esta sustitución conservadora mantenía una carga negativa en esta posición. Los inventores luego confirmaron la expresión de superficie celular para varios de estos mutantes (**Fig. 18C**) y se ensayaron en cuanto a su capacidad para unirse a GDC-0449 (**Fig. 13B**). Al igual que con SMO-D473H, la resistencia a este HPI se correlacionaba con la carencia de unión a SMO.

Este ensayo es sensible a incluso cambios pequeños en la afinidad al fármaco de SMO, que puede explicar por qué el mutante SMO-D473V parecía ser deficiente a la unión con GDC-0449 pero puede inhibirse aún a altas concentraciones de fármaco. Colectivamente, estas observaciones sugieren fuertemente que el D473 es crítico para la inhibición de SMO por GDC-0449.

El D473 puede estar implicado directamente en la unión con GDC-0449 o simplemente puede necesitarse para mantener la conformación de SMO correcta para la unión. Varios mutantes incluyendo los de carga positiva tales como D473K y D473R, eran más activos que el SMO-TS y casi tan activos como el mutante SMO-M2 oncogénico (**Fig. 13A**; J. Xie et al. (1998) Nature 391: 90), que implican que el D473 podría ser un resto estructuralmente importante. Consistente con esta noción los mutantes SMO-D473K y el SMO-D473R tienen propiedades auto-activantes y son resistentes a la inhibición por PTCH1 (**Fig. 13C**). Sin embargo, se poco probable que sean oncogénicos de origen natural o mutantes resistentes a fármacos, ya que estas sustituciones de aminoácidos necesitan dos cambios de nucleótido.

Ejemplo 4

Un cribado de HPI químicamente distintos identifica varios antagonistas de SMO-D473H. Para identificar inhibidores del SMO mutante como agentes terapéuticos para los tumores resistentes a GDC-0449, los inventores cribaron en un panel de 53 antagonistas (los compuestos representativos se muestran en la **Fig. 14A**) con potente actividad contra la proteína de tipo silvestre (**Fig. 14B**). Estos compuestos se identificaron en cribados de alto rendimiento (ambos en el laboratorio y por otros) o se generaron por optimización "hit-to-lead" de prototipos cribados utilizando métodos de química medicinal tradicional. Las células C3H10T1/2 se co-transfectaron con los vectores de expresión SMO de tipo silvestre o mutantes junto con la construcción indicadora *Gli*-luciferasa (Murone M. et al. (1999) Curr Biol. 9: 76-84), y se midió la ruta de activación en presencia o ausencia de 1 μ M de compuesto. De manera interesante, el bencimidazol hHAntag (Romer J.T. et al. (2004) Cancer Cell 6: 229-240) era esencialmente

equipotente contra todos los alelos SMO a pesar de varias similitudes estructurales con GDC-0449, indicando sutiles diferencias en la relación de estructura y actividad (SAR) entre estos dos componentes.

Varios derivados del anillo C de amida de GDC-0449 presentaban poca potencia contra el SMO-D473H, como se ejemplifica por el compuesto 1 (al que se refiere en la Fig. 14A por la nomenclatura anillo A, B y C). Por el contrario, muchos derivados de anillo C de amida de HhAntag mantenían la potencia (datos no mostrados), demostrando 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 al inhibir este SMO mutante.

Respecto a otras sustituciones del anillo A, las quinazolininas (representadas por el compuesto 2) se encontraron que eran inactivos, mientras que el compuesto 3 (Fórmula I) mostraba una actividad medible a pesar de tener un anillo C idéntico a GDC-0449. Esta clase general de bis-amidas mostraba potencias mejoradas contra SMO-D473H una vez que se encontró el patrón de la sustitución óptima, ejemplificado por los compuestos 4 (Fórmula II) y 5 (Fórmula III).

Aunque el anillo C claramente contribuye a la inhibición de SMO-D473H, las observaciones de la SAR implican que las sustituciones en el anillo A pueden aumentar la potencia más drásticamente. específicamente, un anillo A con tanto un donante de enlaces hidrógenos y un receptor, como se encuentra en el bencimidazol del HhAntag y los compuestos bis-amida 3-5, se prefiere cuando la unión a SMO-D473H respecto a un receptor de enlace hidrógeno solo. Además, el SMO-D473H es parcialmente resistente al alcaloide vegetal natural ciclopamina y a la hircacina, SANT-1.

Aunque los inventores utilizaron rutinariamente el HhAntag como un compuesto de herramienta para bloquear la señalización Hh en ratones, este inhibidor es rápidamente metabolizado en hepatocitos humanos y por lo tanto no es adecuado como agente terapéutico (Stephen E. Gould, observación no publicada). Como el objetivo de los inventores era identificar un antagonista de SMO que pudiera ser capaz de superar la resistencia a GDC-0449 adquirida en clínica, los inventores centraron sus esfuerzos en los inhibidores de clase bis-amida. solo tres de los catorce fármacos candidatos de este grupo presentaban buenas propiedades farmacocinéticas en ratones (datos no mostrados). De estos, los inventores escogieron investigar adicionalmente para estos estudios el compuesto 5 (Fórmula III), que tiene una semivida (t_{1/2}) de aproximadamente 22 horas (Fig. 14C) y presenta la actividad más robusta contra tanto el tipo silvestre como para SMO-D473H, inhibiendo la actividad indicadora de *Gli*-luciferasa con una CI₅₀ de 300 nM y 700 nM respectivamente (Fig. 14D). Nótese que estos valores de CI₅₀ se sobrestiman debido a la sobre-expresión de SMO en este sistema de ensayo; aproximadamente es suficiente 10 veces menos de compuesto para inhibir el SMO endógeno después de la estimulación con el ligando Hh (datos no mostrados).

Ejemplo 5

El Compuesto 5 (Fórmula III) inhibe el crecimiento tumoral mediada por Smo resistente a GDC-0449. Era importante determinar si el compuesto 5 (Fórmula III) también podía inhibir la resistencia de Smo al fármaco *in vivo*. En este extremo, los inventores generaron ratones con aloinjertos subcutáneos de la línea celular murina MB Ptch^{+/-};p53^{-/-} que se había hecho resistente a GDC-0449 debido a una sustitución de aminoácidos D477G en Smo, el mismo resto de ácido aspártico que había mutado en el SMO humano. Estos ratones desarrollaron tumores de 125-350 mm³ en dos semanas, tras lo cual se inició el tratamiento farmacológico oral. Los ratones tratados con vehículo y GDC-0449 presentaban un crecimiento tumoral sin restricciones y se les tuvo que practicar la eutanasia después de 9 días de tratamiento para evitar una carga tumoral excesiva (Fig. 15A; datos no mostrados). Sorprendentemente, los tumores en los animales tratados con el compuesto 5 no solo detenían el crecimiento sino que incluso comenzaban a disminuirlo en relativamente poco tiempo. Esta inhibición del crecimiento tumoral se acompañaba por una regulación negativa de los niveles de ARNm *Gli1* (Fig. 15B), indicando que el compuesto 5 podía suprimir la señalización Hh mediada por el Smo resistente a GDC-0449 *in vivo*. Se obtuvieron resultados similares con HhAntag.

Ejemplo 6

El GDC-0449 y el Compuesto 5 interfieren tanto con la translocación de Smo al cilio primario. Recientemente, varios grupos expusieron que diversos antagonistas afectan diferencialmente al tráfico y localización de Smo en el cilio primario (Wilson C.W. et al. (2009) PLoS One 4: e5182; Wang Y. et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 2623-2628; Rohatgi R. et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 3196-201). Se descubrió que la ciclopamina promueve la acumulación ciliar de Smo en ausencia de señalización activa de Hh, mientras que otros inhibidores de Smo como SANT-1 en vez de evitar Shh y la translocación de Smo inducida por agonista a este orgánulo. Basándose en estas observaciones Rohatgi y sus colegas (Rohatgi R. et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 3196-201) propusieron un mecanismo en 2 etapas para la activación de Smo, en el que la activación completa de esta proteína necesita el transporte ciliar acoplado a una segunda etapa de activación aún sin identificar que permite al Smo involucrar la maquinaria de señalización corriente abajo en los cilios. Un concepto clave de su modelo es que el antagonista Smo se puede subdividir en dos clases; Inhibidores "tipo SANT-1" que tienen influencia sobre el tráfico de Smo a los cilios y los inhibidores "tipo ciclopamina" que afectan la etapa de activación. Los autores propusieron además que su modelo podía ser útil para superar la resistencia al fármaco, anticipando papeles complementarios para estas dos clases de antagonistas SMO en clínica debido a la falta de resistencia cruzada. Si

este modelo era correcto, entonces el GDC-0449 y los inhibidores de SMO mutante deberían afectar diferencialmente el tráfico del Smo a los cilios.

Para ensayar esto, los inventores incubaron células S12 confluentes (Frank-Kamenetsky M. et al. (2002) J. Biol. 1: 10) con los compuestos indicados durante 16 horas en ausencia o presencia de estimulación Hh, y determinar si el Smo endógeno está localizado en el marcador tubulina acetilada del cilio primario y/o en el marcador centrosómico y tubulina (Fig. 15C y Fig. 15D). Las células de control (tratadas con DMSO) presentaban una tinción de Smo muy débil solo en pocos cilios. Como se había expuesto previamente, la estimulación con Shh o el agonista SAG de SMO (Chen J.K. et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 14071-14076) daba como resultado una robusta translocación de Smo al cilio primario, como hacía el tratamiento con ciclopamina. Como SANT-1, el GDC-0449 no promovía el enriquecimiento ciliar y evitaba la translocación de Smo inducida por Hh.

El compuesto 5 (Fórmula III) y HhAntag tenían efectos muy similares sobre la localización de Smo, sugiriendo que su capacidad para inhibir la señalización mutante no implicaba el tráfico de Smo. Esta noción se corroboró adicionalmente por el hallazgo contrario de que la KAAD-ciclopamina, una versión más potente de ciclopamina (Taipale, J. et al. (2000) Nature 406: 1005) que inhibe completamente el Smo-D473H a 1 μ M, inducía parcialmente la translocación ciliar en ausencia de ligando (Fig. 19; Fig. 15D). Todos los fármacos eran eficaces en la prevención de la activación de la ruta Hh, ya que la adición de Shh no tenía un efecto adicional sobre el tráfico de Smo. Los datos de los inventores claramente demuestran que los inhibidores de la misma clase se pueden utilizar de hecho para superar la resistencia al fármaco, ya que los inhibidores de SMO mutante el compuesto 5 y HhAntag afectaba la localización de Smo indistinguiblemente de GDC-0449. Además, los antagonistas de diferentes clases pueden presentar resistencia cruzada, ya que ni la ciclopamina ni SANT-1 puede inhibir completamente el Smo-D473H. Finalmente, sutiles modificaciones de un compuesto, tales como la adición de un resto lipídico a la ciclopamina en el caso de KAAD-ciclopamina, puede afectar drásticamente tanto la potencia como la capacidad para influenciar la localización de Smo. Debido a que la ciclopamina y la KAAD-ciclopamina probablemente se unen en el mismo sitio de Smo, sus distintos efectos en el tráfico de Smo podría ser como consecuencia de inducción de conformaciones de Smo ligeramente diferentes que favorecen una localización sobre otra, o podría ser debido a permeabilidad celular alterada que permita el acceso de KAAD ciclopamina pero no ciclopamina a los sitios pre-ciliares. En resumen, los inventores encontraron una correlación no obvia entre la capacidad de los antagonistas para manipular la localización de Smo de cierta manera y su capacidad para inhibir los mutantes resistentes a GDC-0449.

Ejemplo 7

El GDC-0449 tiene un efecto diferencial sobre la expresión de ARNm *Gli1* en dos aloinjertos MB resistentes adicionales. En las tres líneas tumorales MB separadas resistentes a los fármacos, creadas mediante dosificación intermitente con GDC-0449, solo en SG274 se encontró que portaba una mutación Smo, que indica que existen mecanismos adicionales de resistencia a GDC-0449 en modelos SG102 y SG152. Aunque las mutaciones en el supresor tumoral SUFU de individuos predispuestos a MB (Taylor M.D. et al. (2002) Nat. Genet. 31: 306-310) y podía en teoría conferir resistencia a los antagonistas de Smo, ningún modelo de aloinjerto era resistente a MB en este gen. Naturalmente, la resistencia podría incluso producir si estos tumores hubieran perdido su dependencia a la señalización Hh. Por lo tanto, los inventores expandieron los tumores resistentes originales y se preguntaron si la ruta Hh era aún activa en estas líneas tumorales MB y, si es así, si el GDC-0449 podía suprimir la señalización *in vivo* (Fig. 16A). Los niveles de *Gli1* en los tratados con vehículo, los aloinjertos SG102 o SG152 resistentes a GDC-0449 eran comparables a los aloinjertos de control o Smo mutante SG274, indicando que la ruta Hh es activa de manera similar en todos los modelos. De manera interesante, el tratamiento con GDC-0449 regulaba negativamente los niveles de *Gli1* en los tumores de control y SG102 y SG152 poseen distintos mecanismos de resistencia a GDC-0449 independientes de las mutaciones Smo o Sufu y, en el caso de SG102, puede implicar un evento corriente abajo de la regulación de *Gli1* dependiente de Smo.

Ejemplo 8

Caracterización molecular de dos modelos de aloinjerto MB adicionales revela mecanismos de resistencia a GDC-0449 corriente abajo de Smo. Para investigar adicionalmente los mecanismos de resistencia a GDC-0449, los inventores utilizaron una matriz de hibridación genómica comparativa (aCGH) para identificar las aberraciones en el número de copias génicas en los tumores originales. El modelo SG102 contenían una amplificación de una región en el cromosoma 7 que alberga el gen diana Hh *Ccnd1* (ciclina D1), mientras que el modelo SG152 tenía un alto nivel de amplificación focal de una región en el cromosoma 1 que englobaba el factor *Gli2* de transcripción de la ruta Hh (Fig. 20). Ambos modelos contenían aberraciones adicionales en el número de copias que no se habían asociados anteriormente con la señalización Mb o Hh anormal (datos no mostrados). Aunque la ciclina D1 y *Gli2* actúan corriente abajo de Smo y se han implicado anteriormente en el desarrollo de Mb, los inventores no han podido descartar formalmente la implicación de estas otras alteraciones genómicas en la resistencia a GDC-0449. Las amplificaciones de *Ccnd1* y *Gli2* se confirmaron independientemente por qPCR en SG102 y SG152 cuando se compararon con tumores de control sensible a GDC-0449 y Smo mutante SG274 (Fig. 16B). Estas alteraciones genómicas se mantuvieron durante la propagación posterior de la líneas tumorales MB, según los tumores expandidos presentaban un aumento de expresión de ARNm y niveles elevados de proteína de ciclina D1 y *Gli2* (Fig. 16B) y Fig. 16C).

La ciclina D1 promueve la proliferación mediante su capacidad para unirse y estimular tanto CDK4 como CDK6, dando lugar a la fosforilación de la proteína de retinoblastoma y entra en el ciclo celular (Kim J.K. y J.A. Diehl (2009) J. Cell. Physiol. 220: 292-296). La ablación génica de *Ccnd1* reduce drásticamente la incidencia de MB en ratones *Ptch*^{-/-} (Pogoriler J. et al. (2006) Development 133: 3929-3937), mientras que la expresión forzada de ciclina D1 en GNP *Ink4c*^{-/-}; *p53*^{-/-} capacita a las células para iniciar los MB cuando se inyectan por detrás en los cerebros de animales inmunocomprometidos (Zindy F. et al. (2007) Cancer Res. 67: 2676-2684). Los niveles de ciclina D1 regulados negativamente por GDC-0449 en los tumores de control, consistentes con que *Ccnd1* era un gen diana Hh (Fig. 16D; Zindy F. et al. (2007) Cancer Res. 67: 2676-2684). Por el contrario, los niveles de ciclina D1 permanecían elevados en tumores SG102, incluso cuando el GDC-0449 disminuía los niveles de ARNm *Gli1*. Los altos niveles de ciclina D1 probablemente sustentan la proliferación celular tumoral en presencia de GDC-0449, como la expresión de *Ccnd1* no depende de la señalización Hh debido a la amplificación génica.

Aunque las amplificaciones *GLI2* se ha observado en MB humanos, son relativamente raros (Northcott P.A. et al. (2009) Nat. Genet. 41: 465-472). El *Gli2* contienen un dominio represor en el extremo amino que cuando se elimina da como resultado una proteína activa constitutivamente con 30 veces mayor actividad transcripcional (Roessler E. et al. (2005) Hum. Mol. Genet. 14: 2181-2188). La expresión tisular específica de ese factor de transcriptor truncado puede dar lugar al MB cuando la ciliogénesis está alterada (Han Y.G. et al. (2009) Nat Med. 15: 1062-1065). La secuenciación de *Gli2* en un modelo SG152 revelaba mutaciones no trucadas y ambas formas de longitud completa y el represor se detectaron por Inmunotransferencia, indicando que el procesamiento de *Gli2* era relativamente normal (Fig. 16C). Sin embargo, el potencial oncogénico de *Gli2* se ha establecido firmemente en un modelo de ratón de BCC (Grachtchouk M. et al. (2000) Nat Genet. 24: 216-217) y la expresión mediada víricamente de la proteína de longitud completa permite al GNP proliferar *in vitro* en ausencia del ligando Hh (Oliver T.G. et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 7331-7336). De manera similar, el aumento de expresión *Gli2* por medio de amplificación génica obviamente haría a la ruta Hh en las células tumorales independientes de Smo y por tanto insensible a GDC-0449.

Ejemplo 9

Aloinjertos MB resistentes a HPI son sensibles a inhibición PI3K. Dada la identificación de mecanismos de resistencia corriente abajo de SMO, los inventores inspeccionaron otras rutas de señalización implicadas en MB para ver si el direccionamiento de estos pueden ser una estrategia terapéutica alternativa para combatir la resistencia a GDC-0449. La señalización fosfoinositida 3-cinasa (PI3K)/AKT anormal promueve el crecimiento tumoral y la supervivencia en muchos cánceres humanos, que incluyen MB (Vivanco I., y C.L. Sawyers (2002) Nat. Rev. Cancer 2: 489-501; Vivanco I., y C.L. Sawyers (2002) Nat. Rev. Cancer 2: 489-501). Los inventores por lo tanto examinaron el nivel de AKT activada (fosforilada en Ser473) y activada en S6 (fosforilada en Ser235/236) en sus modelos de aloinjerto de MB y fueron capaces de detectar ambas fosfoproteínas, sugiriendo que la ruta PI3K/AKT es activa en estos tumores (Fig. 17A). Sin embargo es poco probable que el aumento de la señalización PI3K/AKT contribuya a la resistencia, aunque AKT y S6 también estaban fosforiladas en los tumores de control sensibles a GDC-0449 y una señal de expresión génica PI3K obvia (Hartmann W. et al. (2005) Clin. Cancer Res. 12: 3019-27; Saal L.H. et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 7564-7569; Creighton C.J. (2007) Oncogene 26: 4648-4655) faltaba en los perfiles de micromatrices de los modelos resistentes cuando se compara con los controles sensibles (datos no mostrados) de manera importante, el inhibidor de PI3K GDC-0449 (Chang J.T. et al. (2009) Mol. Cell. 34: 104-114) reducía enormemente el crecimiento tumoral en modelos de control y resistentes, indicando que los tumores resistentes HPI mantienen su dependencia a la señalización (Fig. 17B). La inhibición del crecimiento tumoral se acompañaba por la modulación de la ruta PI3K, como el tratamiento con GDC-0449 disminuía los niveles de pAKT y pS6 (Fig. 17A). En consecuencia, la inhibición farmacológica de la señalización PI3K/AKT representa una estrategia terapéutica prometedora para tratar los MB resistentes a HPI.

Los Ejemplos anteriores tienen fines ilustrativos solamente y no se deberían considerar que limitan el ámbito de la invención que se define por las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc. de Sauvage, Frederic J. Dijkgraaf, Gerrit J. P. Januario, Thomas Yauch, Robert L.

<120> Smoothened mutante y métodos de utilización del mismo

<130> P4367R1 WO

<150> 61/239364

<151> 02-09-2009

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 787
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 1

```

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

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ser
20           25           30

Ser Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly Pro Arg Ser Ala Gly Gly Ser Ala
35           40           45

Arg Arg Ser Ala Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Pro Leu Ser His Cys
50           55           60

Gly Arg Ala Ala Pro Cys Glu Pro Leu Arg Tyr Asn Val Cys Leu Gly
65           70           75           80

Ser Val Leu Pro Tyr Gly Ala Thr Ser Thr Leu Leu Ala Gly Asp Ser
85           90           95

Asp Ser Gln Glu Glu Ala His Gly Lys Leu Val Leu Trp Ser Gly Leu
100          105          110

Arg Asn Ala Pro Arg Cys Trp Ala Val Ile Gln Pro Leu Leu Cys Ala
115          120          125

Val Tyr Met Pro Lys Cys Glu Asn Asp Arg Val Glu Leu Pro Ser Arg
130          135          140

Thr Leu Cys Gln Ala Thr Arg Gly Pro Cys Ala Ile Val Glu Arg Glu
145          150          155          160

```

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

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

ES 2 599 076 T3

```

        675                680                685

Pro Glu Leu His Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ser Thr Ile Pro Arg Leu
 690                695                700

Pro Gln Leu Pro Arg Gln Lys Cys Leu Val Ala Ala Gly Ala Trp Gly
 705                710                715                720

Ala Gly Asp Ser Cys Arg Gln Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asn Pro
          725                730                735

Phe Cys Pro Glu Pro Ser Pro Pro Gln Asp Pro Phe Leu Pro Ser Ala
          740                745                750

Pro Ala Pro Val Ala Trp Ala His Gly Arg Arg Gln Gly Leu Gly Pro
          755                760                765

Ile His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp Thr Glu Leu Met Asp Ala Asp
 770                775                780

Ser Asp Phe
 785

```

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (473)..(473)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido distinto de D

<400> 2

```

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

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ser
          20                25                30

Ser Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly Pro Arg Ser Ala Gly Gly Ser Ala
          35                40                45

Arg Arg Ser Ala Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Pro Leu Ser His Cys
 50                55                60

Gly Arg Ala Ala Pro Cys Glu Pro Leu Arg Tyr Asn Val Cys Leu Gly
 65                70                75                80

Ser Val Leu Pro Tyr Gly Ala Thr Ser Thr Leu Leu Ala Gly Asp Ser

```

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

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

Glu Pro Ser Ala Asp Val Ser Ser Ala Trp Ala Gln His Val Thr Lys
 610 615 620
 Met Val Ala Arg Arg Gly Ala Ile Leu Pro Gln Asp Ile Ser Val Thr
 625 630 635 640
 Pro Val Ala Thr Pro Val Pro Pro Glu Glu Gln Ala Asn Leu Trp Leu
 645 650 655
 Val Glu Ala Glu Ile Ser Pro Glu Leu Gln Lys Arg Leu Gly Arg Lys
 660 665 670
 Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Lys Glu Val Cys Pro Leu Ala Pro Pro
 675 680 685
 Pro Glu Leu His Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ser Thr Ile Pro Arg Leu
 690 695 700
 Pro Gln Leu Pro Arg Gln Lys Cys Leu Val Ala Ala Gly Ala Trp Gly
 705 710 715 720
 Ala Gly Asp Ser Cys Arg Gln Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asn Pro
 725 730 735
 Phe Cys Pro Glu Pro Ser Pro Pro Gln Asp Pro Phe Leu Pro Ser Ala
 740 745 750
 Pro Ala Pro Val Ala Trp Ala His Gly Arg Arg Gln Gly Leu Gly Pro
 755 760 765
 Ile His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp Thr Glu Leu Met Asp Ala Asp
 770 775 780
 Ser Asp Phe
 785

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

<400> 3

atggccgctg cccgccagc gcgggggccg gagctcccgc tectggggct gctgctgctg	60
ctgctgctgg gggaccggg ccggggggcg gctcgagcg ggaacgcgac cgggectggg	120
cctcggagcg cgggaggag cgcgaggag agcgggcg tgactggccc tccgcgccg	180
ctgagccact gggccgggc tgccccctgc gagccgctgc gctacaacgt gtgcctgggc	240
tcggtgctgc cctacggggc cacctccaca ctgctggccg gagactcgga ctcccaggag	300

gaagcgacg gcaagctcgt gctctggteg ggccctccgga atgccccccg ctgctgggca	360
gtgatccagc ccctgctgtg tgccgtatac atgcccgaagt gtgagaatga ccgggtggag	420
ctgcccagcc gtaccctctg ccaggccacc cgaggccctt gtgccatcgt ggagagggag	480
cggggctggc ctgacttcct gcgctgeact cctgaccgct tccctgaagg ctgcacgaat	540
gaggtgcaga acatcaagtt caacagttca ggccagtgcg aagtgccctt gggtcggaca	600
gacaacccca agagctggtg cgaggacgtg gagggctgcg gcatccagtg ccagaacccg	660
ctcttcacag aggctgagca ccaggacatg cacagctaca tcgcgccctt cggggccgtc	720
acgggcctct gcacgctctt caccctggcc acattcgtgg ctgactggcg gaactcgaat	780
cgctaccctg ctgttattct cttctacgtc aatgcgtgct tctttgtggg cagcattggc	840
tggctggccc agttcatgga tggtgccgcg cgagagatcg tctgccgtgc agatggcacc	900
atgaggcttg gggagccac ctccaatgag actctgtcct gcgtcatcat ctttgtcatc	960
gtgtactacg ccctgatggc tgggtgtggt tggtttgtgg tcctcaccta tgccctggcac	1020
acttccttca aagccctggg caccacctac cagcctctct cgggcaagac ctccctactt	1080
cacctgctca cctggtcact cccctttgtc ctactgtgg caatccttgc tgtggcgag	1140
gtggatgggg actctgtgag tggcatttgt tttgtgggct acaagaacta ccgataccgt	1200
gcgggcttcg tgctggcccc aatcgccctg gtgctcatcg tgggaggcta cttcctcatc	1260
cgaggagtea tgactctgtt ctccatcaag agcaaccacc ccgggctgct gagtgagaag	1320
gctgccagca agatcaacga gaccatgctg cgccctgggca tttttggctt cctggccttt	1380
ggcttttgtc tcattacctt cagctgccac ttctacgact tcttcaacca ggctgagtgg	1440
gagcgcagct tccgggacta tgtgctatgt caggccaatg tgaccatcgg gctgcccacc	1500
aagcagccca tccctgactg tgagatcaag aatcgcccg gacctctggt ggagaagatc	1560
aacctgtttg ccatgtttgg aactggcatc gccatgagca cctgggtctg gaccaaggcc	1620
acgtgctca tctggaggcg tacctgggtc aggttgactg ggagagtgga cgatgagcca	1680
aagcggatca agaagagcaa gatgattgcc aaggccttct ctaagcggca cgagctcctg	1740
cagaacccag gccaggagct gtccttcagc atgcacactg tgtcccacga cgggcccgtg	1800
gcgggcttgg cctttgacct caatgagccc tcagctgatg tctcctctgc ctgggcccag	1860
catgtcacca agatgggtggc tcggagagga gccatactgc ccaggatat ttctgtcacc	1920
cctgtggcaa ctccagtgc cccagaggaa caagccaacc tgtggctggt tgaggcagag	1980
atctccccag agctgcagaa gcgcctgggc cggaagaaga agaggaggaa gaggaagaag	2040
gaggtgtgcc cgctggcgcc gccccctgag cttcaccccc ctgcccctgc ccccagtacc	2100
attcctcgac tgccctcagct gccccggcag aaatgcctgg tggctgcagg tgccctggga	2160
gctggggact cttgcogaca gggagcgtgg accctggtct ccaacccatt ctgcccagag	2220
cccagtcccc ctcaggatcc atttctgccc agtgcaccgg ccccctggc atgggctcat	2280
ggccgcccag agggcctggg gcctattcac tcccgcacca acctgatgga cacagaactc	2340
atggatgcag actcggactt ctga	2364

5	<210> 4 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador oligonucleotídico	
10	<400> 4 gcaggacatt ccacacagtt cttg	24
15	<210> 5 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador oligonucleotídico	
20	<400> 5 ataggtgctg ggatacaggc ttg	23
25	<210> 6 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador oligonucleotídico	
30	<400> 6 taccctgaca ccaatctcct caacg	25
35	<210> 7 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador oligonucleotídico	
40	<400> 7 ggaattccca tcttccaac tcc	23
45	<210> 8 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
55	<400> 8 agatggctga gtgggtaaag g	21
60	<210> 9 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador oligonucleotídico	
65	<400> 9	

	gtggaggtca gaggacaaac tt	22
5	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 10 agaaggtgac ctggatgaga	20
15	<210> 11 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 11 tgatacatat ggcggtcaat ct	22
25	<210> 12 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sonda oligonucleotídica	
35	<400> 12 cttctcagga gataccggga atccaag	27
40	<210> 13 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
45	<400> 13 tcagctgccca cttctac	17
50	<210> 14 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
55	<400> 14 tcagctgccca cttctacg	18
60	<210> 15 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
65	<400> 15	

tcagctgccacttctacc

18

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína SMO mutante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido distinto de ácido aspártico en el aminoácido correspondiente al aminoácido 473 de SEQ ID NO: 2.
2. La secuencia de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en la que la proteína SMO mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende una histidina, una glicina, una fenilalanina, una tirosina, una leucina, una isoleucina, una prolina, una serina, una treonina, una metionina, una glutamina o una asparagina en el aminoácido correspondiente al aminoácido 473 de SEQ ID NO: 2.
3. La secuencia de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de ácido nucleico parental de SEQ ID NO: 3, en donde dicha secuencia contiene una mutación que altera la secuencia que codifica el aminoácido correspondiente al aminoácido 473 de SEQ ID NO: 2 para codificar un aminoácido diferente.
4. Una sonda de ácido nucleico que es capaz de hibridarse específicamente con un ácido nucleico que codifica una proteína SMO mutada o un fragmento de la misma, comprendiendo dicha proteína SMO mutada o dicho fragmento de la misma una mutación en la secuencia que codifica el aminoácido correspondiente al aminoácido 473 de SEQ ID NO: 2, en donde dicha sonda de ácido nucleico se une a la sonda de ácido nucleico que codifica la proteína SMO mutada o el fragmento de un modo diferente a como a un ácido nucleico que codifica una proteína SMO de tipo silvestre o un fragmento.
5. La sonda de la reivindicación 4 en donde dicha sonda es complementaria de dicho ácido nucleico que codifica la proteína SMO mutada o dicho fragmento del mismo.
6. La sonda de la reivindicación 4 que tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos.
7. La sonda de la reivindicación 4 que comprende además un marcador detectable.
8. Una proteína SMO mutante aislada, que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a SEQ ID NO: 2, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido distinto al ácido aspártico en el aminoácido correspondiente al aminoácido 473 de SEQ ID NO: 2.
9. La proteína SMO mutante aislada de la reivindicación 8, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido distinto al ácido aspártico en el aminoácido correspondiente al aminoácido 473 de SEQ ID NO: 2.
10. La proteína SMO mutante aislada de las reivindicaciones 8 o 9, en la que dicha secuencia de aminoácidos comprende una histidina, una glicina, una fenilalanina, una tirosina, una leucina, una isoleucina, una prolina, una serina, una treonina, una metionina, una glutamina o una asparagina en el aminoácido correspondiente al aminoácido 473 de SEQ ID NO: 2.
11. Un anticuerpo que se une específicamente a la proteína SMO mutante de las reivindicaciones 8 o 9, en donde dicho anticuerpo no se une a la proteína SMO de tipo silvestre que tiene un ácido aspártico en la posición 473.
12. El anticuerpo de la reivindicación 11 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla o un fragmento de unión a antígeno de los mismos.
13. El anticuerpo de la reivindicación 11 en donde dicho anticuerpo está conjugado con un agente citotóxico.
14. El anticuerpo de la reivindicación 11 en donde dicho anticuerpo inhibe la actividad de la proteína SMO.
15. Un método para detectar un gen SMO mutado en una muestra, en donde dicho gen SMO mutado codifica una proteína SMO mutada o un fragmento de la misma, en donde dicha proteína SMO mutada o dicho fragmento de la misma comprenden una mutación en la posición de aminoácido que corresponde a la posición de aminoácido 473 de SEQ ID NO: 2, en donde dicho método comprende la amplificación en dicha muestra de un ácido nucleico que tiene al menos de 20 nucleótidos de longitud y codifica dicha mutación en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 473 de SEQ ID NO: 2, 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.
16. El método de la reivindicación 15 en el que la movilidad electroforética se determina sobre gel de poliacrilamida.

17. Un método para identificar al menos una mutación SMO en una muestra, que comprende poner en contacto un ácido nucleico de dicha muestra con una sonda de ácido nucleico que es capaz de hibridarse específicamente con un ácido nucleico que codifica una proteína SMO mutada, o un fragmento de la misma, en donde dicho ácido nucleico comprende una mutación que altera la secuencia que codifica el aminoácido 473 en un aminoácido distinto de ácido aspártico, y detectar dicha hibridación.

18. El método de la reivindicación 17 en el que dicha sonda está marcada de manera que es detectable.

19. El método de la reivindicación 17 en el que dicha sonda es un oligómero antisentido.

20. El método de la reivindicación 17 en el que el gen SMO o un fragmento del mismo en dicho ácido nucleico de dicha muestra se amplifica y se pone en contacto con dicha sonda.

21. Un método para identificar un tumor en un sujeto humano que es resistente al tratamiento con GDC-0449, que comprende la determinación de la presencia de un gen SMO mutado o una proteína SMO mutada en una muestra de dicho tumor en donde dicha mutación se localiza en el gen SMO que codifica el aminoácido 473 de manera que la presencia de dicho gen SMO mutado o dicha proteína SMO mutada indica que dicho tumor es resistente al tratamiento con un GDC-0449.

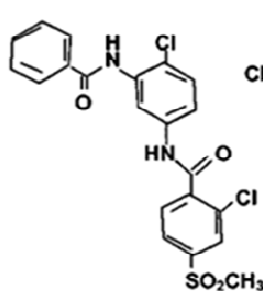
22. El método de la reivindicación 21 en el que la presencia o la ausencia de dicha mutación se lleva a cabo examinando una muestra de ácido nucleico o una muestra de proteína.

23. Un método para cribar compuestos que inhiben la señalización de una proteína SMO mutante que incorpora una mutación en el aminoácido 473, que comprende poner en contacto dicha proteína SMO mutante con un compuesto de ensayo y detectar la unión de dicho compuesto a dicha proteína SMO mutante de manera que la unión de dicho compuesto de ensayo a la proteína SMO mutante indica que dicho compuesto de ensayo es un inhibidor de la proteína SMO mutante.

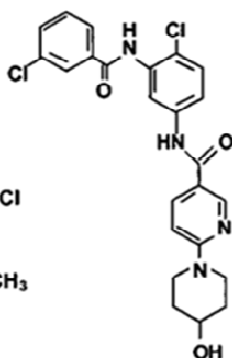
24. Un método para cribar compuestos que inhiben la señalización de una proteína SMO mutante que incorpora una mutación en el aminoácido 473, que comprende poner en contacto una célula que expresa dicha proteína SMO mutante con un compuesto de ensayo y detectar la actividad de Gli en dicha célula de manera que la presencia de actividad de Gli indica que dicho compuesto de ensayo no es un inhibidor de la proteína SMO mutante.

25. Un compuesto para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en donde dicho compuesto se une específicamente a una proteína SMO mutante que tiene una mutación que da como resultado un aminoácido en la posición 473 distinto de ácido aspártico, en donde dicho compuesto es o bien:

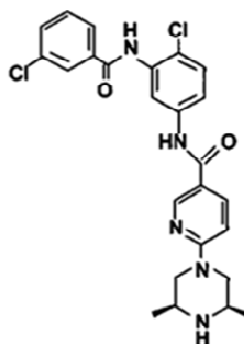
- (i) un anticuerpo que se une específicamente a una SMO mutante que tiene un aminoácido distinto de ácido aspártico en la posición 473; o
- (ii) un compuesto de Fórmulas I, II y/o III:



Fórmula I



Fórmula II



Fórmula III

FIG._1

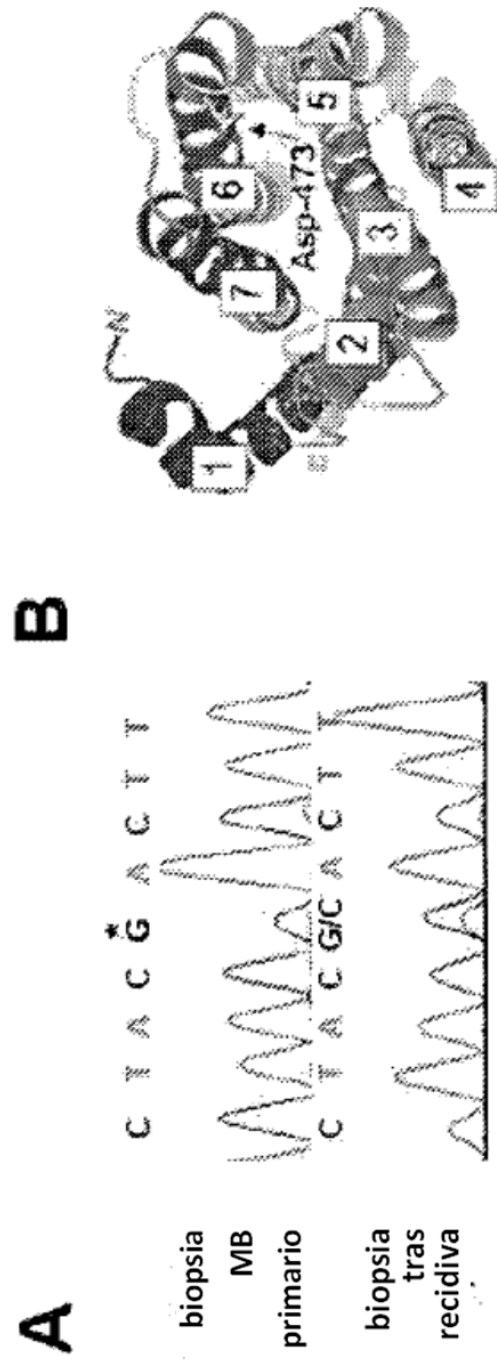


FIG._2

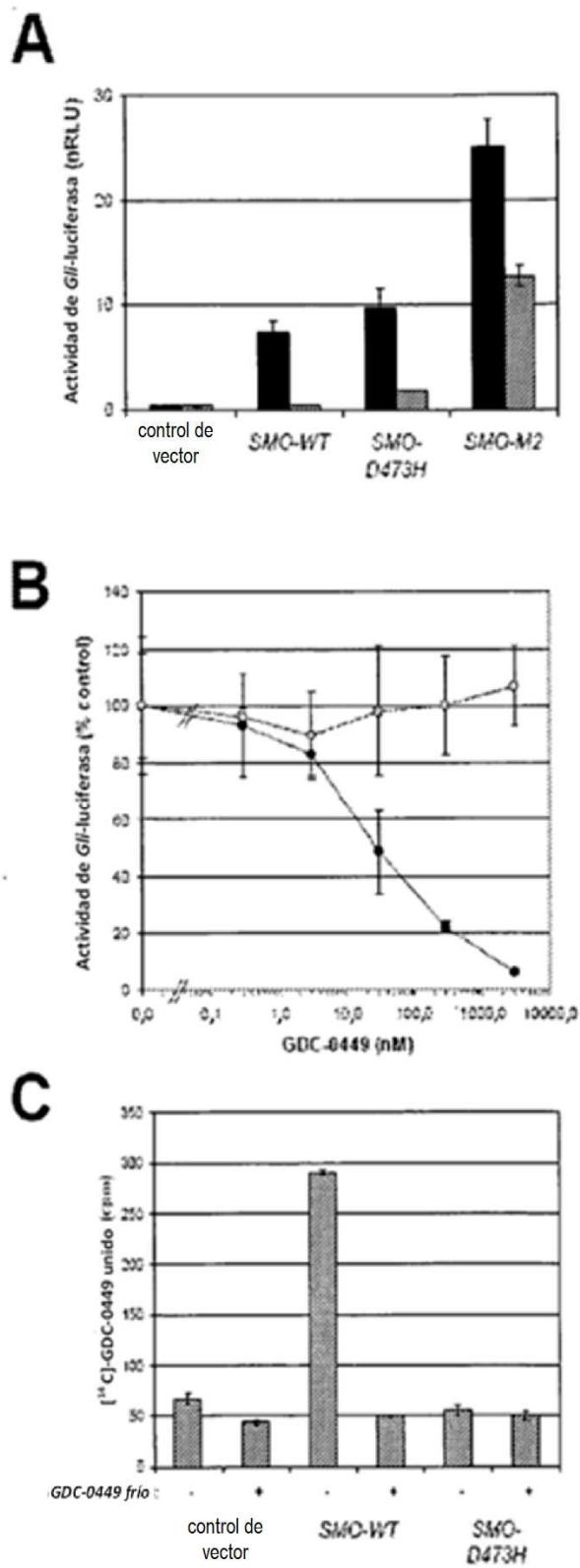


FIG._3

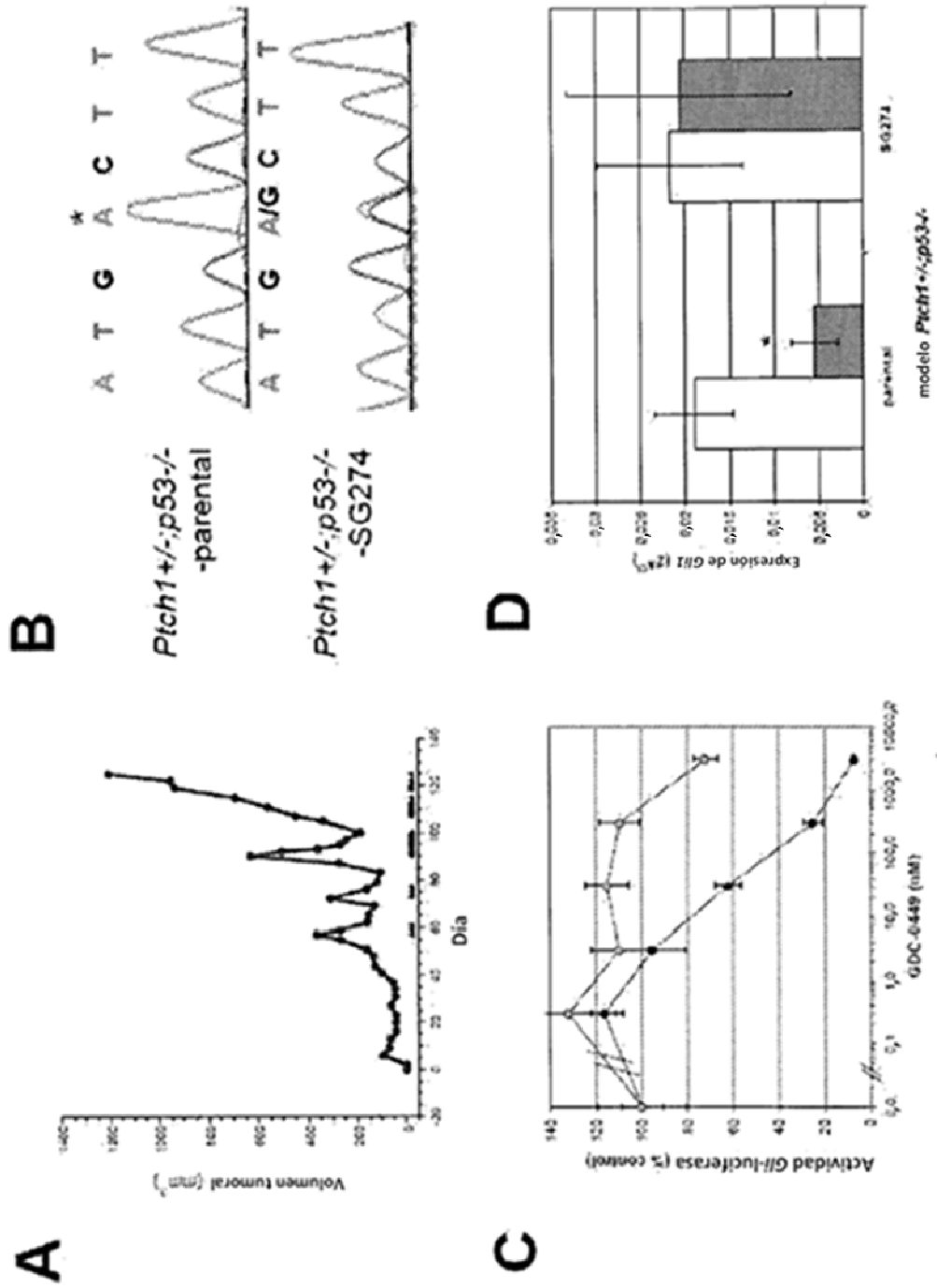


FIG._4

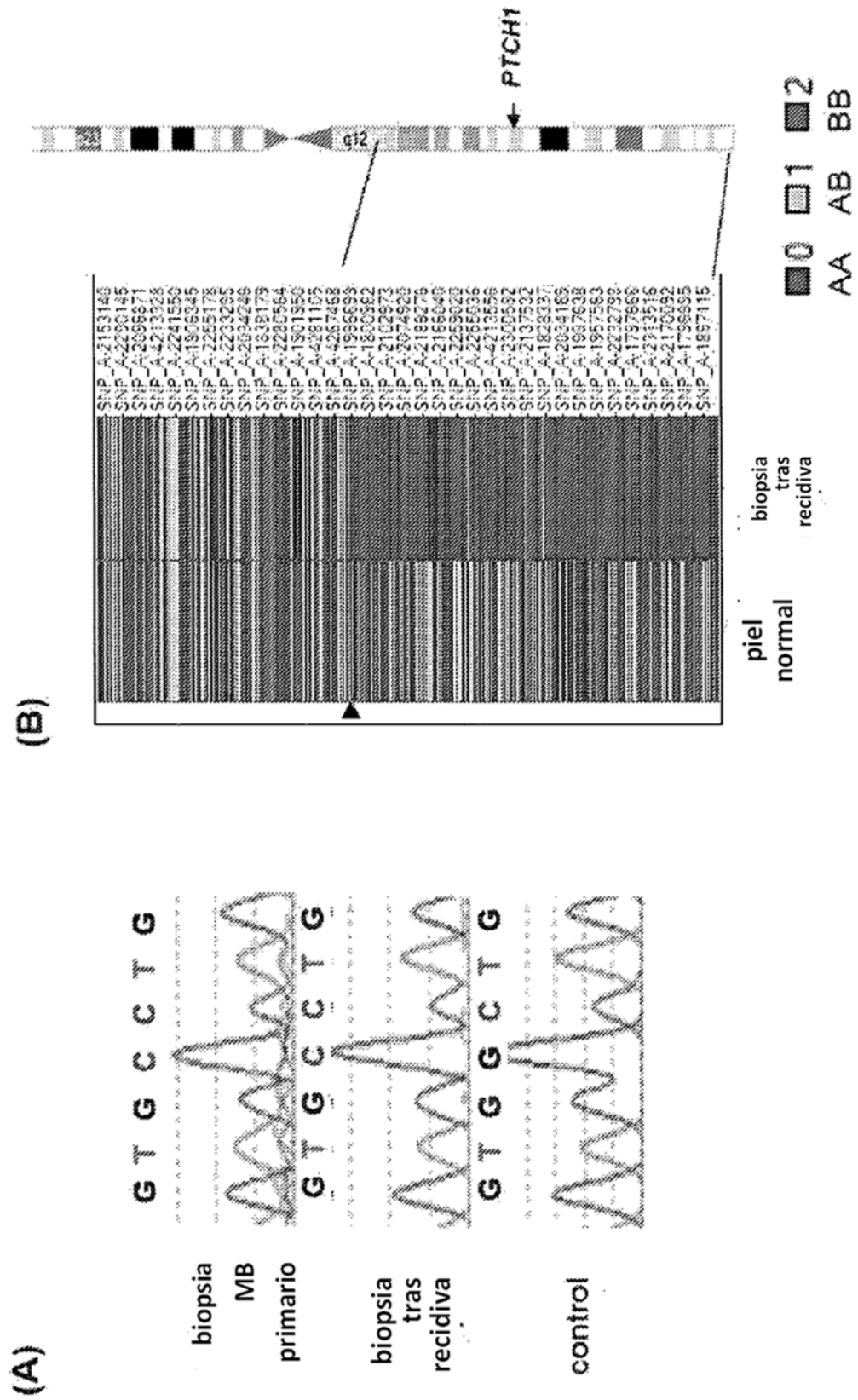


FIG._5

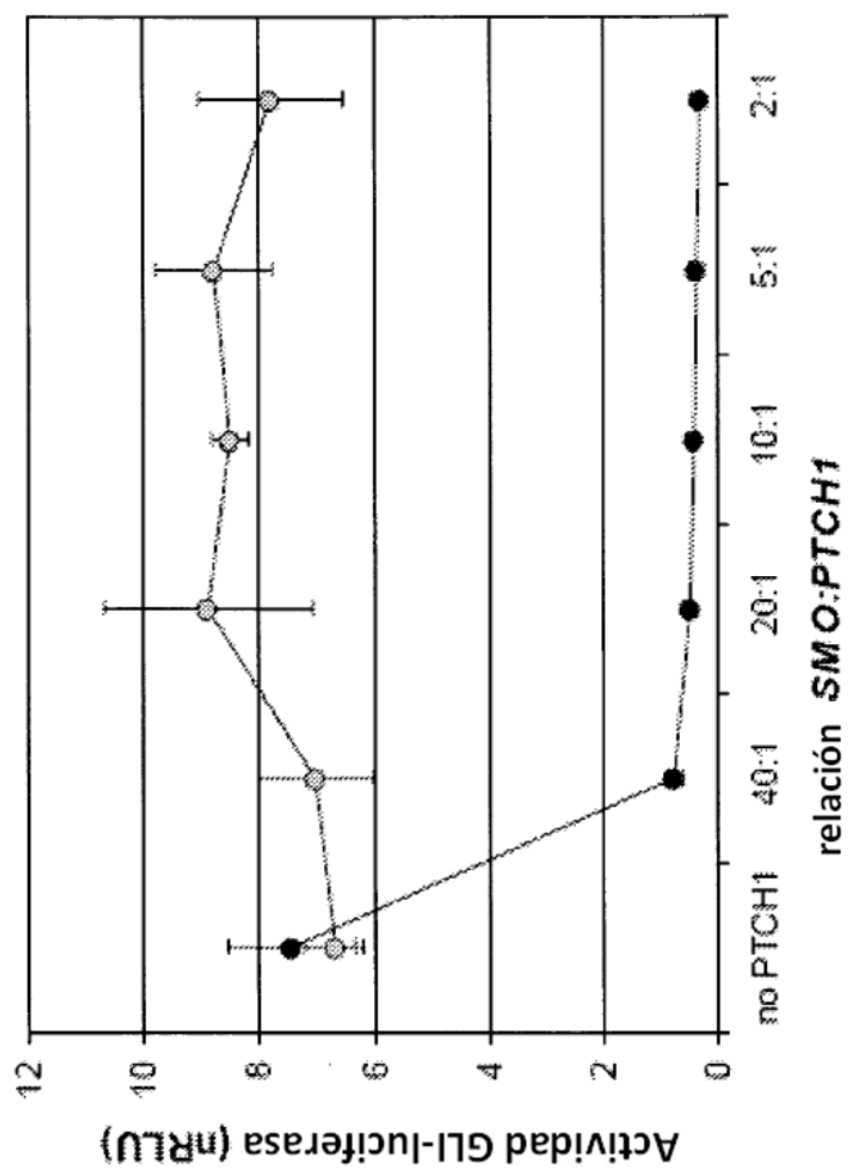


FIG._6

	Número de copias 7q31.2 (SMO)		
Fuente de ADN	Previsto (Afi. 100 K)	Ensayo 1	Ensayo 2
Biopsia tras recidiva		2,2	2,4
Línea celular control -1	2,1	1,9	2,2
Línea celular control -2	3,4	4,5	3,9
Línea celular control -3	1,1	1,2	1,2

FIG._7

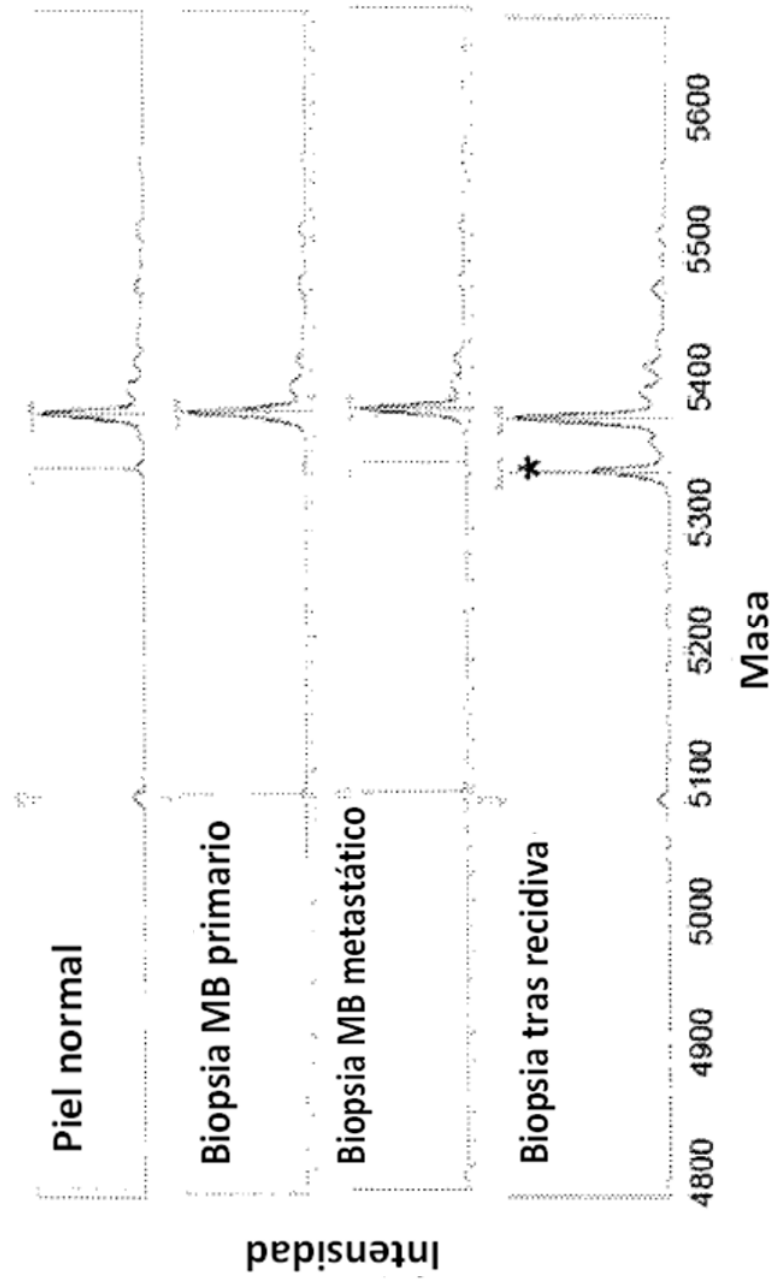


FIG._8

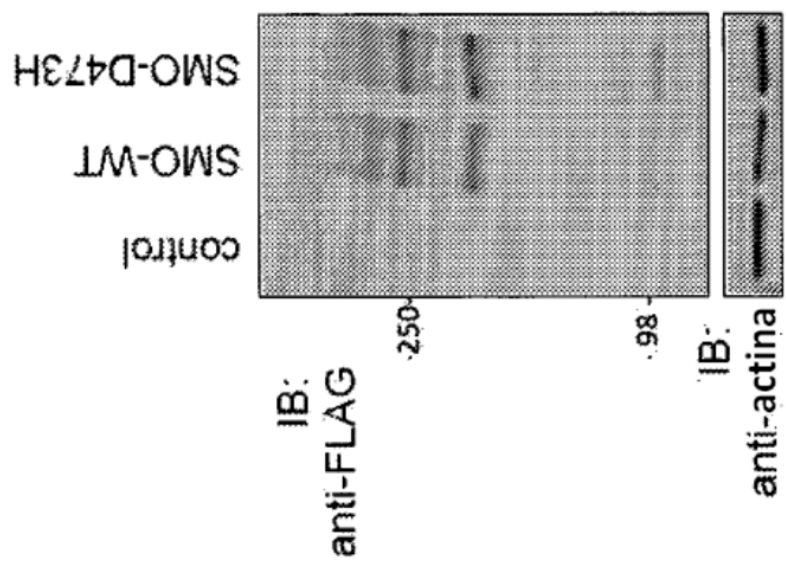


FIG._9

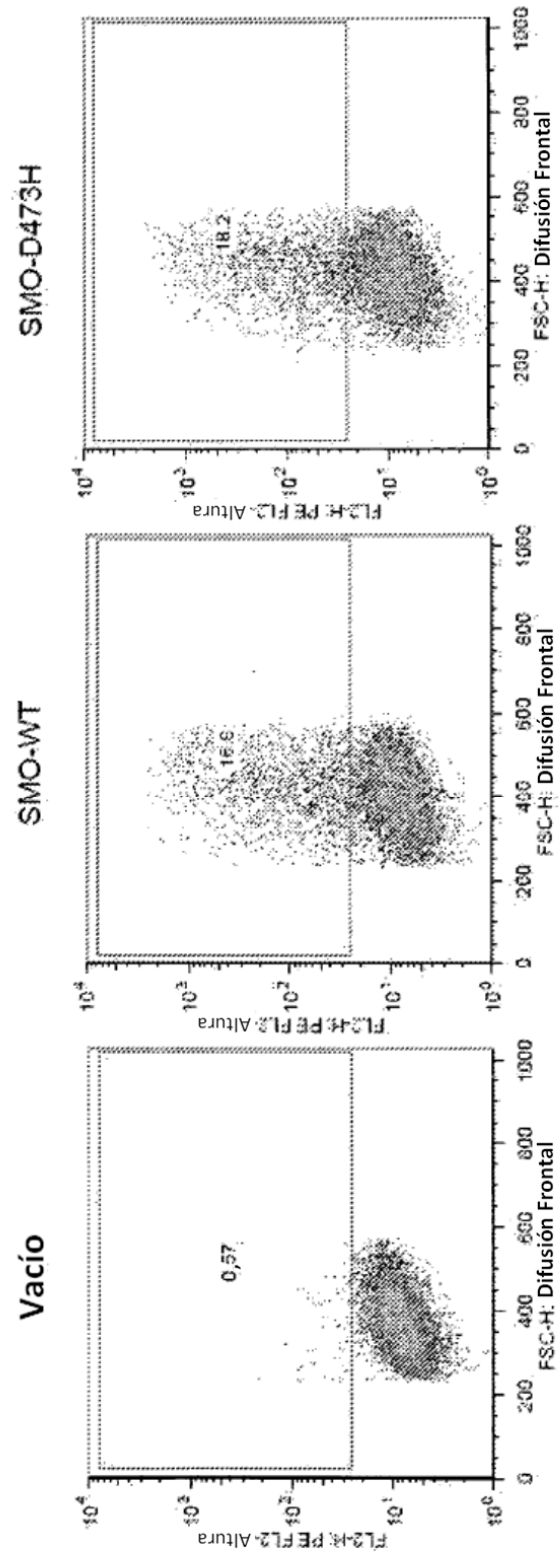


FIG._10

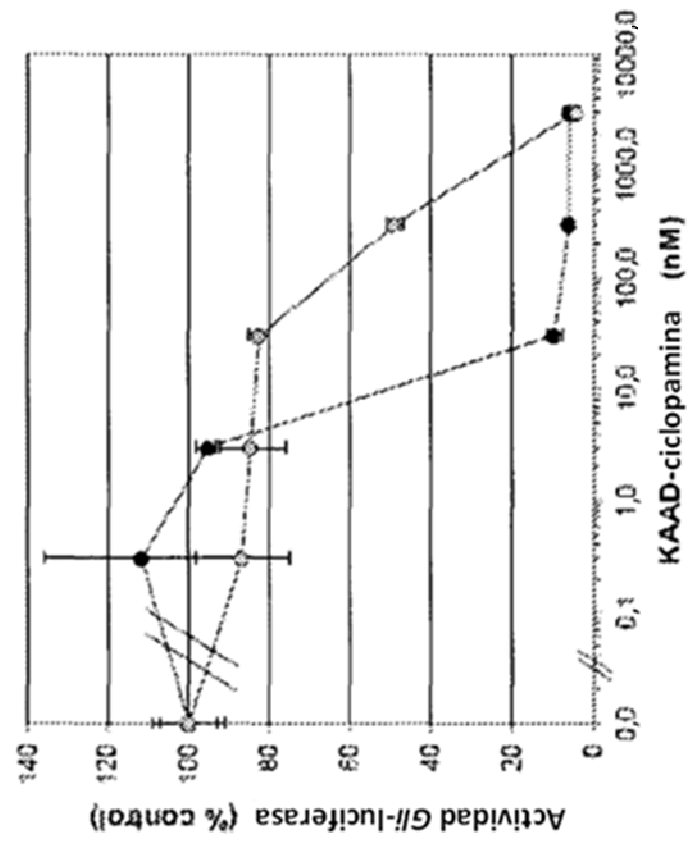


FIG. 11

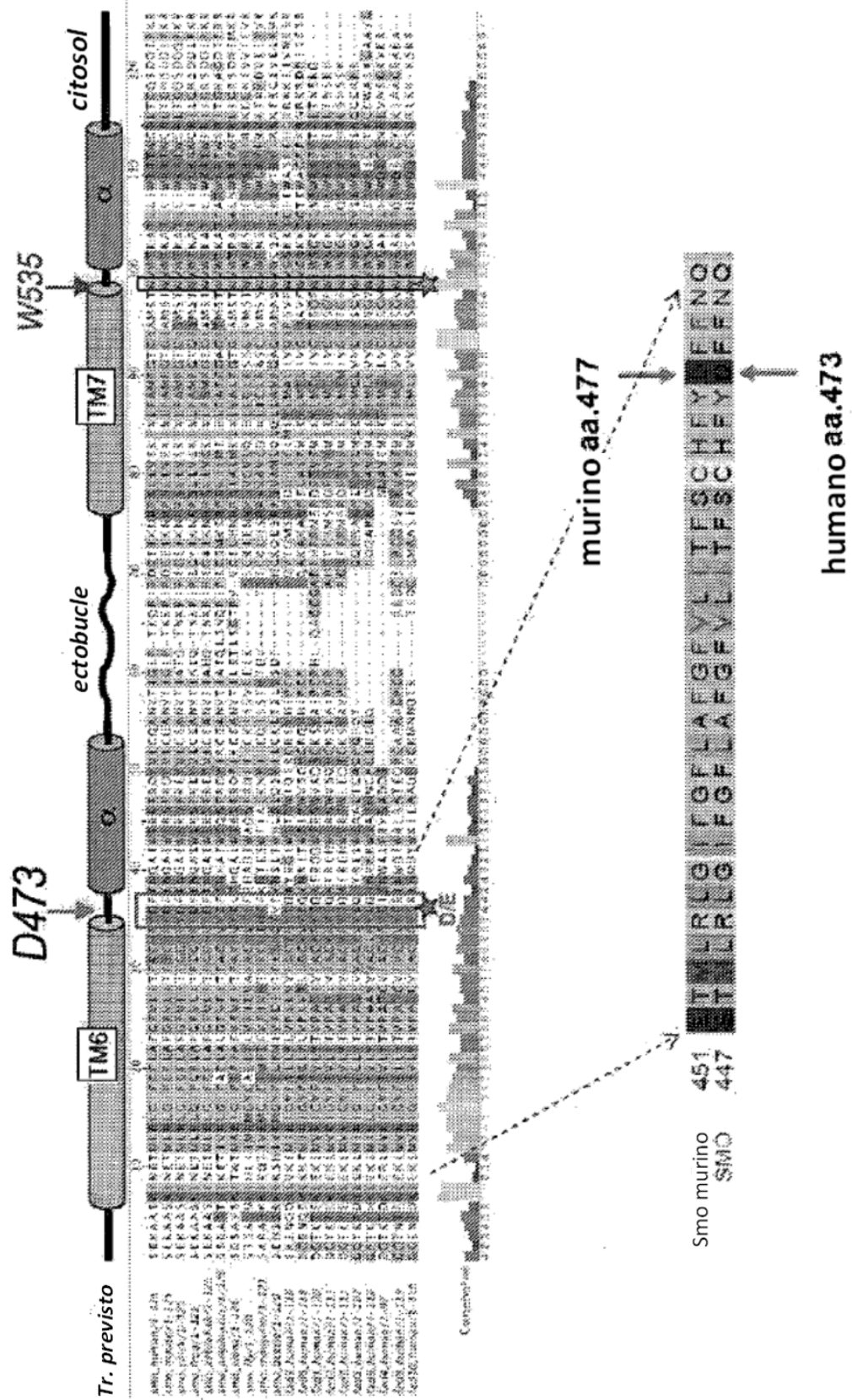
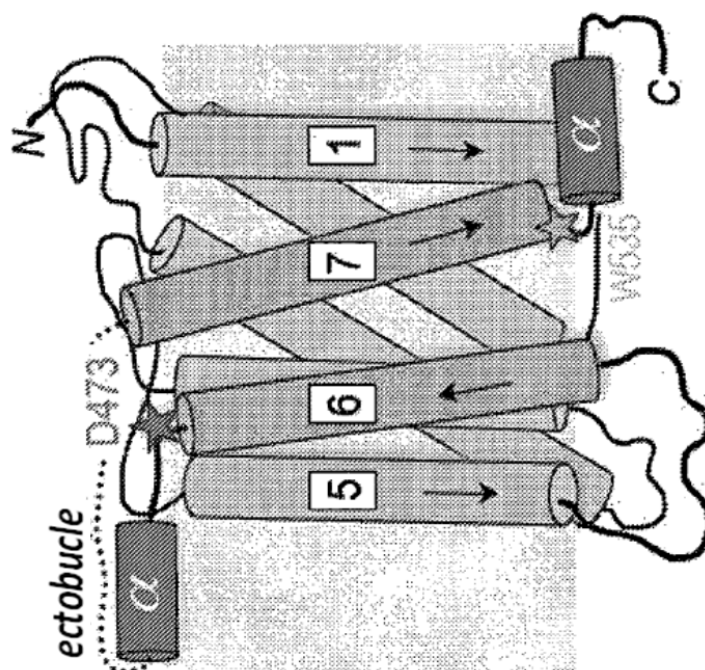


FIG._12



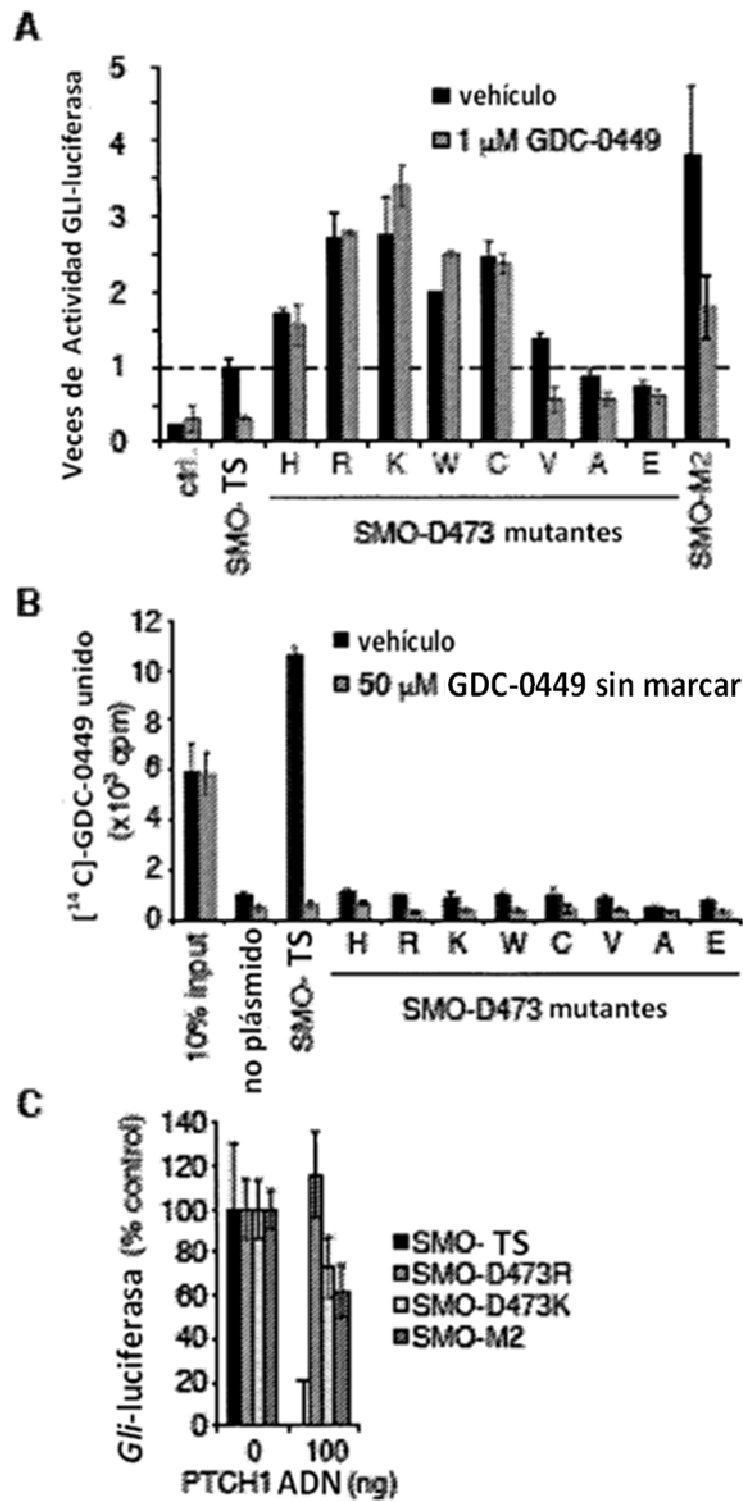


FIG._13

FIG._14

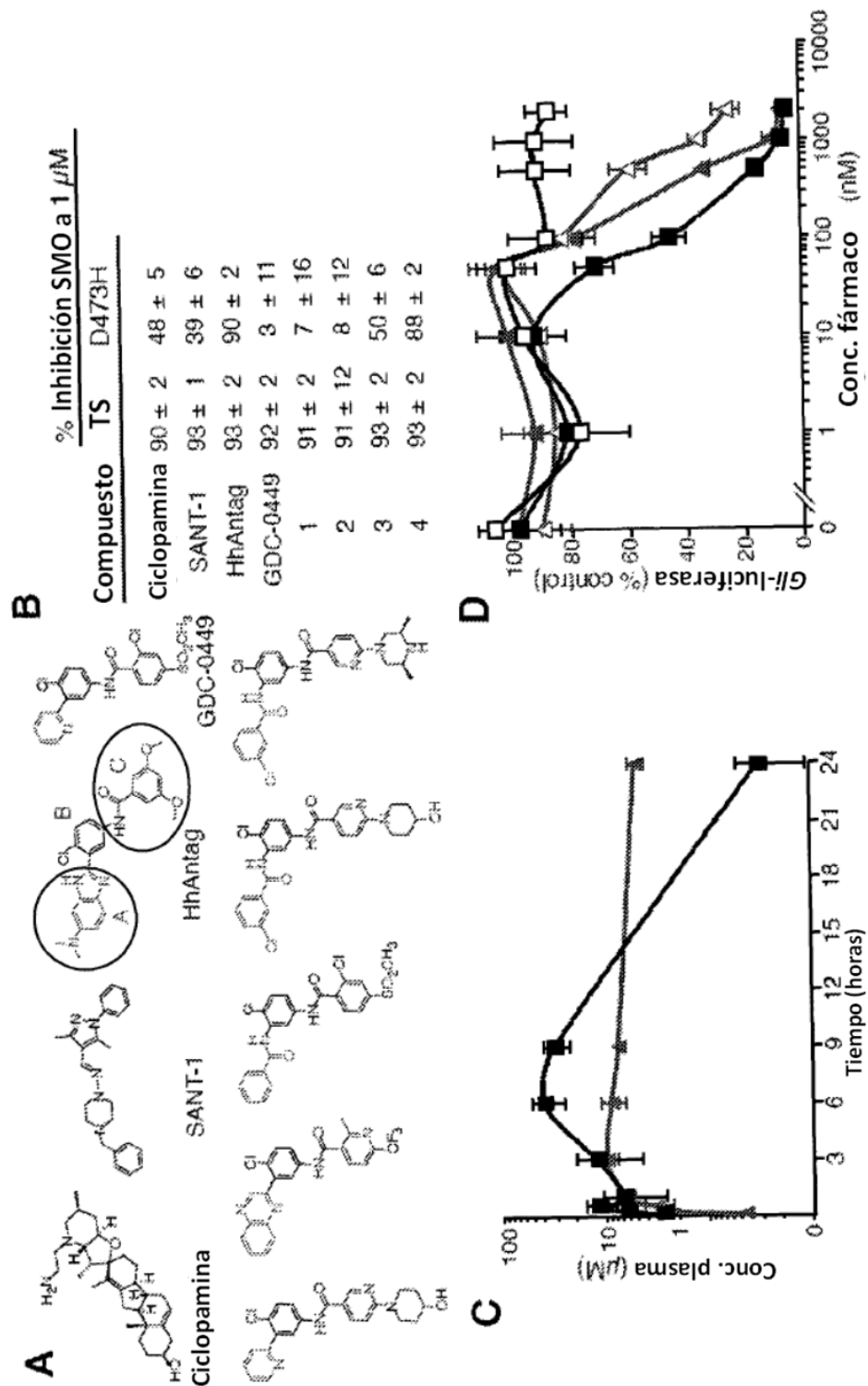


FIG._15

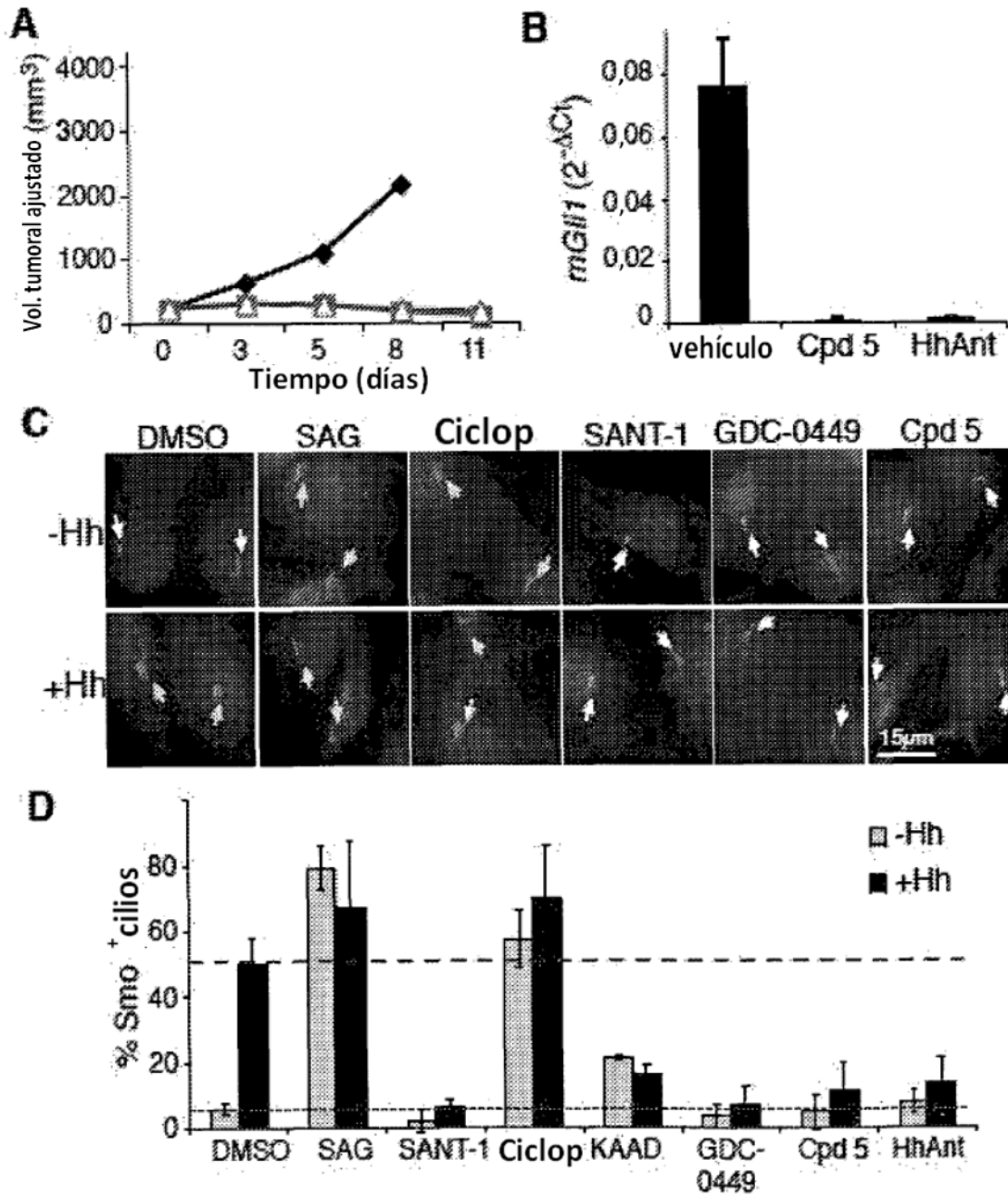


FIG._16

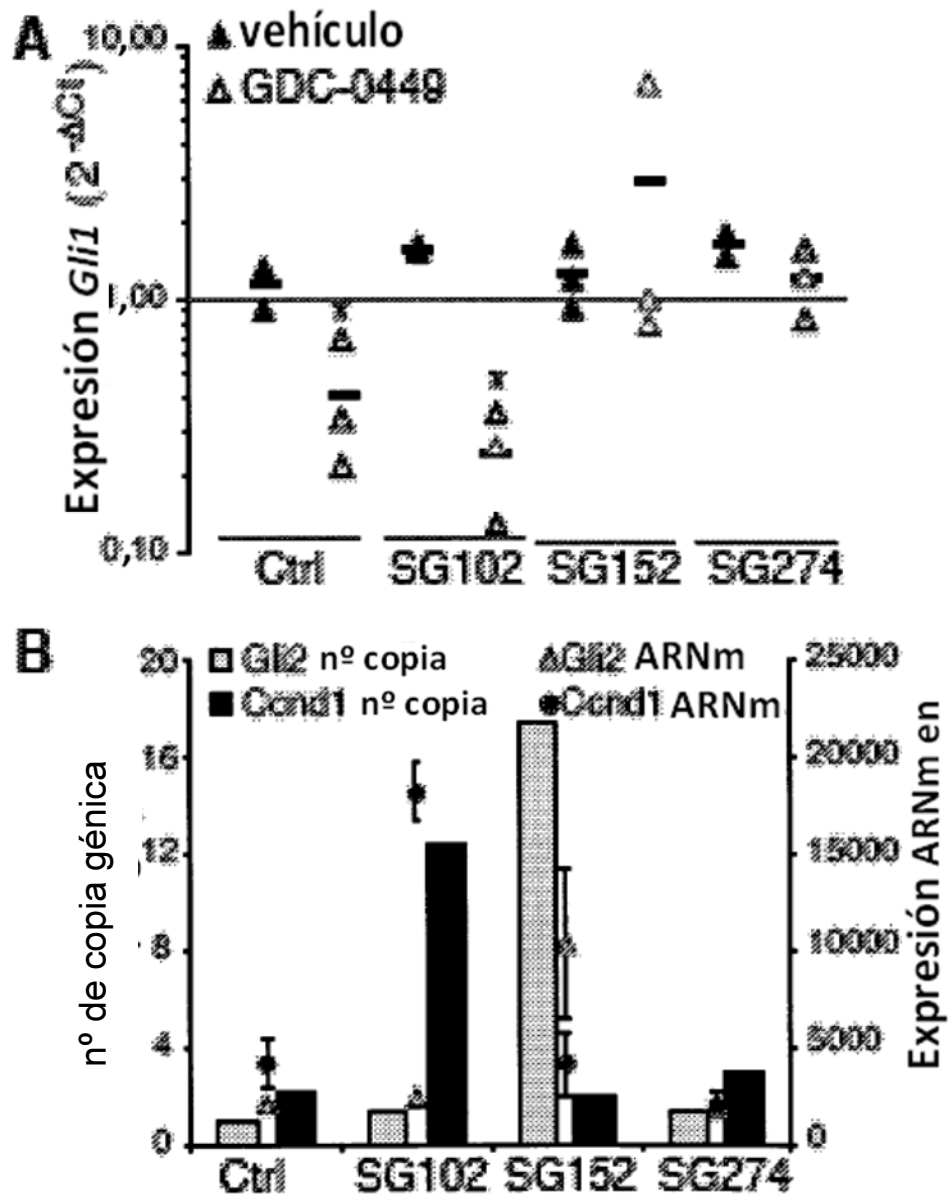


FIG._16

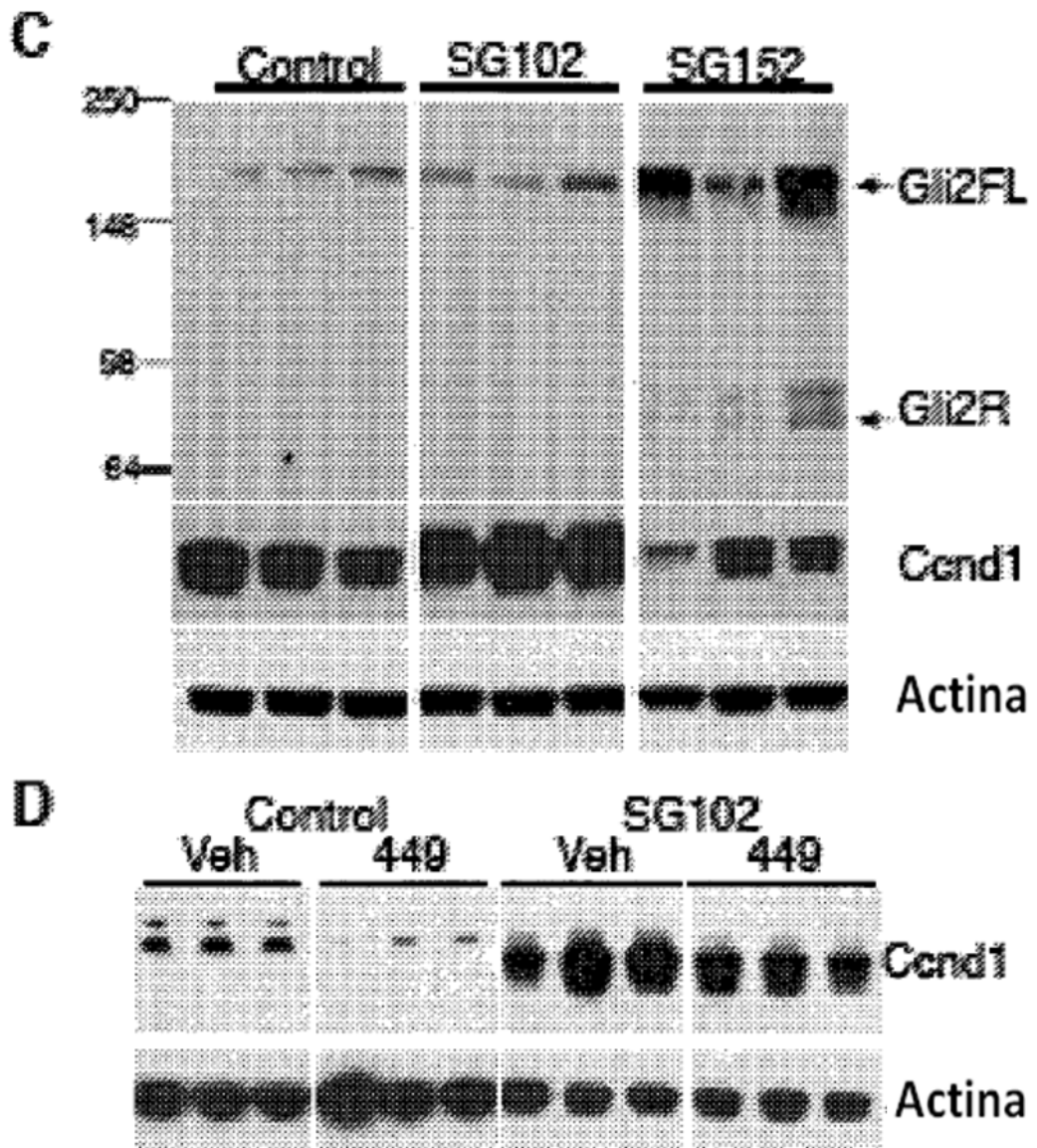


FIG._17

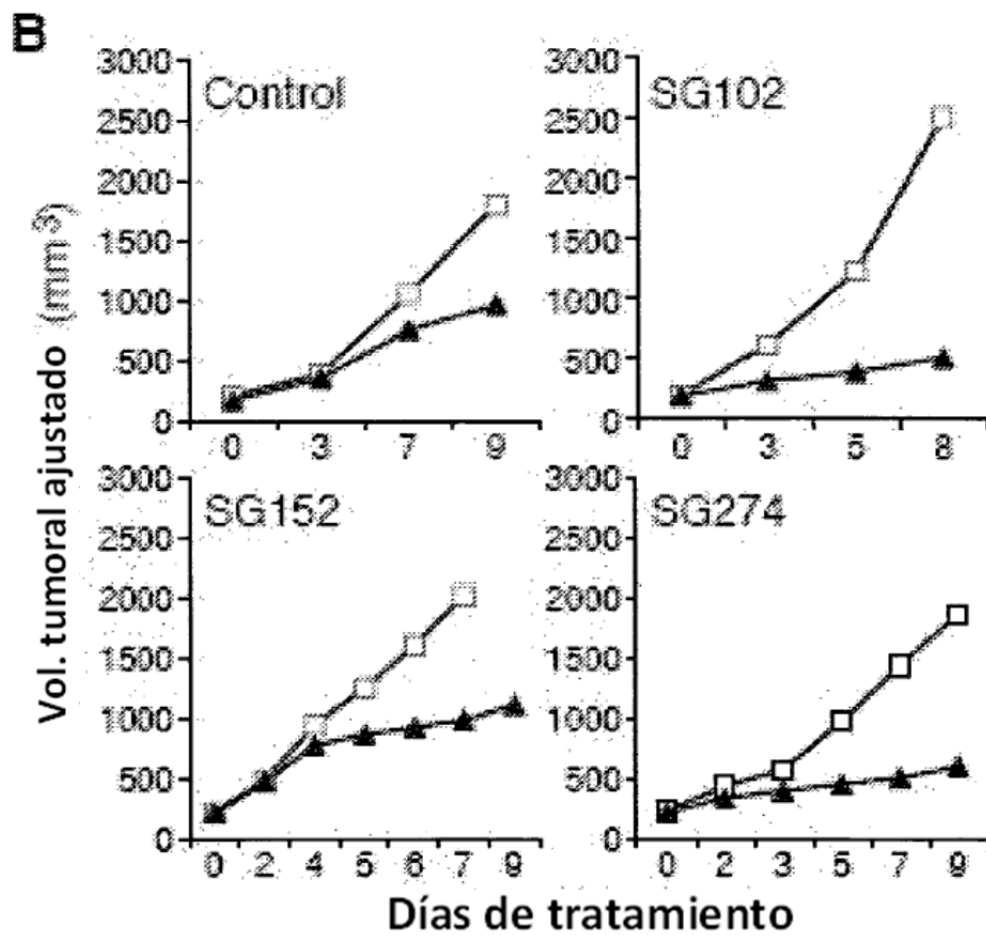


FIG._18

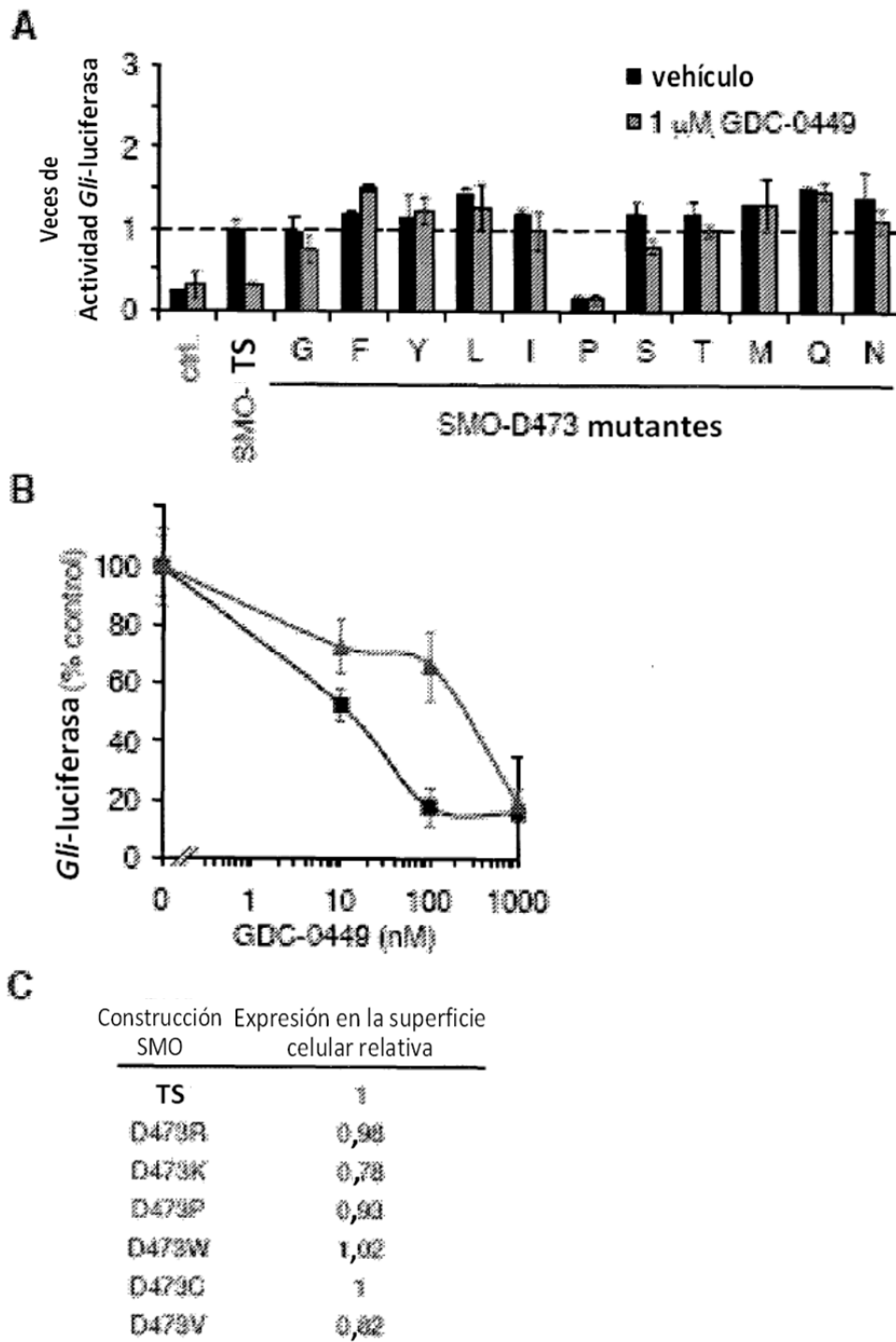


FIG._19

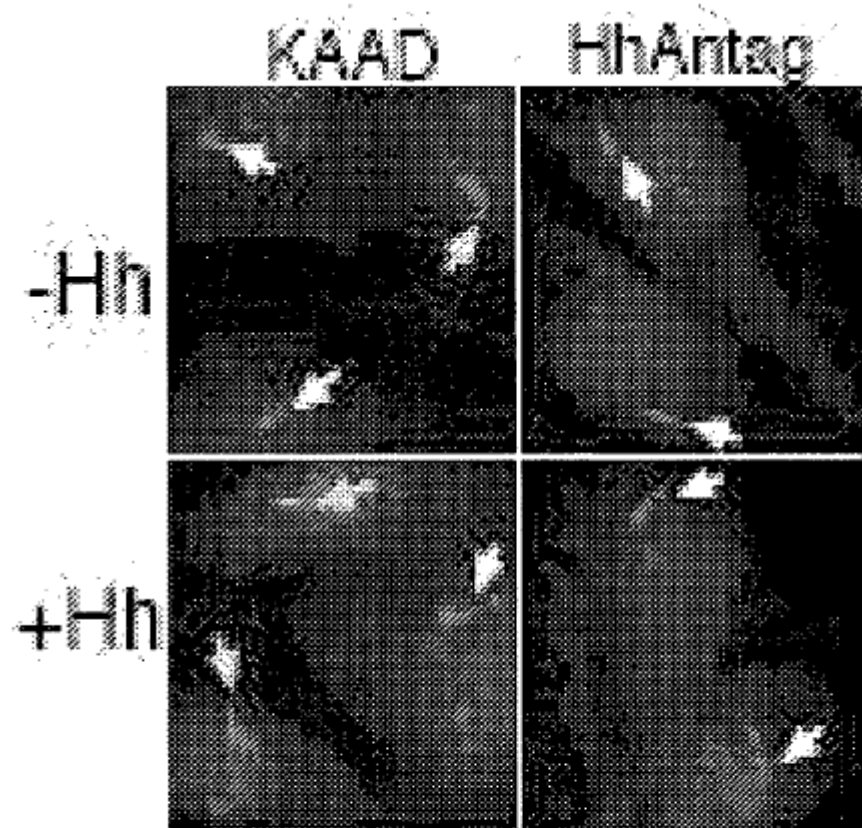


FIG._20

