

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 857**

51 Int. Cl.:

A61K 31/33	(2006.01)	A61K 31/551	(2006.01)
C07K 14/705	(2006.01)	C12Q 1/6886	(2008.01)
C07K 16/22	(2006.01)		
C07D 293/00	(2006.01)		
A61K 31/498	(2006.01)		
A61K 31/5377	(2006.01)		
A61K 31/5513	(2006.01)		
C07K 16/28	(2006.01)		
G01N 33/574	(2006.01)		
A61K 47/68	(2007.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2015 PCT/US2015/014496**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015 WO15120075**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2015 E 15705757 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 3102197**

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

30 Prioridad:

04.02.2014 US 201461935775 P

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

27.12.2018

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (50.0%)
One DNA Way
South San Francisco, CA 94080-4990, US y
CURIS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DE SAUVAGE, FREDERIC, J.;
YAUCH, ROBERT, L.;
DIJKRAAF, GERRIT, J.P. y
SHARPE, HAYLEY**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 694 857 T3

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

DESCRIPCIÓN

Smoothened mutante y métodos de uso de la misma

5 Antecedentes de la invención

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

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

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

El CCB es el cáncer humano más común y se debe predominantemente a la hiperactivación de la vía Hh (Oro *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 1998). La asociación entre la señalización de Hh y el cáncer se descubrió por primera vez en pacientes que padecen síndrome de Gorlin o de nevus de células basales (SNCB), que son altamente susceptibles al meduloblastoma (MB) y al CCB. Estos pacientes generalmente poseen mutaciones de la estirpe germinal heterocigótica en *Patched 1* (*PTCH1*), que codifica un receptor para de ligandos Hh (Hahn *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1996). La unión del ligando de Hh alivia la supresión de *PTCH1* del transductor de señal transmembrana (TM) de serpiente Smoothened (SMO). La gran mayoría de los CCB esporádicos se deben a la inactivación de las mutaciones y a la pérdida de heterocigosis (PDH) en *PTCH1*, albergando la mayor parte del resto mutaciones activadoras en *SMO* (Reifenberger *et al.*, 2005). *SMO* promueve la activación y la localización nuclear de los factores de transcripción GLI mediante la inhibición del supresor de homólogo fusionado (SUFU) y la proteína cinasa A (PKA). SUFU regula negativamente la vía de Hh mediante la unión y el secuestro de factores de transcripción GLI en el citoplasma (Stone *et al.*, 1999). Las mutaciones de pérdida de función en *SUFU* también se asocia al síndrome de Gorlin (Pastorino *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2002). Aproximadamente el 50 % de los CCB esporádicos también tienen mutaciones *TP53* (Jayaraman *et al.*, 2014).

Varios inhibidores de la vía de Hh (HPI, por sus siglas en inglés) están actualmente en investigación clínica tanto para el CCB como para el MB (Amakye *et al.*, 2013). Vismodegib, anteriormente conocido como GDC-0449, es un inhibidor de *SMO* aprobado para el tratamiento del CCB metastásico y localmente avanzado (Sekulic *et al.*, 2012). La mayoría de los pacientes con CCB tratados con vismodegib experimentan un beneficio clínico, incluyendo respuestas tanto completas como parciales (Sekulic *et al.*, 2012).

Sin embargo, una estimación preliminar sugiere que hasta el 20 % de los pacientes con CCB avanzado desarrollan resistencia al vismodegib en el primer año de tratamiento (Chang y Oro, 2012). Hasta la fecha, el único mecanismo funcionalmente caracterizado de resistencia adquirida a vismodegib en la clínica provino de un paciente con MB metastásico. Se detectó una mutación SMO-D473H en una biopsia de un tumor metastásico recurrente y se demostró que anula la unión del fármaco in vitro (Yauch *et al.*, 2009). Se notificaron recientemente otras cuatro mutaciones clínicas de *SMO* en CCB resistente a vismodegib, pero no se examinaron funcionalmente (Brinkhuizen *et al.*, 2014; Prich *et al.*, 2014). Se han definido varios mecanismos de resistencia a inhibidores de *SMO* a partir de modelos preclínicos, incluyendo mutaciones de *SMO* adicionales, la amplificación de componentes de la vía de Hh corriente abajo tales como GLI2 y la activación de vías de señalización de derivación incluyendo la cinasa fosfatidilinositol 3-

cinasa (PI3K) y la proteína cinasa atípica C $\nu\lambda$ (aPKC- $\nu\lambda$) (Atwood *et al.*, 2013; Buonamici *et al.*, 2010; Dijkgraaf *et al.*, 2011). Sin embargo, sigue sin estar claro qué mecanismos activan la resistencia en los pacientes.

5 El documento WO2013/154767 informa sobre un método para la identificación de mutaciones en el gen de SMO en una muestra de un sujeto que padece neoplasia y la proteína SMO mutada.

10 Metcalfe *et al.* (*Cancer Research*, vol. 71 n°. 15, páginas 5057-5061, 1 de agosto de 2011) desvela antagonistas de segunda generación que combaten las mutaciones de SMO activadas por resistencia a GD-0449 (vismodegib). Se detectaron mutaciones en estirpes resistentes y se detectó una mutación que no es esencial para la actividad de SMO pero que es crítica para vismodegib.

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

Sumario de la divulgación

20 La presente invención es como se define en las reivindicaciones.

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

30 En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína SMO mutante en la que dicha secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido distinto del triptófano en la posición de aminoácido que corresponde a la posición 281 de la secuencia de aminoácidos de SMO de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína SMO mutante que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95 % a la SEQ ID NO: 1 en la que dicha secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido distinto del triptófano en el aminoácido 281. En algunas realizaciones, la proteína SMO mutante comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en la que dicha secuencia de aminoácidos comprende una cisteína (C) en el aminoácido 281. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico parental de la SEQ ID NO: 5, en la que dicha secuencia contiene una mutación que altera la secuencia que codifica el aminoácido 281 para codificar un aminoácido diferente. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con el ácido nucleico que codifica una proteína SMO mutada o un fragmento de la misma que incorpora una mutación en la secuencia que codifica el aminoácido 281. En algunas realizaciones, la sonda es complementaria a dicho ácido nucleico que codifica la SMO mutada o dicho fragmento de la misma. En algunas realizaciones, la sonda tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos. En algunas realizaciones, la sonda comprende adicionalmente un marcador detectable.

45 En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una proteína SMO mutante aislada que comprende una secuencia de aminoácidos, en la que la secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido distinto del triptófano en la posición de aminoácido que corresponde a la posición 281 de la secuencia de aminoácidos de SMO de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la divulgación 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 dicha secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido distinto del triptófano en el aminoácido 281. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido distinto del triptófano en el aminoácido 281. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos comprende cisteína (C) en el aminoácido 281.

55 En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a cualquiera de las proteínas SMO mutantes que se desvelan en el presente documento, en el que dicho anticuerpo no se une a la proteína SMO de tipo silvestre.

60 En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a una proteína SMO mutante que comprende un aminoácido distinto del triptófano en el aminoácido 281, en el que dicho anticuerpo no se une a la SMO de tipo silvestre que tiene un triptófano en el aminoácido 281. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico. En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un marcador detectable. En algunas realizaciones, el anticuerpo inhibe la actividad de SMO.

65 En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método de identificación de al menos una mutación de SMO en una muestra que comprende poner en contacto ácido nucleico de dicha muestra con una sonda de ácido nucleico

que es capaz de hibridarse específicamente con el ácido nucleico que codifica una proteína SMO mutada o un fragmento de la misma que incorpora una mutación que altera la secuencia que codifica el aminoácido 281 con un aminoácido distinto del triptófano y detectar dicha hibridación. En algunas realizaciones, la sonda está marcada de forma detectable. En algunas realizaciones, la sonda es un oligómero no codificante. En algunas realizaciones, el gen de SMO o un fragmento de la misma en dicho ácido nucleico de dicha muestra se amplifica y se pone en contacto con dicha sonda.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para identificar un tumor en un sujeto humano que es o se vuelve resistente al tratamiento con GDC-0449 que comprende determinar la presencia de un gen de SMO mutado o una proteína SMO mutada en una muestra de dicho tumor, en la que dicho gen de SMO mutado codifica una proteína SMO que comprende una mutación en el aminoácido 281 y en la que dicha proteína SMO comprende una mutación en el aminoácido 281, por lo que la presencia de dicho gen de SMO mutado o proteína SMO mutada indica que dicho tumor es resistente al tratamiento con un GDC-0449. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente tratar a dicho sujeto que tiene un tumor que no es o ya no es susceptible al tratamiento con GDC-0449 con un compuesto que se une a dicha SMO mutada. En algunas realizaciones, la presencia o ausencia de dicha mutación se determina examinando una muestra de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la presencia o ausencia de dicha mutación se determina examinando una muestra de proteína.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para seleccionar compuestos que inhiben la señalización de una proteína SMO mutante que incorpora una mutación en el aminoácido 281 que comprende poner en contacto dicha SMO mutante con un compuesto de ensayo y detectar la unión de dicho compuesto a dicha SMO mutante, por lo que la unión de dicho compuesto de ensayo a la SMO mutante indica que dicho compuesto de ensayo es un inhibidor de la SMO mutante.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para seleccionar compuestos que inhiben la señalización de una proteína SMO mutante que incorpora una mutación en el aminoácido 281 que comprende poner en contacto una célula que expresa dicho SMO mutante con un compuesto de ensayo y detectar la actividad de Gli en dicha célula, por lo que la presencia de actividad de Gli indica que dicho compuesto de ensayo no es un inhibidor de SMO mutante.

La divulgación 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 idéntica en al menos un 95 % a la SEQ ID NO: 2, en las que dicha secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido en la posición 281 de la SEQ ID NO: 2 que es cualquier aminoácido distinto del triptófano (W). En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 281 de la SEQ ID NO: 2 es cisteína (C). En un aspecto de la divulgación, la secuencia de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de ácido nucleico parental de la SEQ ID NO: 5 (SMO de tipo silvestre), pero contiene una mutación o mutaciones en las posiciones 841, 842 y/o 843 que cambian el aminoácido codificado del triptófano (W) a un aminoácido diferente. En algunas realizaciones, las mutaciones dan como resultado un cambio de triptófano (W) a cisteína (C).

En otro aspecto, la divulgación proporciona sondas de ácido nucleico capaces de hibridarse específicamente con un ácido nucleico que codifica una proteína SMO mutada o un fragmento de la misma que incorpora una mutación en el aminoácido 281 de SMO. En una realización, la sonda es complementaria al ácido nucleico que codifica la SMO mutada o a 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 de forma detectable. La sonda se une diferencialmente a Smo mutante sobre Smo de tipo silvestre (que tiene un triptófano en la posición 281).

La divulgación también contempla fragmentos de dichos ácidos nucleicos que abarcan la región de las mutaciones descritas anteriormente en fragmentos que tienen al menos 20 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, los fragmentos de nucleótidos tienen una longitud de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nucleótidos. Los fragmentos pueden tener cualquier longitud que abarque la región de las mutaciones descritas anteriormente hasta la molécula de ácido nucleico que codifica SMO mutante de longitud completa.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona proteínas SMO mutantes o fragmentos de las mismas.

En algunas realizaciones, la proteína SMO comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % a la SEQ ID NO: 1, a condición de que la secuencia de aminoácidos comprenda un aminoácido distinto del triptófano (W) en la posición del aminoácido que corresponde a la posición 281 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la proteína SMO comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % a la SEQ ID NO: 1, a condición de que la proteína SMO comprenda una cisteína (C) en la posición del aminoácido que corresponde a la posición 281 de la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, la SMO humana mutante se muestra en la SEQ ID NO: 2 en la que el aminoácido 281 se muestra como "Xaa" que, con respecto a la presente solicitud, representa cualquier aminoácido distinto del triptófano (W). En algunas realizaciones, el Xaa es cisteína (C).

La divulgación proporciona adicionalmente un anticuerpo que se une específicamente a la proteína SMO mutante de la divulgación en el que el epítipo del anticuerpo está presente en una SMO mutante que tiene un aminoácido distinto del triptófano en la posición 281, pero no se une a 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 monocatenario o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, un Fab, un Fab', un F(ab')₂ o un fragmento Fv). En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un marcador detectable. En otras realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico, tal como, pero no limitado a un agente quimioterápico, una toxina o un isótopo radioactivo. En algunas realizaciones, el anticuerpo inhibe la actividad de SMO. En otras realizaciones, el anticuerpo inhibe solamente la actividad de SMO mutante.

La divulgación proporciona adicionalmente un método de identificación de al menos una mutación de 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 con un ácido nucleico que codifica una proteína SMO mutada o un fragmento de la misma que incorpora una mutación y detectar la hibridación. La mutación de SMO se produce en Smo en las posiciones 841, 842 y/o 843 (codificando el aminoácido en la posición 281) en la que la mutación da como resultado un codón que codifica un aminoácido distinto del triptófano. En algunas realizaciones, la sonda está marcada de forma detectable. En algunas realizaciones, la sonda es un oligómero no codificante. En algunas realizaciones, el ácido nucleico del gen de SMO o un fragmento del mismo en la muestra se amplifica y se pone en contacto con la sonda.

La divulgación también proporciona un método para identificar un tumor en un sujeto humano que es susceptible de tratamiento con un inhibidor de SMO que comprende (i) determinar la presencia de una proteína o gen de SMO de tipo silvestre en una muestra del tumor, por lo que la presencia de una proteína o gen de 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 de SMO mutados en una muestra del tumor en la que la mutación produce un cambio de aminoácido en la posición 281 de SMO, por lo que la presencia de una proteína o gen de SMO mutados indica que el tumor no es susceptible al tratamiento con un inhibidor de SMO tal como GDC-0449. En algunas realizaciones, la mutación de SMO es un cambio del triptófano (W) 281 a cualquier otro aminoácido. En algunas realizaciones, el aminoácido es cisteína (C).

La divulgación también proporciona un método de determinación del pronóstico del paciente que está siendo tratado para un tumor dependiente de Hedgehog que comprende determinar en una muestra de un tumor la presencia o ausencia de una mutación en el aminoácido 281, por lo que la presencia de la mutación indica un peor pronóstico en comparación con la ausencia de dicha mutación usando ciertos inhibidores de Smo.

La divulgación proporciona adicionalmente un método de cribado de compuestos que inhiben la señalización de una proteína SMO mutante que incorpora una mutación en el aminoácido 281, que comprende poner en contacto la SMO mutante con un compuesto de ensayo y detectar la unión del compuesto a la SMO mutante, por lo que la unión del compuesto de ensayo a la SMO mutante indica que el compuesto de ensayo es un inhibidor de la SMO mutante.

La divulgación también proporciona un método de cribado de compuestos que inhiben la señalización de una proteína SMO mutante que incorpora una mutación en el aminoácido 281, que comprende poner en contacto una célula que expresa la SMO mutante con un compuesto de ensayo y detectar la actividad de Gli en la célula, por lo que la presencia de actividad 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 usando una proteína Gli que se conjuga con un marcador detectable. En algunas realizaciones, el marcador detectable es un marcador fluorescente (por ejemplo, luciferasa).

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1G muestran las secuencias de aminoácidos para SMO humana de tipo silvestre (1A) y para varias SMO mutantes humanas (1B-1I). La Figura 1A muestra la SEQ ID NO: 1. La Figura 1B muestra la SEQ ID NO: 2. La Figura 1C muestra la SEQ ID NO: 3. La Figura 1D muestra la SEQ ID NO: 4. La Figura 1E muestra la SEQ ID NO: 5. La Figura 1F muestra la SEQ ID NO: 6. La Figura 1G muestra la SEQ ID NO: 7.

La Figura 2 muestra los resultados de experimentos realizados para determinar los niveles de señalización de la vía de hedgehog en CCB resistentes a vismodegib.

La Figura 3 muestra los resultados de experimentos realizados para determinar la frecuencia de una mutación SMO-A459V en biopsias anteriores al tratamiento previo y posteriores al tratamiento.

La Figura 4 muestra el bolsillo de unión a vismodegib de una SMO mutante que tiene una mutación W281.

La Figura 5A muestra los resultados de experimentos realizados para determinar si el mutante SMO-A459V es sensible a PTCH. La Figura 5B muestra los resultados de experimentos realizados para determinar si el mutante SMO-A459V es sensible a vismodegib. La Figura 5C muestra los resultados de experimentos realizados para determinar si los mutantes SMO-A459V, SMO-W281C y SMO-W535L son mutaciones activadoras. La Figura 5D muestra los resultados de experimentos realizados para determinar si el mutante SMO-W281C es sensible a PTCH. La Figura 5E muestra los resultados de experimentos realizados para determinar si el mutante SMO-W281C es sensible a vismodegib. La Figura 5F muestra los resultados de experimentos realizados para determinar si SMO-A459V y SMO-W281C tienen una unión alterada a vismodegib.

La Figura 6A muestra un esquema de la vía de Hh. La Figura 6B muestra fotografías de exploración que muestran la respuesta inicial y la progresión de la enfermedad de un CCB esporádico del paciente 12 (PT12) que metastató al pulmón. Una flecha de color rojo indica la lesión objetivo en las exploraciones por tomografía computarizada (TC) del tórax antes del tratamiento (PreRx) y después de 4 (que muestra una disminución en el tamaño de la lesión) y 37 (que revela progresión de la enfermedad) meses de tratamiento con vismodegib. La Figura 6C muestra fotografías de dos CCB localmente avanzados de un paciente con síndrome de Gorlin (PT10) que inicialmente respondió a vismodegib, pero después recayeron (flecha de color negro) después de la duración indicada del tratamiento. La Figura 6D muestra secciones teñidas con hematoxilina y eosina (HyE) de un CCB esporádico localmente avanzado del paciente 9.1 (PT09.1) antes y después de 11 meses de tratamiento con vismodegib. Téngase en cuenta que la lesión recurrente mantiene la histología del tumor sin tratar. La barra de escala representa 50 μm . La Figura 6E es un gráfico que muestra los niveles de expresión de GLI1 y MKI67 en biopsias de piel normal y resistente a vismodegib. Coeficiente de correlación de Pearson (R) = 0,96. Se muestran recuentos de lectura normalizados. La Figura 6F es una visión de conjunto tabular de alteraciones genéticas en genes de la vía de Hh y TP53 identificadas en 12 pacientes con CCB recidivante. Se notifican variantes de la estirpe germinal PTCH1 para CCB Gorlin, mientras que solo se muestran mutaciones somáticas para CCB esporádicos. Se obtuvieron dos biopsias de distintas regiones tras el rebrote del mismo tumor inicial para PT06, PT08 y PT09. Dos CCB separados desarrollaron resistencia en el paciente PT10. Se determinó la PDH por frecuencias de alelos menores de matrices de SNP (polimorfismo de único nucleótido por sus siglas en inglés). Los cuadros de color verde resaltan los acontecimientos de PDH seguidos de la ganancia del número de copias del alelo mutante. Se determinó la expresión específica de alelo por secuenciación de ARN.

La Figura 7 es una tabla que muestra variantes de SMO identificadas en CCB esporádicos sin tratamiento. SMO-A239V no se había notificado anteriormente (COSMIC/dbSNP), mientras que todos los demás son mutaciones oncogénicas notificadas anteriormente. Nota: la asignación de variante (*variant calling*) dirigida identificó SMO-A239V, sin embargo, debido a un punto de corte de lectura diferente y a una sensibilidad reducida, el asignador de variante (*variant caller*) somática VariantTools no lo hizo.

La Figura 8A muestra una visión de conjunto tabular de mutaciones de SMO identificadas en este estudio. Todas las mutaciones fueron de naturaleza somática, ya que no se detectaron ni en la sangre ni en ningún otro tejido del mismo paciente. La Figura 8B muestra un modelo computacional de vismodegib (color amarillo) acoplado a la estructura cristalina de la región TM de SMO (hélices de color gris; Wang *et al.*, 2013). Los restos mutantes anteriormente sin caracterizar se resaltan en color verde. Las Figuras 8C-E son gráficos de barras que muestran la prevalencia de mutaciones de SMO en biopsias antes y después del tratamiento. Los gráficos de barras muestran la frecuencia de incorporación de nucleótidos de tipo silvestre (color azul) o mutantes (color rojo) en las posiciones correspondientes a SMO-A459V para PT03, PT04 y PT12 (8C), SMO-V321M para PT09 (8D) y SMO-L412F para PT11 (8E) según se determinó por pirosecuenciación. Téngase en cuenta que se espera que las mutaciones de SMO sean heterocigóticas y que el número de copias de SMO determina el valor máximo del eje Y, que es del 50 % para PT03, PT04, PT12, PT10 y PT11 (el número de copia de SMO es de 2) y del 25 % para PT09 (el número de copia de SMO es de 4). Se consideró que la incorporación de nucleótidos mutantes estaba dentro de los niveles de fondo (<5 %) del ensayo de pirosecuenciación en todas las muestras de tratamiento anterior. Los datos de los ensayos por cuadruplicado se representan con respecto al control de sangre. Las barras de error representan el intervalo de los datos. La Figura 8F muestra fotografías de un CCB (flecha de color blanco) localmente avanzado de PT11 que inicialmente respondió a vismodegib, pero posteriormente recayó después del tiempo indicado.

La Figura 9 es un esquema que muestra la localización de mutaciones identificadas en CCB sin tratamiento previo (S278I, color gris claro), CCB resistentes (color negro) o ambos (L412F, W535L, color gris claro) dentro de los dominios proteicos de SMO. Los asteriscos resaltan mutaciones oncogénicas notificadas anteriormente. Las hélices TM se representan mediante cilindros.

La Figura 10A muestra un modelo de acoplamiento computacional que muestra una vista desde arriba de la unión de vismodegib (color amarillo) a SMO (color gris) y que revela la proximidad de W281, V321 y 1408 (todo de color verde) al bolsillo de unión al fármaco. La Figura 10B, a la izquierda, muestra la posición de V321 y W281 (ambos de color verde) con respecto a vismodegib (color amarillo). La Figura 10B, en el centro, muestra que el mutante C281 de PT02 probablemente interrumpe la interacción con vismodegib. La Figura 10B, a la derecha, muestra que se espera que el mutante M321 de PT09 afecte a la conformación de W281. La Figura 10C muestra que se predice que la mutación de I408 (izquierda) a valina (derecha) afectará al empaquetamiento de H470 y V404, ambos de los cuales interactúa con vismodegib. Esta mutación puede provocar cambios aún mayores en la estructura global de la cadena principal de la proteína y, por tanto, puede afectar a la unión del fármaco a través de un efecto de segunda cubierta. En todos los paneles se resaltan los restos mutantes en texto de color rojo.

La Figura 11A es un gráfico que muestra la actividad indicadora de *Gli*-luciferasa en células C3H10T $\frac{1}{2}$ transfectadas con las construcciones de SMO indicadas. Los valores se normalizaron a la actividad de SMO-WT (SMO de tipo silvestre por sus siglas en inglés) y los datos representados son la media \pm DT de los triplicados.

La Figura 11B es un gráfico que muestra los resultados del ensayo de indicador *Gli*-luciferasa en células C3H10T $\frac{1}{2}$ transfectadas con relaciones indicadas de PTCH1 con respecto a construcciones de expresión de SMO. Los valores se normalizaron con respecto a la actividad sin cotransfección de *PTCH1* y los datos representados son la media \pm DT de los triplicados. La Figura 11C es una tabla que muestra la expresión en la superficie celular de mutantes con bolsillo de unión a fármaco de SMO en células HEK-293. Los valores mostrados son el porcentaje de células viables con expresión en la superficie celular de SMO, según se determinó por FACS para 10.000 acontecimientos celulares y la activación de células transfectadas con vector vacío y yoduro de propidio (PI, por

sus siglas en inglés). La Figura 11D es un gráfico que muestra los resultados de la incorporación de metil-[3H]-timidina de células precursoras de neuronas de gránulos cerebelares de pacientes infectados con virus Cre (tRFP-IRES-eGFPcre), virus Control (solo tRFP) o sin transducir (sin virus), cultivadas con o sin SHH. La incorporación de metil-[3H]-timidina se expresa en recuentos por minuto (RPM) y los datos representados son la media +/- DT de los triplicados. La Figura 11E es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de células precursoras de neuronas de gránulos cerebelares (PNGC) *Ptch1loxP/loxP Tp53loxP/loxP Rosa26LSL-tdTomato* (PPT) positivas para la expresión de TdTomato después de la infección con las construcciones víricas indicadas, según se determinó por FACS para 10.000 acontecimientos celulares y activación en células no transducidas. La Figura 11F es un gráfico de barras que muestra la cuantificación de niveles de ARNm de SMO humano en las PNGC de PPT del panel E mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa, por sus siglas en inglés) cuantitativa. Los datos son valores de $2^{-\Delta Ct}$ con respecto al gen constitutivo murino *Rpl19* y se representan como la media +/- DT de los triplicados.

La Figura 12A es un gráfico que muestra la actividad indicadora de *Gli*-luciferasa normalizada en células C3H10T $\frac{1}{2}$ transfectadas con construcciones de SMO indicadas, después de una respuesta a la dosis con vismodegib. Los valores se normalizaron para la actividad sin tratar y los datos representados son la media +/- desviación típica (DT) de los triplicados. Los valores de CI50 se calcularon después del ajuste de regresión no lineal. La Figura 12B es un gráfico de barras que muestra la unión de [3H]-vismodegib a células HEK-293 transfectadas con construcciones de SMO indicadas. VV significa vector vacío y la unión del fármaco se midió en recuentos por minuto (rpm). La unión específica se calculó después de la competencia con un exceso de vismodegib sin marcar restando la unión no específica de la unión total. Los datos mostrados son la media +/- DT. La Figura 12C es un diagrama del esquema de transducción vírica de las PNGC primarias. Solo las PNGC transducidas proliferan en ausencia de SHH, lo que permite a los inventores someter a ensayo específicamente la capacidad de las variantes de SMO para promover la proliferación en presencia de vismodegib. La Figura 12D es una serie de gráficos que muestran la incorporación de metil-[³H]-timidina normalizada de PNGC de PPT transducidas con virus indicados, después de una respuesta a la dosis con vismodegib después de la eliminación del ligando SHH. Cada gráfico muestra los mismos datos de control. Los datos representados son la media +/- DT de los triplicados.

La Figura 13A es un modelo que muestra que se predice que un total de 21 restos (bolas de color gris oscuro) tendrán átomos dentro de 4,5 Å de vismodegib (bolas de color gris claro) unidos a la estructura TM de SMO (hélices de color gris). La Figura 13B es un modelo que muestra que N219, D384 y S387 forman una red de enlaces de hidrógeno (líneas discontinuas). Es probable que la mutación de cualquiera de estos restos cambie la forma del bolsillo de unión de vismodegib. La Figura 13C muestra una actividad indicadora de *Gli*-luciferasa en células C3H10T $\frac{1}{2}$ transfectadas con construcciones de SMO indicadas y tratadas con vismodegib 1 μ M. Los valores se normalizaron a niveles de actividad sin tratar para cada construcción y los datos representados son la media +/- DT de los triplicados.

La Figura 14A muestra un modelo computacional de vismodegib (bolas de color gris claro) acoplado a la estructura cristalina de la región TM de SMO (hélices de color gris; Wang *et al.*, 2013). Los restos mutantes distales al bolsillo de unión al fármaco se resaltan en color gris oscuro. La Figura 14B es un gráfico de barras que muestra los resultados de una actividad indicadora de *Gli*-luciferasa en células C3H10T $\frac{1}{2}$ transfectadas con construcciones de SMO indicadas. Los valores se normalizaron a niveles de actividad de SMO-WT y los datos representados son la media +/- DT de los triplicados.

La Figura 15A es un gráfico que muestra la actividad indicadora de *Gli*-luciferasa normalizada en células C3H10T $\frac{1}{2}$ transfectadas con construcciones de SMO indicadas, después de una respuesta a la dosis con vismodegib. Los datos representados son la media +/- DT de los triplicados. La Figura 15B es un gráfico de barras que ilustra la unión de [3H]-vismodegib a células HEK-293 transfectadas con la construcción de SMO indicada. Las células sin transfectar (Sin) y las células transfectadas con un vector vacío (VV) se incluyeron como controles. La unión del fármaco se midió en recuentos por minuto (rpm) y la unión específica se calculó después de la competición con un exceso de vismodegib sin marcar restando la unión no específica de la unión total. La Figura 15C es una tabla que muestra la expresión en la superficie celular de mutantes de SMO activadores en células HEK-293. Los valores mostrados son el porcentaje de células viables con expresión en la superficie celular de SMO, según se determina por FACS para 10.000 acontecimientos celulares y activación en células transfectadas con vector vacío y PI. La Figura 15D es un gráfico que muestra la incorporación de metil-[³H]-timidina normalizada de PNGC de PPT transducidas con virus indicados, después de una respuesta a la dosis con vismodegib después de la eliminación del ligando SHH. Los datos representados son la media +/- DT de los triplicados. Se muestran dos experimentos independientes.

La Figura 16A muestra la incorporación de metil-[³H]-timidina normalizada de PNGC de PPT transducidas con diversas variantes de SMO y tratadas con 500 nM de compuestos indicados. Para cada conjunto de datos para el tipo silvestre (WT, por sus siglas en inglés) o mutante de SMO evaluado, los datos para cada una de las siguientes condiciones de tratamiento se presentan como barras en el siguiente orden de izquierda a derecha: vismodegib, LY2940680, LDE225 y compuesto 5. Los valores se normalizaron a niveles de proliferación sin fármaco y los datos representados son la media +/- DT de los triplicados. Téngase en cuenta que la proliferación residual de SMO-WT en presencia de fármaco se debe a la contaminación de estos cultivos de PNGC primarias por fibroblastos y células gliales. La Figura 16B muestra los mismos datos que en 16A, pero las PNGC transducidas se trataron con 1 μ M de vismodegib o JQ1. Téngase en cuenta que hay menos proliferación residual en SMO-WT con JQ1, lo que sugiere que este compuesto también inhibe la proliferación celular independiente de Hh.

Descripción detallada

Es un descubrimiento de la presente divulgación que se producen acontecimientos mutacionales asociados a la resistencia a la quimioterapia para tumores dependientes de hedgehog en Smoothed (SMO) que confieren resistencia de los tumores al tratamiento con compuestos que inhiben la señalización de hedgehog tales como ciclopamina y GDC-0449. La presente divulgación proporciona composiciones y métodos que son útiles como productos pronósticos, diagnósticos y terapéuticos para el cáncer que depende de la señalización de Hedgehog.

Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en el presente documento en general se entienden bien y se emplean habitualmente usando la metodología convencional por los expertos en la materia, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas que se describen en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, *et al.* editores, (2003)); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor editores (1995)), Harlow y Lane, editores (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, editores, 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir y C. C. Blackwell, editores); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller y M. P. Calos, editores, 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, editores, 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan *et al.*, editores, 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd y C. Dean, editores, 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, editores, Harwood Academic Publishers, 1995) y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V. T. DeVita *et al.*, editores, J.B. Lippincott Company, 1993).

Para los fines de la interpretación de la presente memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando sea apropiado, los términos utilizados en singular incluirán también el plural y viceversa.

Antes de continuar describiendo la presente divulgación con más detalle, ha de entenderse que la presente divulgación no se limita a composiciones o etapas específicas del proceso, ya que éstas pueden variar. Ha de tenerse en cuenta que, como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "a", "un", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia con la que se relaciona la presente divulgación. Por ejemplo, el *Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology*, Juo, Pei-Show, 2º ed., 2002, CRC Press; *The Dictionary of Cell and Molecular Biology*, 3ª ed., 1999, Academic Press; y el *Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology*, Revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan a los expertos un diccionario general de muchos de los términos utilizados en la presente divulgación.

Los aminoácidos pueden denominarse en el presente documento ya sea por sus símbolos de tres letras habitualmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Los nucleótidos, análogamente, pueden denominarse por sus códigos de una sola letra habitualmente aceptados.

Es conveniente señalar en este punto que "y/o" donde se usa en el presente documento ha de tomarse como divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como una divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se expusiera individualmente en el presente documento.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. Como se usan en el presente documento, los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" engloban, al menos, cualquiera de las proteínas SMO mutantes, variantes o fragmentos de las mismas que se describen en el presente documento.

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

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de investigación, diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros

- solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo como se determina mediante, por ejemplo, el método de Lowry y, en algunas realizaciones, hasta más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de, por ejemplo, un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, Coomassie azul o tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.
- Los "anticuerpos nativos" son por lo general glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una superficie de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.
- La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino-terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada puede denominarse "V_H". El dominio variable de la cadena ligera puede denominarse "V_L". Estos dominios son generalmente las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.
- El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en su secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR, del inglés *hypervariable regions*), tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco conservadas (FR, del inglés *framework regions*). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, adoptando en gran parte una configuración de lámina beta, conectadas por tres HVR, que forman bucles que conectan y en algunos casos forman parte de la estructura de la lámina beta. Las HVR de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Instituto Nacional de Salud de los EE.UU., Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están involucrados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.
- Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.
- Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de éstas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidos y se describen en general en, por ejemplo, Abbas *et al.* *Cellular and Mol. Immunology*, 4ª ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.
- Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo entero" se utilizan en el presente documento indistintamente para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no fragmentos de anticuerpos como se definen a continuación. Las expresiones se refieren en particular a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.
- Un "anticuerpo desnudo" para los fines del presente documento es un anticuerpo que no está conjugado a un resto citotóxico o un radiomarcador.
- Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto y, en algunas realizaciones, comprende la región de unión al antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaina de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y todavía es capaz de entrecruzar un antígeno.

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

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para el Fab' en el que el resto o restos cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

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

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

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

El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo es obtenerse a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no ha de interpretarse que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan de acuerdo con la presente divulgación pueden hacerse mediante diversas técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, segunda edición. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN

recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004) y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004) y tecnologías para la producción de anticuerpos humanos o similares a los humanos en animales que tienen partes o la totalidad de los loci de inmunoglobulinas humanas o genes que codifican secuencias de inmunoglobulinas humanas (véase, por ejemplo, el documento WO 1998/24893; el documento WO 1996/34096; el documento WO 1996/33735; el documento WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7: 33 (1993); Patentes de los EE.UU. N.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

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

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

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

Las expresiones "región hipervariable", "HVR" o "HV," cuando se usan en el presente documento se refieren a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En anticuerpos nativos, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de los seis HVR y se cree que H3, en particular, desempeña un papel singular en la función de conferir una especificidad fina a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu *et al.*, *Immunity* 13: 37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248: 1-25 (Lo, ed, Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélidos de origen natural que consisten en una cadena pesada solamente son funcionales y estables en ausencia de la cadena ligera. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363: 446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3: 733-736 (1996).

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

Bucle	C	Contacto
L1	LLL	L30-L36
L2	LLL	L46-L55
L3	LLL	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B H H30 (Numeración de Kabat)
H1	HHH	H30 (Numeración de Chothia)
H2	HHH	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102 H9 H93-H101

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

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

La expresión "numeración de restos del dominio variable como en Kabat" o "numeración de la posición de aminoácidos como en Kabat" y variaciones de las mismas, se refieren al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, citado anteriormente. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento o una inserción en una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de un solo aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto FR de cadena pesada 82. La numeración de Kabat de restos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada "patrón" de Kabat.

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

Un anticuerpo de "afinidad madurada" es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo precursor que no posee esa o esas alteraciones. En una realización, los anticuerpos de afinidad madurada tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al. Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) describe la maduración de la afinidad por redistribución del dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los restos HVR y/o FR se describe, por ejemplo, por Barbas *et al. Proc Nat. Acad. Sci USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier *et al. Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton *et al. J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al., J. Immunol.* 154(7): 3310-9 (1995) y Hawkins *et al. J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992).

Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno

al que se une. Ciertos anticuerpos bloqueante o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

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

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

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

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

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

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

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

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

60 "Receptor Fc" o "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones, un FcR es uno que se une un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas con empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo inmunoreceptor con activación basada en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene motivo inmunoreceptor con inhibición basada en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico. (Véase, por ejemplo, Daëron, *Annu Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457-92 (1991); Capel

et al., Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al., J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están incluidos en el término "FcR" en el presente documento.

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

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

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

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

35 "Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al., J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996). Se describen variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos alteradas de la región Fc y capacidad aumentada o disminuida de unión a C1q en la patente de Estados Unidos N.º 6.194.551B1 y el documento WO99/51642. Véase, también, Idusogie *et al. J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

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

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

65 En una realización, la "Kd" o el "valor de Kd" de acuerdo con la presente divulgación se mide mediante un ensayo de unión de antígeno radiomarcado (RIA, del inglés *radiolabeled antigen binding assay*) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de

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

De acuerdo con otra realización, la K_d o el valor de K_d se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIACORE™-2000 o un BIACORE™-3000 (BIACORE, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie de factor de dilución dos de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo TWEEN-20™ al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo simple de unión uno-a-uno de Langmuir (BIACORE® Evaluation Software versión 3.2) por ajuste simultáneo de los sensores de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la razón k_{off}/k_{on}. Véase, por ejemplo, Chen, Y., *et al.*, *J. Mol Biol* 293: 865-881 (1999). Si la tasa de asociación excede de 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la tasa de asociación puede determinarse usando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con un espectrofotómetro equipado con flujo discontinuo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

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

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

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

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

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

Una proteína "aislada" es una proteína que se separa de al menos otro componente celular al que está asociada normalmente, por ejemplo, en su entorno natural. En algunas realizaciones, una proteína "aislada" es una proteína expresada en una célula en la que la proteína normalmente no se expresa. En algunas realizaciones, la proteína aislada es una proteína recombinante.

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

"Polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen el ADN y el ARN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es una molécula de ADNc o un fragmento de la misma. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por la ADN o la ARN polimerasa o mediante una reacción de síntesis. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación de la estructura nucleotídica puede conferirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede comprender una modificación o modificaciones hechas después de la síntesis, tal como la conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, las "caperuzas", la sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, las modificaciones entre nucleótidos tales como, por ejemplo, aquellos con enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, etc.), aquellos que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, señales peptídicas, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del o los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo habitualmente presentes en los azúcares puede remplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o puede conjugarse con soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3' terminal puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de protección con caperuza orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleosídicos básicos tales como metil ribósido. Puede remplazarse uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en las que el fosfato es reemplazado por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("dilitioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o sin sustituir (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido tienen que ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos referidos en el presente documento, incluyendo el ARN y el ADN.

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

El término "Smo," o "SMO" como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proteína smoothed nativa o ácido nucleico de cualquier vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término abarca SMO "de longitud completa", sin procesar, así como cualquier forma de SMO que es resultado del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes de SMO de origen natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas. En algunas realizaciones, "Smo mutante" o "polipéptido SMO mutante" o "proteína SMO mutante" como se usa en el presente documento, se refieren a una SMO que tiene una mutación en la segunda transmembrana de SMO en la

posición 281 de la SMO humana, a una SMO que tiene una mutación en el quinto dominio transmembrana de SMO en la posición 408 de la SMO humana, a una SMO que tiene una mutación en el dominio transmembrana 6 de SMO en la posición 459 de la SMO humana y/o a SMO que tiene una mutación en la porción carboxi terminal del dominio transmembrana 7 de SMO en la posición 533 o 535 de la SMO humana. En algunas realizaciones, "SMO mutante" o "polipéptido SMO mutante" o "proteína SMO mutante" como se usan en el presente documento, se refieren a un polipéptido smoothed que comprende una mutación en un aminoácido que corresponde a la posición 281, de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la mutación en la posición 281 de la SEQ ID NO: 1 comprende W281C. De forma similar, se describe que una proteína SMO mutante tiene una variación en una o más de las posiciones anteriores de la SMO humana de tipo silvestre. La divulgación contempla que cualquiera de los polipéptidos mutantes o ácidos nucleicos descritos en el presente documento puede describirse con respecto a un identificador de secuencia o describirse con respecto a la SMO humana de tipo silvestre. Además, pueden describirse mutantes con respecto a la SEQ ID NO: 1 o pueden describirse con respecto a cualquiera de los otros identificadores de secuencia.

En algunas realizaciones, como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones tales como "tratar" o "tratado") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o la célula que se trata, y puede realizarse ya sea como profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la prevención de la aparición o la reaparición de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación de la patología y la remisión o un pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno o para ralentizar la progresión de una enfermedad o trastorno. En algunas realizaciones, como se usa en el presente documento, "tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refiere a mejorar, aliviar y/o disminuir la gravedad de uno o más síntomas de una afección que se está tratando. A modo de ejemplo, tratar el cáncer se refiere a mejorar (mejorar el estado del paciente), aliviar, retrasar o ralentizar la progresión o aparición, disminuir la gravedad de uno o más síntomas de cáncer. Por ejemplo, tratar el cáncer incluye uno o más de: disminución del tamaño tumoral, disminución de la tasa de aumento del tamaño tumoral, reducción del aumento del tamaño, disminución del número de metástasis, disminución del dolor, aumento de la supervivencia y aumento de la supervivencia sin progresión.

"Tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refiere a mejorar, aliviar y/o disminuir la gravedad de uno o más síntomas de una afección que se está tratando. A modo de ejemplo, tratar el cáncer se refiere a mejorar (mejorar el estado del paciente), aliviar, retrasar o ralentizar la progresión o aparición, disminuir la gravedad de uno o más síntomas de cáncer. Por ejemplo, tratar el cáncer incluye uno o más de: disminución del tamaño tumoral, disminución de la tasa de aumento del tamaño tumoral, reducción del aumento del tamaño, disminución del número de metástasis, disminución del dolor, aumento de la supervivencia y aumento de la supervivencia sin progresión. "Diagnosticar" se refiere al proceso de identificar o determinar las características distintivas de una enfermedad o tumor. En el caso del cáncer, el proceso de diagnóstico a veces también se expresa como estadificación o clasificación de tumores basada en la gravedad o la progresión de la enfermedad.

"Diagnosticar" se refiere al proceso de identificar o determinar las características distintivas de una enfermedad o tumor. En el caso del cáncer, el proceso de diagnóstico a veces también se expresa como estadificación o clasificación de tumores basada en la gravedad o la progresión de la enfermedad.

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

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

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

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

La expresión "agente citotóxico" como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o impide

una función celular y/o causa la muerte o la destrucción celular. La expresión pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² y los isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos que se desvelan a continuación. Otros agentes citotóxicos se describen a continuación. Un agente tumoricida causa la destrucción de las células tumorales.

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

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

SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inhibidor de la COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor del proteosoma (por ejemplo PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersén de sodio (GENASENSE®); Pixantrona; Inhibidores del EGFR (véase la definición a continuación); inhibidores de tirosina cinasa (véase la definición a continuación); inhibidores de la serina-treonina cinasa, tales como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); inhibidores de la farnesiltransferasa tales como lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tal como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

Los agentes quimioterápicos que se definen en el presente documento incluyen "agentes antihormonales" o "agentes terapéuticos endocrinos", que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer. Pueden ser hormonas sí mismas, incluyendo, pero no limitadas a: antiestrógenos con perfil agonista/antagonista mixto, incluyendo, tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, fadrozol, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, keoxifeno y moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM) tales como SERM3; antiestrógenos puros sin propiedades agonistas, tales como fulvestrant (FASLODEX®) y EM800 (dichos agentes pueden bloquear la dimerización de los receptores de estrógenos (ER, del inglés *estrogen receptor*), inhibir la unión al ADN, aumentar la renovación de ER y/o suprimir los niveles de ER); inhibidores de la aromatasa, incluyendo los inhibidores de la aromatasa esteroideos tales como formestano y exemestano (AROMASIN®) y los inhibidores de la aromatasa no esteroideos tales como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de la aromatasa incluyen vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol y 4(5)-imidazoles; agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante, incluyendo leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, buserelina y triptorelina; esteroideos sexuales, incluyendo progestinas tales como el acetato de megestrol y el acetato de medroxiprogesterona, estrógenos tales como dietilestilbestrol y premarina y andrógenos/retinoides tales como fluoximesterona, ácido todo trans-retinoico y fenretinida; onapristona; antiprogesterasas; reguladores negativos del receptor de estrógeno (ERD, del inglés *estrogen receptor down-regulators*); antiandrógenos tales como flutamida, bicalutamida y nilutamida; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa SMO) *in vitro* o *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células (tales como una célula que expresa SMO) en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueantes clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en Mendelsohn e Israel, editores, *The Molecular Basis of Cancer*, Capítulo 1, titulado "*Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs*" por Murakami *et al.* (W.B. Saunders, Filadelfia, 1995), por ejemplo, pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos ambos derivados del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células.

Un "antagonista de Smo mutante" es un compuesto que inhibe la actividad biológica de una SMO que tiene una sustitución de aminoácido en la posición 281 de la SMO humana que cambia el aminoácido de tipo silvestre en esta posición por cualquier otro aminoácido. En algunas realizaciones, la actividad biológica de la SMO es la capacidad de transducir una señal tras la estimulación con hedgehog a la activación del factor de transcripción Gli.

La expresión "inhibidor de la vía de hedgehog", como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a un agente que es capaz de inhibir la señalización de hedgehog en una célula. En realizaciones particulares, el antagonista de hedgehog es capaz de inhibir la señalización de hedgehog en una célula que expresa cualquiera de las proteínas SMO mutantes que se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, el inhibidor de la vía de hedgehog es capaz de inhibir la señalización de hedgehog en una célula que expresa un polipéptido *smoothened* que comprende una mutación en el aminoácido que corresponde a 281 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el inhibidor de la vía de hedgehog es capaz de inhibir la señalización de hedgehog en una célula que expresa un polipéptido *smoothened* que comprende la siguiente mutación: W281C.

I. Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos de la divulgación incluyen secuencias que codifican SMO mutantes aisladas. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos codifican una proteína SMO mutante que es parcial o totalmente resistente al vismodegib. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica una proteína SMO mutante que es parcial o totalmente

resistente al vismodegib en una célula que tiene una mutación adicional en un gen que codifica una proteína en la vía de señalización de hedgehog. En algunas realizaciones, la mutación adicional es cualquiera de las mutaciones parcheadas y/o SUFU que se describen en el presente documento.

5 La divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína SMO mutante en la que dicha secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido distinto del triptófano en la posición de aminoácido que corresponde a la posición 281 de la secuencia de aminoácidos de SMO de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica la cisteína (C) en la posición del aminoácido que corresponde a la posición 281 de la SEQ ID NO: 1.

10 La divulgación también incluye fragmentos de dichos ácidos nucleicos que abarcan la región de las mutaciones descritas anteriormente en fragmentos que tienen al menos 20 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, los fragmentos de nucleótidos tienen 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nucleótidos de longitud. Los fragmentos pueden tener cualquier longitud que abarque la región de las mutaciones descritas anteriormente hasta la molécula de ácido nucleico que codifica la SMO mutante de longitud completa. Pueden usarse SMO mutante aislado y fragmentos de la misma, por ejemplo, para la hibridación, para generar cebadores y sondas para los ensayos de pronóstico y diagnóstico de la divulgación y para la expresión en sistemas recombinantes (por ejemplo, para generar proteínas SMO mutantes o porciones de las mismas para su uso como inmunógenos y para su uso en ensayos de la divulgación como se describen en el presente documento).

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

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

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

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

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

55 Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de exploración de bibliotecas pueden compararse y alinearse con las secuencias conocidas para SMO y SMO mutante. La identidad de secuencia en cualquiera de los dominios transmembrana primero, segundo, quinto, sexto o séptimo, en la región carboxi-terminal del dominio 6 transmembrana, o la región carboxi-terminal del dominio transmembrana 7 puede determinarse usando métodos conocidos en la técnica.

60 Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos que codifican SMO incluyen oligonucleótidos no codificantes o codificantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico monocatenario (ya sea ARN o ADN) capaz de unirse al ARNm de SMO mutante diana (codificante) o secuencias de ADN (no codificante) de SMO mutante. Los oligonucleótidos no codificantes o codificantes, de acuerdo con la presente divulgación, comprenden un fragmento de la región codificante del ADN de SMO mutante que contiene la región de mutación. Un fragmento de este tipo

comprende generalmente al menos aproximadamente 14 nucleótidos y, en algunas realizaciones, de aproximadamente 14 a 30 nucleótidos. La capacidad de derivar un oligonucleótido no codificante o uno codificante, basada en una secuencia de ADNc que codifica una proteína dada se describe en, por ejemplo, Stein y Cohen (1988) *Cancer Res.* 48: 2659 y van der Krol *et al.* (1988) *BioTechniques* 6: 958.

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

20 Los ejemplos específicos de compuestos no codificantes útiles para inhibir la expresión de las proteínas SMO mutantes incluyen oligonucleótidos que contienen cadenas principales modificadas o enlaces entre nucleósidos no naturales. Los oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas incluyen los que conservan un átomo de fósforo en la cadena principal y los que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Para los fines de la presente memoria descriptiva, y como a veces se hace referencia en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen
25 un átomo de fósforo en su cadena principal internucleosídica también pueden considerarse oligonucleósidos. En algunas realizaciones, las cadenas principales de oligonucleótidos modificados incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfo triésteres, aminoalquilfosfotri-ésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilo incluyendo 3'-alquilo fosfonatos, 5'-alquilo fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, 30 tionalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y borano-fosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos unidos 2'-5' de éstos, y los que tienen polaridad invertida en los que uno o más enlaces internucleotídicos son un enlace 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos que tienen polaridad invertida comprenden un enlace sencillo 3' a 3' en el enlace 3'-más internucleotídico, es decir, un único resto de nucleósido invertido que puede ser abásico (falta la nucleobase o tiene un grupo hidroxilo en lugar de la misma). También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre. Las Patentes de los EE.UU. representativas que muestran la preparación de enlaces que contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de los EE.UU. N.º: 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 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.

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

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

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos no codificantes incorporan cadenas principales de fosforotioato y/o cadenas principales de heteroátomos y en particular $-\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2-$ (conocido como una cadena principal de metileno (metilimino) o MMI), $-\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$ y $-\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2-$ (en el que la cadena principal de fosfodiéster nativa se representa como $-\text{O-P-O-CH}_2-$) que se describen en la Patente de los EE.UU. N.º 5.489.677 anteriormente referenciada y las cadenas principales de amida de la Patente de los EE.UU. N.º 5.602.240 anteriormente referenciada. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos no codificantes que tienen estructuras de cadena principal de morfolino de la Patente de los EE.UU. N.º 5.034.506 anteriormente referenciada.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-alquilo, S-alquilo o N-alquilo; O-alqueno, S-alqueno o N-alqueno; O-alquino, S-alquino o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, en el que el alquilo, el alqueno y el alquino pueden ser alquilo C1 a C10 o alqueno C2 a C10 y alquino sustituidos o sin sustituir. En algunas realizaciones, los nucleótidos son $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ y $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, en los que n y m son de 1 a aproximadamente 10. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos no codificantes comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C1 a C10, alquilo inferior sustituido, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH_3 , OCN, Cl, Br, CN, CF_3 , OCF_3 , SOCH_3 , SO_2CH_3 , ONO_2 , NO_2 , N_3 , NH_2 , heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tengan propiedades similares. En algunas realizaciones, una modificación incluye 2'-metoxietoxi (2'-O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin *et al.* (1995) *Helv. Chim Acta* 78: 486-504), es decir, un grupo alcoxialcoxi. En algunas realizaciones, una modificación incluye 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos en el presente documento a continuación y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o de 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O- $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2)$.

En algunas realizaciones, una modificación adicional incluye ácidos nucleicos bloqueados (LNA, del inglés *locked nucleic acid*) en los que el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcar formando así un resto de azúcar bicíclico. El enlace es, en algunas realizaciones, un grupo metileno ($-\text{CH}_2-$)_n que une el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4' en el que n es 1 o 2. Los LNA y la preparación de los mismos se describen en el documento WO 98/39352 y el documento WO 99/14226.

En algunas realizaciones, las modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-O- CH_3), 2'-aminopropoxi (2'-O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2'-alilo (2'- $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$), 2'-O-alilo (2'-O- $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$) y 2'-fluro (2'-F). La modificación en 2' puede estar en la posición arábica (arriba) o en la posición ribosa (abajo). En algunas realizaciones, una modificación 2'-arábica es 2'-F. También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, en particular la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en oligonucleótidos unidos en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcares, tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes representativas de los EE.UU. que muestran la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, las Patente de los EE.UU. N.º: 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.792.747 y 5.700.920.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de la nucleobase (con frecuencia denominada en la técnica simplemente "base"). Como se usa en el presente documento, las nucleobases "sin modificar" o "naturales" incluyen las bases púricas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de adenina y guanina de 6-metilo y otros alquilo, derivados de adenina y guanina de 2-propilo y otros alquilo, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil ($-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3$ o $-\text{CH}_2\text{-C}=\text{CH}$) uracilo y citosina y otros derivados de alquino de bases pirimidínicas, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquil, 8-hidroxil adeninas y guaninas y otras otra 8-sustituidas, 5-halo en particular 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uracilo y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Las nucleobases modificadas adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazin citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazin citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), sitios de fijación G, tales como una fenoxazin citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridindol citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base de purina o pirimidina está reemplazada por otros heterociclos, por ejemplo 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Otras nucleobases incluyen aquellas desveladas en la Patente de los EE.UU. N.º 3.687.808, aquellas desveladas en *THE CONCISE ENCYCLOPEDIA OF POLYMER SCIENCE AND ENGINEERING*, Kroschwitz, J.I., ed., John Wiley & Sons, 1990, págs. 858-859 y aquellas desveladas por Englisch *et al.*, *ANGEWANDTE CHEMIE*,

INTERNATIONAL EDITION, Wiley-VCH, Alemania, 1991, 30: 613. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la divulgación. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6-sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del híbrido de ácido nucleico a 0,6-1,2 °C. (Sanghvi *et al.* *ANTISENSE RESEARCH AND APPLICATIONS*, CRC Press, Boca Ratón, 1993, págs. 276-278) y son sustituciones de bases posibles, incluso más en particular cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietil azúcar. Las patentes representativas de los EE.UU. que muestran la preparación de nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a: la Patente de los EE.UU. N.º 3.687.808, así como las Patentes de los EE.UU. N.º: 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121, 5.596.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096; 5.681.941 y 5.750.692.

Otra modificación de los oligonucleótidos no codificantes es unir químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencien la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Los compuestos de la divulgación pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la divulgación incluyen intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesterol, lípidos, lípidos catiónicos, fosfolípidos, fosfolípidos catiónicos, biotina, ácido fólico, fenazina, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de la presente divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación del oligómero, potencian la resistencia del oligómero a la degradación, y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con ARN. Los grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de la presente divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o excreción del oligómero. Los restos conjugados incluyen, pero no se limitan a restos lipídicos tales como un resto de colesterol (Letsinger *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6553-6556), ácido cólico (Manoharan *et al.* (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett* 4: 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan *et al.* (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660: 306-309; Manoharan *et al.* (1993) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3: 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20: 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, restos dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras *et al.* (1991) *EMBO J.* 10: 1111-1118; Kabanov *et al.* (1990) *FEBS Lett* 259: 327-330; Svinarchuk *et al.* (1993) *Biochimie* 75: 49-54, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-o-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan *et al.* (1995) *Tetrahedron Lett* 36: 3651-3654; Shea *et al.* (1990) *Nucl Acids Res* 18: 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan *et al.* (1995) *Nucleosides & Nucleotides* 14: 969-973) o ácido acético adamantano (Manoharan *et al.* (1995) *Tetrahedron Lett.* 36: 3651-3654), un resto de palmitilo (Mishra *et al.* (1995) *Biochim Biophys Acta* 1264: 229-237) o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la divulgación también pueden conjugarse 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 benzotiadiazida, clortiazida, una diacepina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco con sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Se describen conjugados oligonucleótido-fármaco y su preparación en las Patentes de los EE.UU. N.º: 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717. 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241. 5.391.723; 5.416.203. 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928; 5.688.941 y 6.656.730.

No es necesario para todas las posiciones en un compuesto dado que estén modificadas uniformemente y, de hecho, más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente pueden incorporarse en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente divulgación también incluye compuestos no codificantes que son compuestos quiméricos. Compuestos no codificantes "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de la presente divulgación, son compuestos no codificantes, en particular oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta de al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen normalmente al menos una región en la que el oligonucleótido está modificado con el fin de conferir al oligonucleótido una mayor resistencia a la degradación por nucleasas, un aumento de la captación celular y/o un aumento de la afinidad de unión para el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir ARN:ADN o híbridos ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un híbrido de ARN:ADN. La activación de la RNasa H, por tanto, da como resultado la escisión del ARN diana, potenciando de este modo en gran medida la eficiencia de la inhibición por oligonucleótido de la expresión génica. En consecuencia, con frecuencia pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxi oligonucleótidos de fosforotioato que se hibridan con la misma región diana. Pueden formarse compuestos no codificantes quiméricos de la divulgación como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, miméticos de oligonucleósidos y/u oligonucleótidos como se han descrito anteriormente. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos no codificantes quiméricos incorporan por lo menos un azúcar modificado en 2' (por ejemplo, 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el

extremo 3' terminal para conferir resistencia a las nucleasas y una región con al menos 4 azúcares 2'-H contiguos para conferir actividad RNasa H. Dichos compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o gapmeros. En algunas realizaciones, los gapmeros tienen una región de azúcares modificados en 2' (por ejemplo, 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el extremo terminal 3' y en el extremo terminal 5' separados por al menos una región que tenga al menos 4 azúcares 2'-H contiguos y, en algunas realizaciones, incorporan enlaces de cadena principal fosforotioato. Las Patentes de los EE.UU. representativas que muestran la preparación de dichas estructuras híbridas incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de Los EE.UU. N.º: 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356 y 5.700.922.

Los compuestos no codificantes utilizados de acuerdo con la presente divulgación pueden fabricarse convenientemente y habitualmente a través de la técnica bien conocida de la síntesis en fase sólida. El equipo para dicha síntesis es vendido por diversos vendedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Puede emplearse, adicionalmente o como alternativa, cualquier otro medio para dicha síntesis conocida en la técnica. Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. Los compuestos de la divulgación también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, moléculas receptoras específicas, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las Patentes de los EE.UU. representativas que muestran la preparación de dichas formulaciones de ayuda en la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de los EE.UU. N.º: 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575 y 5.595.756.

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

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

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

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

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

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

enlace frente a marcadores cromosómicos conocidos y el cribado de hibridación con bibliotecas.

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

Cualquiera de los ácidos nucleicos es adecuado para su uso en la expresión de proteínas SMO mutantes y la identificación de dianas naturales o compañeros de unión para las proteínas smoothed mutantes expresadas (por ejemplo, una proteína smoothed que tiene una mutación W281C, I408V, A459V, S533N y/o W535L). Los ácidos nucleicos también pueden usarse para estudiar la bioactividad alisada mutante, para purificar el alisado mutante y sus compañeros de unión de diversas células y tejidos, y para identificar componentes adicionales de la vía de señalización de hedgehog.

II. Moléculas pequeñas

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

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

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

Estas moléculas pequeñas pueden identificarse mediante uno cualquiera o más de los ensayos de cribado analizados anteriormente y/o mediante cualquier otra técnica de cribado bien conocida por los expertos en la materia.

III. Proteínas

La divulgación proporciona proteínas SMO mutantes aisladas. La SMO humana de tipo silvestre se muestra en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, las proteínas SMO mutantes son parcial o totalmente resistentes al vismodegib. En algunas realizaciones, las proteínas SMO mutantes son parcial o totalmente resistentes a vismodegib en una célula que tiene una mutación adicional en un gen que codifica una proteína en la vía de señalización de hedgehog. En algunas realizaciones, la mutación adicional es cualquiera de las mutaciones parcheadas y/o SUFU que se describen en el presente documento.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una proteína SMO mutante aislada que comprende una secuencia de aminoácidos, en la que la secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido distinto del triptófano en la posición de aminoácido que corresponde a la posición 281 de la secuencia de aminoácidos de SMO de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la proteína SMO comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % a la SEQ ID NO: 1, a condición de que la secuencia de aminoácidos comprenda un aminoácido distinto del triptófano (W) en la posición del aminoácido que corresponde a la posición 281 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la proteína SMO comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % a la SEQ ID NO: 1, a

condición de que la proteína SMO comprenda una cisteína (C) en la posición del aminoácido que corresponde a la posición 281 de la SEQ ID NO: 1.

5 En algunas realizaciones, la SMO humana mutante se muestra en la SEQ ID NO: 2, en la que el aminoácido 281 se muestra como "Xaa" que, con respecto a la presente solicitud, representa cualquier aminoácido distinto del triptófano (W). En algunas realizaciones, la Xaa es cisteína (C).

10 En algunas realizaciones, cualquiera de las proteínas SMO mutantes carece de la metionina N-terminal correspondiente a la posición 1 de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-9.

15 La SMO mutante y los fragmentos de la misma pueden producirse en sistemas recombinantes como es bien conocido en la técnica usando los ácidos nucleicos de la SMO mutantes que se describen en el presente documento. Dichos ácidos nucleicos pueden incorporarse en vectores de expresión como es bien conocido en esa técnica y transfectarse en células hospedadoras, que pueden ser células procariotas o eucariotas dependiendo del uso propuesto de la proteína. Puede usarse la longitud completa o fragmentos de la SMO mutante (en la que los fragmentos contienen al menos un segundo dominio transmembrana de la SMO y la posición 281 de la SMO humana, un quinto dominio transmembrana de la SMO y la posición 408 de la SMO humana, un sexto dominio transmembrana de la SMO y la posición 459 de la SMO humana y/o el séptimo dominio transmembrana de la SMO y la posición 533 o 535 de la SMO humana) como inmunógenos para producir anticuerpos de la divulgación, o para purificar anticuerpos de la divulgación, por ejemplo.

25 En algunas realizaciones, la proteína SMO o fragmento de la misma tiene al menos una de las mismas actividades biológicas de un polipéptido SMO de tipo silvestre (por ejemplo, una proteína SMO que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, una proteína SMO mutante (por ejemplo, una proteína SMO que tiene una mutación en las posiciones de aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 459 de la SEQ ID NO: 1) ha aumentado la actividad biológica basal en comparación con la proteína SMO de tipo silvestre (por ejemplo, una proteína SMO que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1). Por las expresiones "actividad biológica", "bioactividad" o "funcional" se entiende la capacidad de la proteína SMO o fragmento de la misma para realizar al menos una de las funciones asociadas a las proteínas SMO de tipo silvestre, por ejemplo, transducir la vía de señalización de hedgehog y/o inducir la expresión de Gli1. En ciertas realizaciones, la proteína SMO se une a la proteína motora de cinesina Costal-2. Las expresiones "actividad biológica", "bioactividad" y "funcional" se usan indistintamente en el presente documento.

35 En algunas realizaciones, cualquiera de las proteínas SMO (por ejemplo, cualquiera de las proteínas SMO mutantes que se describen en el presente documento) es capaz de transducir la señalización de hedgehog. Por las expresiones "tiene la capacidad" o "es capaz de" se entiende que la proteína citada realizará la bioactividad declarada en condiciones adecuadas (por ejemplo, condiciones fisiológicas o condiciones de laboratorio convencionales). En ciertas realizaciones, el término "puede" puede usarse para describir esta capacidad (por ejemplo, "puede unirse" o "unirse" a una secuencia dada). Por ejemplo, si una proteína SMO (por ejemplo, cualquiera de las proteínas SMO mutantes que se describen en el presente documento) tiene la capacidad o es capaz de facilitar la señalización de hedgehog, la proteína SMO es capaz de facilitar la señalización de hedgehog en una célula en condiciones fisiológicas normales. Un experto habitual en la materia entenderá qué condiciones serían necesarias para someter a ensayo si un polipéptido tiene la capacidad o es capaz de realizar una bioactividad citada.

45 En algunas realizaciones, las proteínas SMO y SMO mutantes que se describen en el presente documento comprenden una mutación de ganancia de función de *smoothened*. En algunas realizaciones, la mutación de ganancia de función de *smoothened* da como resultado una proteína *smoothened* constitutivamente activa. En ciertas realizaciones, la mutación en *Smoothened* comprende una mutación en cualquiera de las posiciones específicas, tales como la posición que corresponde a una posición particular en la SEQ ID NO: 1, como se ha expuesto anteriormente con respecto al ensayo de selección. Véanse, por ejemplo, el documento WO 2011/028950 y el documento WO2012047968.

55 En algunas realizaciones, cualquiera de las proteínas SMO que se describen en el presente documento (por ejemplo, cualquiera de las proteínas SMO mutantes que se describen en el presente documento) se fusiona con otro agente. En algunas realizaciones, la proteína SMO se fusiona con otro polipéptido.

60 Cualquiera de las proteínas SMO mutantes que se describen en el presente documento son adecuadas para su uso en la identificación de dianas naturales o compañeros de unión para proteínas *smoothened* mutantes (por ejemplo, una proteína *smoothened* que tiene una mutación W281C). Las proteínas SMO mutantes también pueden usarse para estudiar la bioactividad de *smoothened* mutante, para purificar la *smoothened* mutante y sus compañeros de unión de diversas células y tejidos, y para identificar componentes adicionales de la vía de señalización de hedgehog.

IV. Anticuerpos

65 A. Anticuerpos anti-SMO mutante

En un aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos que se unen a SMO, en particular a SMO mutante. En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos que se desvelan en el presente documento se une específicamente a cualquiera de los polipéptidos SMO mutantes descritos en el presente documento. Por ejemplo, un polipéptido SMO mutante comprende un epítipo unido específicamente por los anticuerpos de la divulgación. En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen específicamente a la proteína SMO que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % a la SEQ ID NO: 1, a condición que haya una mutación en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 281 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, los anticuerpos no se unen específicamente a una proteína SMO que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o se unen preferentemente a una proteína SMO mutante en comparación con una proteína SMO que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, la unión es selectiva para una proteína SMO mutante). En algunas realizaciones, los anticuerpos no se unen a una proteína SMO que carece de una mutación en las posiciones de aminoácidos correspondientes a la posición 281 de la SEQ ID NO: 1.

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, scFv o (Fab')₂. En una realización, un anticuerpo anti-SMO mutante es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una realización, se purifica un anticuerpo anti-SMO. En ciertas realizaciones, una composición es una formulación farmacéutica para el tratamiento del cáncer.

1. Fragmentos de anticuerpo

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

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992); y Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente por células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv pueden expresarse todos en y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de anticuerpos en fagos analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse directamente fragmentos F(ab')₂ del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Se describen fragmentos Fab y F(ab')₂ con una semivida aumentada *in vivo* que comprenden restos de epítipo de unión a receptor de rescate en la Patente de los EE.UU. N.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para los expertos en la materia. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; las Patentes de los EE.UU. N.º 5.571.894; y 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; por tanto, son adecuados para la unión no específica reducida durante su uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión sFv para proporcionar una fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi terminal de un sFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, citado anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

2. Anticuerpos humanizados

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

La elección de los dominios variables humanos, tanto de cadena ligera como pesada, que se usan en la preparación de los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenia. De acuerdo con el llamado método "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se detecta frente a la biblioteca

completa de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que está más cerca de la del roedor se acepta entonces como la región marco conservada humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151: 2296; Chotia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901. Otro método usa una región marco conservada particular derivada de la secuencia consenso de anticuerpos completamente humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede usarse la misma región marco conservada para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151: 2623.

Además, generalmente se desea que los anticuerpos se humanicen conservando la alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están habitualmente disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del posible papel de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, pueden seleccionarse y combinarse restos de FR a partir de las secuencias receptoras y de importación de modo que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como la afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de la región hipervariable están implicados directamente y muy sustancialmente en la influencia sobre la unión al antígeno.

3. Anticuerpos humanos

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

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

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

4. Anticuerpos biespecíficos

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

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

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

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

De acuerdo con otro enfoque, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La superficie de contacto comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, se reemplaza una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácido de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensadoras de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales grandes de aminoácido con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales indeseados tales como homodímeros.

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

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

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo

biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse a células que sobre-expresaban el receptor HER2 y linfocitos T humanos normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

- 5 También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se fuerzan los dominios VH y VL de un fragmento para que se emparejen con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).
- 10
- 15
- 20 Se incluyen anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al. J. Immunol.* 147: 60 (1991).

5. Anticuerpos multivalentes

- 25 Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al cual se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetraivalentes), que pueden producirse fácilmente mediante la expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En ciertas realizaciones, el dominio de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino-terminales a la región Fc. En ciertas realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho sitios de unión a antígeno. En una realización de este tipo, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (por ejemplo, dos cadenas polipeptídicas), en el que la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc, en el que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender adicionalmente al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera incluidos en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden adicionalmente un dominio CL.
- 30
- 35
- 40
- 45

6. Anticuerpos de dominio único

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

- 55

7. Variantes de anticuerpo

- 60 En algunas realizaciones, se incluyen una o más modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos 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 aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede realizarse cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, a condición de que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en que se prepara la secuencia.
- 65

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

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

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

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

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

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

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

WO 1997/30087 (Patel *et al.*); el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

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

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

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

TABLA 1

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

Resto original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

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

- (1) apolares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

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

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

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

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

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

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

de una cisteína bisagra.

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

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

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

8. Derivados de anticuerpos

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

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

B. Ciertos métodos de preparación de anticuerpos

1. Ciertos métodos basados en el hibridoma

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales de la divulgación usando el método del hibridoma descrito primero por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975) y descrito adicionalmente, por ejemplo, en Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-

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

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

10 Para diversas otras técnicas de hibridoma, véase, por ejemplo, el documento US 2006/258841; el documento US 2006/183887 (anticuerpos completamente humanos), el documento US 2006/059575; el documento US 2005/287149; el documento US 2005/100546; el documento US 2005/026229; y las Patentes de los EE.UU. N.º 7.078.492 y 7.153.507. Un protocolo de ejemplo para la producción de anticuerpos monoclonales usando el método del hibridoma se describe como se indica a continuación. En una realización, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, es inmunizado para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Se crean anticuerpos en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de un polipéptido que comprende SMO mutante o un fragmento de la misma y un adyuvante, tal como monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT). Un polipéptido que comprende SMO mutante o un fragmento de la misma pueden prepararse usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como métodos recombinantes, algunos de los cuales se describen adicionalmente en el presente documento. El suero de los animales inmunizados se somete a ensayo para determinar anticuerpos anti-SMO mutante se administran opcionalmente inmunizaciones de refuerzo. Se aíslan linfocitos de los animales que producen anticuerpos anti-SMO mutante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

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

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

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

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

60 Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad, y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos convencionales. Véase, por ejemplo Goding, citado anteriormente. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero mediante procedimientos convencionales de purificación

de inmunoglobulina tales como, por ejemplo, cromatografía en proteína A-Sefarosa y en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. Un procedimiento para el aislamiento de proteínas a partir de células de hibridoma se describe en el documento US 2005/176122 y la Patente de los EE.UU. N.º 6.919.436. El método incluye el uso mínimo de sales, tales como sales liotrópicas, en el proceso de unión y, en algunas realizaciones, también el uso de pequeñas cantidades de disolventes orgánicos en el proceso de elución.

2. Ciertos métodos de exploración de bibliotecas

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

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

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

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

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

En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpo se obtienen de células inmunitarias recogidas de seres humanos o animales. Si se desea una biblioteca sesgada en favor de clones anti-SMO mutante, el sujeto se inmuniza con SMO para generar una respuesta de anticuerpos y se recuperan las células esplénicas y/o las células B circulantes u otros los linfocitos de sangre periférica (PBL) para la construcción de la biblioteca. En una realización, se obtiene una biblioteca de fragmentos génicos de anticuerpo humano sesgada en favor de clones anti-SMO mutante generando una respuesta de anticuerpos anti-SMO mutante en ratones transgénicos que llevan una serie funcional de genes de inmunoglobulina humana (y que carece de un sistema de producción de anticuerpos funcional endógeno) de modo que la inmunización con SMO da origen a células B que producen anticuerpos humanos

contra SMO. La generación de ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos se describe a continuación.

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

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

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

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

Pueden construirse repertorios de fragmentos de anticuerpo combinando repertorios génicos de VH y VL juntos de varios modos. Cada repertorio puede crearse en diferentes vectores y los vectores pueden recombinarse *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128: 119-126 (1993) o *in vivo* por infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). El enfoque de recombinación *in vivo* aprovecha la naturaleza de dos cadenas de los fragmentos Fab para superar el límite en el tamaño de la biblioteca impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Se clonan repertorios de VH y VL no tratados anteriormente por separado, uno en un fagómido y el otro en un vector fágico. Las dos bibliotecas después se combinan por infección con fago de las bacterias que contienen fagómido de modo que cada célula contenga una combinación diferente y el tamaño de la biblioteca esté limitado solamente por la cantidad de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de modo que los genes VH y VL se recombinen en un único replicón y se coempaqueten en viriones fágicos. Estas enormes bibliotecas proporcionan grandes cantidades de anticuerpos diversos de buena afinidad (Kd^{-1} de aproximadamente 10^{-8} M).

Como alternativa, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991) o ensamblarse juntos mediante PCR y después clonarse, por ejemplo, como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). El ensamblaje mediante PCR también puede usarse para unir ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para

formar repertorios de Fv de cadena sencilla (scFv). En otra técnica más, se usa "ensamblaje mediante PCR en célula" para combinar genes VH y VL dentro de linfocitos mediante PCR y después se clonan los repertorios de genes ligados como se describe en Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

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

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

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

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

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

45 Los clones anti-SMO mutante pueden seleccionarse basándose en la actividad. En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona anticuerpos anti-SMO mutante que se unen a células vivas que expresan de forma natural SMO mutante, tal como células tumorales resistente a GDC-0449. En una realización, la divulgación proporciona anticuerpos anti-SMO mutante que se unen a la misma región a la que se une el GDC-0449 en la SMO de tipo silvestre. Los clones Fv correspondientes a dichos anticuerpos anti-SMO mutante pueden seleccionarse por (1) aislamiento de clones anti-SMO mutante a partir de una biblioteca de fagos como se ha descrito anteriormente y opcionalmente amplificación de
50 la población aislada de clones fágicos por crecimiento de la población en un hospedador bacteriano adecuado; (2) selección de SMO mutante y una segunda proteína frente a los cuales se desea actividad de bloqueo y de no bloqueo,

respectivamente; (3) adsorción de los clones fágicos anti-SMO mutante en SMO mutante inmovilizado; (4) uso de un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconozca determinantes de unión a SMO mutante que solapan o están compartidos con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) elución de los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades deseadas de bloqueo/no bloqueo pueden enriquecerse adicionalmente repitiendo los procedimientos de selección que se describen en el presente documento una o más veces.

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

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

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

3. Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

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

a) Componente de secuencia señal

Un anticuerpo de la divulgación puede producirse de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína o el polipéptido maduros. La secuencia señal heteróloga seleccionada, en algunas realizaciones, es una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariontes que no reconocen y procesan una secuencia señal de anticuerpo nativo, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procarionte seleccionada, por ejemplo, entre el grupo de los líderes de la fosfatasa alcalina, la penicilinas, lpp o la enterotoxina II estable al calor. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal nativa puede sustituirse por, por ejemplo, el líder de la invertasa de levadura, el líder del factor α (incluyendo los líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de células de mamífero, las secuencias señal de mamíferos, así como líderes secretores víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simple, están disponibles.

b) Origen de replicación

Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células hospedadoras seleccionadas. En general, en vectores de clonación esta secuencia es una que permita al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico del hospedador, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras y varios orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, no se necesita el componente origen de replicación para vectores de expresión en mamíferos (el origen SV40 normalmente puede usarse solo porque contiene el promotor temprano).

c) Selección del componente génico

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

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

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

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

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

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

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

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

d) Componente promotor

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

codifica un anticuerpo.

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

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

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

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

30 Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírica de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Se desvela un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos usando el virus del papiloma bovino como un vector en la Patente de los EE.UU. N.º 4.419.446. Se desvela una modificación de este sistema en la Patente de los EE.UU. N.º
 35 4.601.978. Véase también, Reyes et al., *Nature* 297: 598-601 (1982) acerca de la expresión de ADNc de interferón β humano en células de ratón con el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, puede usarse la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

e) Componente elemento potenciador

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

f) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión utilizados en células hospedadora eucariotas (levadura, hongo, insecto, planta, animal, ser humano o células nucleadas de otros microorganismos multicelulares) normalmente también contendrán secuencias
 55 necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están habitualmente disponibles a partir de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región poliadenilación de la hormona bovina del crecimiento. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el
 60 mismo.

g) Selección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores del presente documento
 65 son las células procariotas, levaduras o células eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este fin incluyen las eubacterias, tales como los organismos gramnegativos o grampositivos, por

ejemplo, Enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P desvelado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* posible es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son adecuados. Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes.

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

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

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

También se obtienen células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo glicosilado a partir de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen las células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células hospedadoras de insectos permisivas de hospedadores tales como, *Spodoptera frugiperda* (oruga) *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Hay disponible públicamente diversas 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 pueden usarse como el virus del presente documento de acuerdo con la presente divulgación, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

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

Pueden usarse células de vertebrados como hospedadores y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento habitual. Son ejemplos de estirpes celulares hospedadoras de mamíferos útiles la estirpe CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la estirpe de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol* 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol Reprod* 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals NY Acad Sci* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una estirpe de hepatoma humano (Hep G2). Otras estirpes celulares hospedadoras de mamíferos útiles incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo las células DHFR- CHO (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); y estirpes celulares de mieloma tales como NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas

estirpes celulares hospedadoras de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), págs. 255-268.

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

10 h) Cultivo de células hospedadoras

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

i) Purificación de anticuerpo

30 Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como una primera etapa, los desechos particulados, células hospedadoras o fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico desde *E. coli*. En resumen, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los residuos celulares pueden eliminarse mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, generalmente primero se concentran los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión usando un filtro de concentración de proteína disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

La composición de anticuerpo preparada a partir de estas células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Puede usarse proteína A para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es con mucha frecuencia agarosa, pero hay disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como el vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benzeno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. También hay disponibles otras técnicas para la purificación de proteína tales como fraccionamiento en columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poliácido aspártico), cromatografía en SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio dependiendo del anticuerpo que se recupere.

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

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

C. Inmunoconjugados

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

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

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

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

El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de un radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

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

1. Maitansina y maitansinoides

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

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

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

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

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

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

65 Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y el maitansinoide usando diversos agentes bifuncionales de acoplamiento de proteína tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales

como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), di-isocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de flúor (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). En algunas realizaciones, los agentes de acoplamiento incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, *Biochem. J.* 173: 723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

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

2. Auristatinas y dolastatinas

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

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

Normalmente, los restos de fármaco basados en péptido puede prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "*The Peptides*", volumen 1, pág. 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los restos de fármaco auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos de los documentos: US 5635483; US 5780588; Pettit *et al* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111: 5463-5465; Pettit *et al* (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13: 243277; Pettit, G.R., *et al. Synthesis*, 1996, 719-725; y Pettit *et al* (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5: 859-863. Véase también Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21(7): 778-784; "*Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands*", documento de los EE.UU. N.º Ser. 10/983.340, presentado el 5 de noviembre de 2004, (que describe, por ejemplo, enlazadores y métodos para preparar compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados con enlazadores).

3. Caliqueamicina

En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas del ADN bicatenario en concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia caliqueamicina, véanse las Patentes de los EE.UU. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, US 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todo para American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, γ 11, α 21, α 31, N-acetil- γ 11, PSAG y θ 11 (Hinman *et al.*, *Cancer Research* 53: 3.336-3.342 (1993), Lode *et al.*, *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de los EE.UU. mencionadas anteriormente para American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que el anticuerpo puede conjugarse es QFA que es un antifolato. Tanto caliqueamicina como QFA tienen sitios de acción intracelulares y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por tanto, la captación celular de estos agentes a través de internalización mediada por anticuerpo potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

4. Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos incluyen BCNU, estreptozoicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de los EE.UU. 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (Patente de los EE.UU. 5.877.296).

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

La presente divulgación incluye adicionalmente 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).

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

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

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

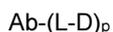
35 Los compuestos incluyen expresamente, pero no se limitan a, ADC preparado con reactivos de entrecruzamiento: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato)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

40

5. Preparación de conjugados anticuerpo-fármaco

En los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención, un anticuerpo (Ab) se conjuga con uno o más restos de fármaco (D), por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo ($p = 1$ a aproximadamente 20), a través de un enlazador (L). El ADC de la fórmula que se muestra a continuación puede prepararse mediante varias vías, empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Se describen en el presente documento métodos adicionales para preparar ADC.

45



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

65 En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender restos de aminoácido. Los componentes enlazadores de aminoácido de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos de ejemplo incluyen: valina-citrullina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos de ejemplo incluyen: glicina-valina-citrullina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los restos de aminoácido que comprenden un

componente enlazador de aminoácido incluyen los de origen natural, así como aminoácidos minoritarios y análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como citrulina. Pueden diseñarse componentes enlazadores de aminoácido y optimizarse en su selectividad por escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D o una plasmina proteasa.

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

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

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

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

En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en la pre-dirección a tumores en la que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de aclaramiento y después la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido). Hay disponible diversos radionucleótidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi,
30 ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re.

V. Métodos

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

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

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

65 En un aspecto, la divulgación proporciona un método de diagnóstico de un trastorno asociado a la expresión de la SMO mutante. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula de ensayo con un anticuerpo anti-SMO mutante; determinar el nivel de expresión (ya sea cuantitativa o cualitativamente) de SMO

mutante por la célula de ensayo mediante la detección de la unión del anticuerpo anti-SMO mutante a la SMO mutante; y comparar el nivel de expresión de la SMO mutante por la célula de ensayo con el nivel de expresión de la SMO mutante por una célula de control (por ejemplo, una célula normal del mismo origen tisular que la célula de ensayo o una célula que exprese SMO de tipo silvestre en niveles comparables a dicha célula normal), en el que un nivel más
 5 alto de expresión de la SMO mutante por la célula de ensayo en comparación con la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado a la expresión aumentada de SMO mutante. En ciertas realizaciones, la célula de ensayo se obtiene de un individuo sospechoso de tener un trastorno asociado a la expresión aumentada de SMO mutante. En ciertas realizaciones, el trastorno es un trastorno proliferativo celular, tal como un cáncer o un tumor. Se aprecia que, por ejemplo, en una muestra de tumor, puede haber heterogeneidad en la expresión de SMO. Por tanto,
 10 se parecía que en una muestra solo un subconjunto de células en la muestra puede expresar la SMO mutante, y dicha expresión es suficiente para, por ejemplo, estar asociada a la resistencia al fármaco. En consecuencia, la expresión de evaluación incluye la expresión de evaluación en una muestra y la detección de proteína SMO mutante en un subconjunto de células en una muestra.

15 Los trastornos de ejemplo que pueden diagnosticarse o en los que la resistencia al fármaco puede evaluarse usando un anticuerpo de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, el meduloblastoma, el cáncer de páncreas y el carcinoma de células basales.

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

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

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

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

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

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

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

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

En estos métodos, la detección de una SMO mutante como se describe en el presente documento indica la presencia de un trastorno asociado a la expresión aumentada de SMO mutante (es decir, resistencia al tratamiento con un inhibidor de Smo tal como GDC-0449). En ciertas realizaciones, la célula de ensayo se obtiene de un individuo sospechoso de tener un tumor resistente asociado a la expresión de SMO mutante. Como se ha detallado anteriormente, se aprecia que las mutaciones pueden estar en un subconjunto de células de una muestra, tal como un subconjunto de células de una muestra de tumor.

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

C. Métodos de detección de SMO mutante en ensayos celulares

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

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

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método de cribado de un inhibidor de la vía de hedgehog que es capaz de inhibir la señalización de hedgehog en una célula que expresa cualquiera de las proteínas SMO mutantes que se desvelan en el presente documento. En algunas realizaciones, el cribado es de agentes individuales o un número discreto de agentes. En algunas realizaciones, el cribado es de agrupamientos de agentes. En algunas realizaciones, el cribado es un cribado de alto rendimiento. En algunas realizaciones, el cribado es de una biblioteca o bibliotecas de compuestos (por ejemplo, bibliotecas de moléculas pequeñas, bibliotecas de oligonucleótidos no codificante o bibliotecas de anticuerpos o péptidos). En algunas realizaciones, cribado puede implicar un ensayo primario solo o un ensayo primario y uno o más ensayos secundarios. En algunas realizaciones, los agentes pueden evaluarse en un ensayo (por ejemplo, un ensayo de señalización de hedgehog (por ejemplo, mediante el uso de cualquiera de los ensayos de expresión de *Gli1* que se describen en el presente documento o que se conocen en la técnica por examinar la expresión de ácido nucleico o proteína Gli1 en respuesta a un agente), un ensayo de unión a la proteína SMO mutante (por ejemplo, mediante el uso de cualquiera de los ensayos de unión a SMO mutante que se describen en el presente documento), un ensayo de proliferación celular (por ejemplo, mediante el uso de cualquiera de los ensayos de proliferación celular que se describen en el presente documento o que se conocen en la técnica). El uso en ensayos de cribado es un uso de ejemplo para las proteínas SMO mutantes y los ácidos nucleicos de la divulgación (por ejemplo, puede usarse una proteína SMO mutante en un ensayo sin células o basado en células; puede proporcionarse un ácido nucleico SMO mutante en un vector y puede usarse para expresar una proteína SMO mutante en células hospedadoras o un organismo hospedador adecuado para un ensayo de cribado).

La divulgación proporciona un método de cribado de compuestos que se unen a SMO mutante. Sin quedar sujetos a ningún modo particular de operación, se espera que de la misma forma en que GDC-0449 se une a SMO de tipo silvestre y no se une a SMO mutante, un compuesto que actúa como un inhibidor de SMO mutante se uniría a SMO mutante. Por tanto, uno puede expresar la proteína SMO mutante o un fragmento de la misma, tal como un fragmento que comprende todo o una porción del dominio transmembrana 6 (TM6) y realizar ensayos de unión usando una biblioteca de compuestos por cualquier medio conocido en la técnica. También puede usarse una biblioteca más pequeña de compuestos representados por variaciones de GDC-0449 usando un enfoque de modelado basado en puntos de contacto potenciales de GDC-0449 y, después, modelando puntos de contacto similares para SMO mutante y variaciones de GDC-0449. Dichos programas y algoritmos de modelado pueden ser cualquiera que se conozca en la técnica. Pueden identificarse compuestos que se unen a SMO mutante y SMO de tipo silvestre que son inhibidores de SMO tanto de tipo silvestre como mutante. Como alternativa, pueden descubrirse compuestos que se unen a SMO mutante, pero que no se unen a SMO de tipo silvestre y, por tanto, son inhibidores solo para SMO mutante. En ciertas realizaciones, la unión y/o alguna otra lectura (por ejemplo, señalización de hedgehog) se evalúan y se comparan con la de SMO de tipo silvestre o un control adecuado (por ejemplo, un vector vacío).

En una realización, los compuestos que se han de cribar son compuestos de moléculas pequeñas tales como variantes de GDC0449. 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 a SMO de tipo silvestre. En una realización, el anticuerpo se une a una región en la porción carboxi-terminal de TM6 de SMO mutante e inhibe la actividad de SMO mutante.

Los compuestos pueden, como alternativa o adicionalmente, cribarse por su capacidad para inhibir la actividad de SMO mutante. En estas realizaciones, puede evaluarse la capacidad de estos compuestos para inhibir la señalización de hedgehog en células que expresan SMO mutante. Estos ensayos pueden realizarse en células que tienen una vía

de señalización de hedgehog intacta pero que expresan una SMO recombinante que lleva la mutación en lugar de o además de SMO de tipo silvestre. En estos ensayos, se determina la capacidad de la célula para tener una señalización activa de hedgehog cuando se incuban con hedgehog en presencia o ausencia del inhibidor candidato. Si la señalización de hedgehog se inhibe en presencia del compuesto candidato, dicho compuesto es un inhibidor de hedgehog. En algunas realizaciones, las células expresan SMO tanto de tipo silvestre como mutante y se incuban con GDC-0449 y un inhibidor candidato. En otras realizaciones, las células expresan solo SMO mutante y pueden incubarse con Hh y el inhibidor candidato solo (es decir, en ausencia de GDC-0449). El compuesto es un inhibidor de SMO mutante si la señalización de Hh se reduce o inhibe en dichas células.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método de identificación de un inhibidor de la vía de hedgehog, en el que el método comprende: poner en contacto una célula con una cantidad de un agente de ensayo, en el que la célula responde a la proteína hedgehog o tiene un aumento de la señalización y/o activación de hedgehog de la vía de señalización de hedgehog, y en el que la célula expresa cualquiera de las proteínas SMO mutantes que se describen en el presente documento, y b) determinar, en comparación con un control, si el agente de ensayo inhibe la señalización de hedgehog en la célula, en el que si el agente de ensayo inhibe la señalización de hedgehog en la célula con respecto al control, el agente de ensayo se identifica como un inhibidor de la vía de hedgehog. En algunas realizaciones, el control (o base para la comparación) es una célula que expresa una proteína SMO de tipo silvestre (por ejemplo, una proteína SMO que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, el control es una célula que expresa las mismas proteínas SMO mutantes que la célula en contacto con el agente de ensayo, en el que el control no se trata o se trata con un agente de control al que la proteína SMO mutante es parcial o completamente resistente. En algunas realizaciones, el agente de control es vismodegib, LY2940680, LDE225 y/o compuesto 5. En algunas realizaciones, el agente de ensayo se une a la proteína SMO mutante pero no a la proteína SMO de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el agente de ensayo se une tanto a la proteína SMO mutante como a la proteína SMO de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el agente de ensayo inhibe la señalización de hedgehog más eficazmente en una célula que expresa la proteína SMO mutante que en una proteína que expresa la proteína SMO de tipo silvestre.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método de identificación de un inhibidor de la vía de hedgehog, en el que el método comprende: poner en contacto una célula con una cantidad de un agente, en el que la célula responde a la proteína hedgehog o tiene un aumento en la señalización de hedgehog y/o activación de la vía de señalización de hedgehog, y en el que la célula expresa cualquiera de las proteínas SMO mutantes que se describen en el presente documento y b) determinar, en comparación con un control, si el agente inhibe el crecimiento y/o la proliferación de la célula, en el que si el agente inhibe el crecimiento y/o la proliferación de la célula con respecto al control, entonces el agente se identifica como un inhibidor de la vía de hedgehog. En algunas realizaciones, el control es una célula que expresa una proteína SMO de tipo silvestre (por ejemplo, una proteína SMO que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, el control es una célula que expresa las mismas proteínas SMO mutantes que la célula en contacto con el agente de ensayo, en el que el control no se trata o se trata con un agente de control al que la proteína SMO mutante es parcial o completamente resistente. En algunas realizaciones, el agente de control es vismodegib, LY2940680, LDE225 y/o compuesto 5. En algunas realizaciones, el agente de ensayo se une a la proteína SMO mutante pero no a la proteína SMO de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el agente de ensayo se une tanto a la proteína SMO mutante como a la proteína SMO de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el agente de ensayo es más eficaz para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de una célula que expresa la proteína SMO mutante que de una célula que expresa proteína SMO de tipo silvestre.

En algunas realizaciones, la célula utilizada en los métodos de cribado que se describen en el presente documento está en cultivo. En algunas realizaciones, el agente en contacto con las células en el cultivo es suficiente para inhibir, parcial o totalmente, la señalización de hedgehog en al menos el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 % de las células en un cultivo celular. En algunas realizaciones, el agente en contacto con las células en el cultivo es suficiente para reducir la tasa de proliferación de una célula y/o la tasa de supervivencia de al menos el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 % de las células en un cultivo celular, en el que las células expresan o sobreexpresan hedgehog o tienen señalización activa de hedgehog.

En otras realizaciones, la célula está en un animal. En algunas realizaciones, el animal es un mamífero u otro vertebrado. En algunas realizaciones, el animal es postnatal. En algunas realizaciones, el animal es pediátrico. En algunas realizaciones, el animal es adulto. Cuando se refiere a células in vitro, las células pueden ser de cualquier especie de vertebrado, tal como un mamífero, tal como un roedor, un hámster o un ser humano. In vitro o in vivo, una célula puede ser una célula cancerosa, tal como una célula cancerosa primaria, una célula cancerosa metastásica o una estirpe celular cancerosa. En algunas realizaciones, la célula es una célula de meduloblastoma. En algunas realizaciones, la célula es una célula de carcinoma de células basales. En algunas realizaciones, la célula es una célula de carcinoma de células basales nevoide. En algunas realizaciones, la célula es una célula del síndrome de Gorlin.

En algunas realizaciones, la célula comprende una o más mutaciones en un gen de la vía de señalización de hedgehog. En algunas realizaciones, la una o más mutaciones están parcheadas. En algunas realizaciones, la mutación parcheada es una mutación sin pérdida de función. En algunas realizaciones, la una o más mutaciones están

en smoothed. En algunas realizaciones, la mutación de smoothed es una mutación de ganancia de función smoothed. En algunas realizaciones, la mutación de smoothed de ganancia de función da como resultado una proteína smoothed constitutivamente activa. En algunas realizaciones, la una o más mutaciones están en *supresor de fusionado* y la célula tiene pérdida de función de supresor de fusionado (SuFu). En algunas realizaciones, la mutación de SuFu da como resultado una pérdida parcial de la función de la actividad de SuFu. En algunas realizaciones, la mutación de SuFu da como resultado una pérdida total de función en la actividad de SuFu. En algunas realizaciones, la mutación de SuFu confiere resistencia a vismodegib.

En algunas realizaciones, el agente sometido a ensayo en cualquiera de los métodos de cribado que se describen en el presente documento es una molécula pequeña. En otras realizaciones, el agente es un polipéptido. En otras realizaciones, el agente es un antagonista de ARNip.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de cribado que se describen en el presente documento, el ADN de SMO mutante se expresa exógenamente en una célula. En algunas realizaciones, el ADN de SMO mutante se expresa de manera estable en la célula. En algunas realizaciones, el ADN de SMO mutante se expresa de forma transitoria en la célula.

Los efectos inhibidores del crecimiento de los diversos inhibidores de la vía de hedgehog utilizables en la divulgación pueden evaluarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando células que expresan un polipéptido SMO mutante de forma endógena o después de la transfección con el gen de SMO mutante respectivo. Por ejemplo, pueden tratarse estirpes celulares tumorales apropiadas y células transfectadas con ADN que codifica SMO mutante con los inhibidores de la vía de hedgehog de la divulgación a diversas concentraciones durante unos pocos días (por ejemplo, 2-7 días) y pueden teñirse con cristal violeta, MTT o pueden analizarse por algún otro ensayo colorimétrico o a base de luciferasa (por ejemplo, CellTiterGlo). Otro método de medición de la proliferación sería mediante la comparación de la captación de 3H-timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de dichos inhibidores de la vía de hedgehog. Después del tratamiento, las células se recogen y la cantidad de radioactividad incorporada en el ADN se cuantifica en un contador de centelleo. Los controles positivos apropiados incluyen el tratamiento de una estirpe celular seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento o una molécula pequeña que se sabe que inhibe el crecimiento de esa estirpe celular. La inhibición del crecimiento de células tumorales in vivo puede determinarse de diversas maneras conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, la célula tumoral es una que tiene una o más mutaciones en un gen de señalización de la vía de hedgehog. En algunas realizaciones, dichos inhibidores de la vía de hedgehog inhibirán la proliferación celular de una célula tumoral que expresa hedgehog in vitro o in vivo en aproximadamente un 10-25 %, en aproximadamente un 25-100 %, en aproximadamente un 30-100 %, en aproximadamente un 50-100 % o en aproximadamente un 70-100 % en comparación con la célula tumoral sin tratar. La inhibición del crecimiento puede medirse a una concentración de inhibidor de la vía de hedgehog de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml, de aproximadamente 0,5 nM a 200 nM, aproximadamente 200 nM a 1 µM, de aproximadamente 1 µM a 5 µM o de aproximadamente 5 µM a 10 µM, en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al antagonista El antagonista inhibe el crecimiento in vivo si la administración de antagonista y/o agonista es de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da como resultado la reducción del tamaño del tumor o la reducción de la proliferación de células tumorales en aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo o antagonista de molécula pequeña, en algunas realizaciones, en aproximadamente 5 a 30 días.

En algunas realizaciones, para seleccionar los inhibidores de la vía de hedgehog que inducen la muerte celular, la pérdida de integridad de la membrana indicada, por ejemplo, mediante yoduro de propidio (PI), azul de tripano o captación de 7AAD, puede evaluarse con relación al control. Puede realizarse un ensayo de captación de PI en ausencia de células del complemento y efectoras inmunitarias. En algunas realizaciones, las células tumorales que expresan la proteína SMO mutante se incuban con medio solo o medio que contiene el inhibidor de la vía de hedgehog apropiado. Las células se incuban durante un período de 3 días. Después de cada tratamiento, las células se lavan y se dividen en alícuotas en tubos de 12 x 75 tapados con tamiz de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la retirada de grupos de células. Después, los tubos reciben PI (10 µg/ml). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACSCAN® y el software FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson) o cualquier otro dispositivo utilizado por el trabajador calificado para el análisis. Después, pueden seleccionarse los inhibidores de la vía de hedgehog que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular como se determina mediante la captación de PI.

En algunas realizaciones, para detectar inhibidores de la vía de hedgehog que se unen a un epítipo en un polipéptido SMO mutante, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado habitual tal como el que se describe en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Este ensayo puede usarse para determinar si un anticuerpo de ensayo, un polipéptido, un oligopéptido u otra molécula orgánica se une al mismo sitio o epítipo que un inhibidor conocido de la vía de hedgehog. Como alternativa o adicionalmente, el cartografiado de epítopos puede realizarse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de la proteína SMO mutante puede mutagenizarse, por ejemplo, mediante rastreo con alanina o haciendo quimeras con proteínas GPCR inmunológicamente distintas, para identificar los restos de contacto. El antígeno mutante se somete a ensayo inicialmente para determinar su unión con el anticuerpo policlonal para garantizar un plegamiento adecuado. En un método diferente, pueden usarse péptidos correspondientes a diferentes regiones de una proteína SMO mutante en

ensayos de competición con los anticuerpos de ensayo o con un anticuerpo de ensayo y un anticuerpo con un epítipo caracterizado o conocido.

5 En algunas realizaciones, la proteína SMO mutante o el agente inhibidor de la vía de hedgehog candidato se inmoviliza en una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microlitros, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente generalmente se consigue recubriendo la superficie sólida con una solución de la proteína SMO mutante o agente de señalización de hedgehog candidato y secando. Como alternativa, puede usarse un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para la porción diana de SMO mutante que se ha de inmovilizar para anclarlo a una superficie sólida. El ensayo puede realizarse añadiendo el componente no inmovilizado, que puede estar marcado por un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando se completa la reacción, los componentes que no reaccionan pueden retirarse, por ejemplo, mediante lavado y se detectan complejos anclados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado lleva un marcador detectable, la detección de la etiqueta inmovilizada en la superficie indica que ocurrió la formación de complejos. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no lleva un marcador, la complejación puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

20 Si el inhibidor de la vía de hedgehog candidato interactúa con un polipéptido de señalización de hedgehog identificado en el presente documento, pero no se une directamente, su interacción con ese polipéptido puede analizarse mediante métodos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen enfoques tradicionales, tales como, por ejemplo, reticulación, coimmunoprecipitación y copurificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden controlarse usando un sistema genético basado en levadura descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, *Nature* (Londres). 340: 245-246 (1989); Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9578-9582 (1991)) como se desvela por Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como la levadura GAL4, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión al ADN, el otro que funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de levadura descrito en las publicaciones anteriores (generalmente denominado "sistema de dos híbridos") aprovecha esta propiedad y emplea dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana se fusiona con el dominio de unión al ADN de GAL4, y otra, en la que las proteínas activadoras candidatas se fusionan con el dominio de activación. La expresión de un gen indicador GAL 1-LacZ bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad GAL4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos interactivos se detectan con un sustrato cromógeno para la β -galactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica de dos híbridos está disponible en el mercado de Clontech. Este sistema también puede extenderse para cartografiar los dominios de proteínas implicados en interacciones de proteínas específicas, así como para identificar los restos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

40 Los ensayos pueden realizarse en diversos formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímicos, inmunoensayos y ensayos celulares, que están bien caracterizados en la técnica.

45 Los agentes que interfieren con la interacción del polipéptido de señalización de hedgehog y otros componentes intra o extracelulares (por ejemplo, Costal-2) pueden someterse a ensayo por medios bien conocidos por el experto. En algunas realizaciones, se prepara una mezcla de reacción que contiene el polipéptido SMO mutante y un componente intra o extracelular en condiciones y durante un tiempo que permite la interacción y la unión de los dos productos. En algunas realizaciones, para someter a ensayo la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se ejecuta en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, puede añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción, para servir como control positivo. La unión (formación de complejos) entre el compuesto de ensayo y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se controla como se ha descrito anteriormente en el presente documento. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el agente de ensayo, indica que el agente de ensayo interfiere con la interacción del compuesto de ensayo y su compañero de reacción.

55 La divulgación contempla métodos para identificar inhibidores de la vía de hedgehog usando cualquiera o una combinación de las etapas de ensayo anteriores. En otras palabras, pueden combinarse diversos ensayos de detección para identificar antagonistas que tienen, por ejemplo, una actividad particular o para confirmar que un agente que antagoniza la SMO mutante en un ensayo también inhibe la señalización de hedgehog en un ensayo independiente. Para cualquier ensayo o método de identificación, los resultados pueden compararse con uno o más controles apropiados, incluyendo controles positivos y/o negativos.

60 Para cualquiera de los métodos de ensayo anteriores para el cribado y/o la identificación de inhibidores de la vía de hedgehog, los agentes pueden seleccionarse individualmente o en agrupaciones. Los agentes pueden seleccionarse entre una biblioteca de agentes o un conjunto de agentes candidatos. Los agentes adecuados que pueden cribarse incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, péptidos, oligonucleótidos no codificantes, ARNi y moléculas pequeñas (por ejemplo, un inhibidor de bromodominio).

65

En algunas realizaciones, la célula utilizada en cualquiera de los métodos de cribado que se describen en el presente documento comprende una o más mutaciones en un gen que dan como resultado una activación o un aumento de la señalización de hedgehog. En algunas realizaciones, la una o más mutaciones están en el gen parcheado que da como resultado una pérdida de función parcheada. En algunas realizaciones, la una o más mutaciones en el gen parcheado dan como resultado un gen mutante que codifica una proteína parcheada que tiene una o más de las siguientes mutaciones: S616G, fs251, E380*, Q853*, W926*, P1387S, sp2667, Q501H, fs1017, fs108 o A1380V.

En algunas realizaciones, la una o más mutaciones en un gen que dan como resultado una activación o aumento de la señalización de hedgehog están en *smoothened* y la célula tiene una mutación de *smoothened*. En algunas realizaciones, la mutación de *smoothened* es una mutación de *smoothened* de ganancia de función. En algunas realizaciones, la mutación de *smoothened* de ganancia de función da como resultado una proteína *smoothened* constitutivamente activa. Véanse, por ejemplo, el documento WO 2011/028950 y el documento WO2012047968.

En algunas realizaciones, la una o más mutaciones están en un gen *hedgehog* y dan como resultado la sobreexpresión de una proteína *hedgehog*. En algunas realizaciones, la proteína *hedgehog* sobreexpresada es una proteína *hedgehog* Sonic. En algunas realizaciones, la proteína *hedgehog* sobreexpresada es proteína *hedgehog* Indian. En algunas realizaciones, la proteína *hedgehog* sobreexpresada es una proteína *hedgehog* Desert.

En algunas realizaciones, la una o más mutaciones están en *supresor de fusionado* y la célula tiene pérdida de función de supresor de fusionado (SuFu o SUFU). En algunas realizaciones, esto da como resultado una pérdida de función en la actividad de SuFu. En algunas realizaciones, la mutación de SuFu se encuentra en un meduloblastoma, meningioma, carcinoma adenoide quístico, carcinoma de células basales y células de cáncer de rhabdomiocarcinoma. En algunas realizaciones, la mutación de SuFu es cualquiera de las mutaciones que se describen en Brugier *et al.*, 2012, *JCO*, 30 (17): 2087-2093. En algunas realizaciones, la mutación de SuFu es cualquiera de las mutaciones que se describen en las Tablas 1 o 2 o cualquiera de las mutaciones que se describen en Brugier *et al.*, 2012, *JCO*, 30 (17): 2087-2093.

Tabla 1: Mutaciones SUFU en estirpes germinales

Edad en el diagnóstico de MB	Subtipo histológico	Síntomas asociados	Herencia de la mutación	Mutación
4 años	Desmoplásico	Retraso en el desarrollo, Abombamiento frontal hipertelorismo	ND	Pérdida de genes contiguos en 10q IVS1-1A→T
NA	Desmoplásico	Ninguno	ND	143insA
NA	Desmoplásico	Meningioma en campo de radiación	ND	
8 meses	MBNE	Macrocrania, cráteres palmoplantares	Heredada	c.1022 + 1G>A
<1 mes	MBNE	Ninguno	Heredada	c.72delC
<3 meses	MBNE	Ninguno	Heredada	c.72delC
<1 meses	MBNE	Ninguno	Heredada	c.72insC
6-12 meses	Desmoplásico/nodular	Ninguno	Heredada	c.72insC
<6 meses	Desmoplásico/nodular	Ninguno	Heredada	c.72insC
12-24 meses	MB NEOM	Ninguno	Heredada	c.72insC
22 meses	Desmoplásico/nodular	Ninguno	ND	c.846insC
23 meses	Desmoplásico/nodular	Ninguno	ND	c.1022 + 1G>A

Abreviaturas: MB, meduloblastoma; MBNE, MB con modularidad extendida; ND, no disponible; NEOM, no especificado de otro modo.

Tabla 2. Mutaciones SUFU patógenas en estirpes germinales

Exón/ Intrón	Tipo de mutación	Cambio de nucleótidos (en la SEQ ID NO: 44)	Consecuencia (en la SEQ ID NO: 43)	Análisis del tumor
Intrón 1	Corte y empalme →desplazamiento del marco de lectura	c.182 + 3A>T	p.Thr55fs	No disponible
Exón 2	Desplazamiento del marco de lectura	c.294_295dupCT	p.Tyr99fs	No disponible
Intrón 2	Corte y empalme →desplazamiento del marco de lectura	c.318-10delT	p.Phe107fs	Pérdida del alelo de tipo silvestre

Exón 3	Duplicación grande	c.318-?_454 + ?dup	p.Glu106-?_Glu152 + ?dup	VD (c.1022 + 5G>A)
Exón 3	Sentido erróneo	c.422T>G	p.Met141Arg	No disponible
Exón 9	Sin sentido	c.1123C>T	p.Gln375X	No disponible
Exón 9	Desplazamiento del marco de lectura	c.1149_1150dupCT	p.Cys384fs	Pérdida del alelo de tipo silvestre
Intrón 10	Corte y empalme →desplazamiento del marco de lectura	c.1297-1G>C	p.?	No disponible

Abreviatura: VD, variante desconocida.

En algunas realizaciones, la mutación de SuFu comprende una mutación en una posición que corresponde a cualquiera de las siguientes posiciones de aminoácidos en la SEQ ID NO: 8: posición 15, 184, 123, 295, 187. En ciertas realizaciones, la mutación de SuFu comprende cualquiera o más de: P15L, Q184X, R123C, L295fs o P187L, donde la mutación está en esa posición o en la posición que corresponde a la posición indicada en la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, la mutación de SuFu es cualquiera de las mutaciones correspondientes a c.1022 + 1G>A (TVS8-1G>T), c.72delC, c.72insC, 143insA, c.846insC o IVS1-1A>T de la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, la mutación de SuFu es cualquiera de las mutaciones que se describen en Taylor *et al.* (2002) *Nat Genet* 31: 306-310 (por ejemplo, IVS8-1G>T (=c.1022 + 1G>A), 1129del, P15L y dos de Ng (todos + PDH)); Slade *et al.* (2011) *Fam Cancer* 10: 337-342, 2011 (por ejemplo, c.1022 + 1G>A; c.848insC); Pastorino *et al.* (2009) *Am J Med Genet A* 149A: 1539-1543 (por ejemplo, c.1022 + 1G>A); Ng *et al.* (2005) *Am J Med Genet A* 134: 399-403 (por ejemplo, 143insA; IVS1-1A>T); Kijima *et al.* (2012) *Fam Cancer* 11: 565-70 (por ejemplo, C.550C>T (Q184X)); Aavikko *et al.* (2012) *Am J Hum Genet* 91: 520-526 (por ejemplo, c.367C>T (R123C)); Stephens *et al.* (2013) *J Clin Invest* 123: 2965-2968 (por ejemplo, x881_882insG (L295fs)); o Reifengerger *et al.* (2005) *Brit J Dermatology* 152: 43-51 (por ejemplo, c560C>T (P187L)).

En algunas realizaciones, la célula es una célula humana y tiene una duplicación del cromosoma 10 y/o una supresión de una porción de 10q, en la que dicha porción contiene *SUFU* y *PTEN*. En algunas realizaciones, la célula comprende una mutación de *SUFU* Fs1017.

En algunas realizaciones, la célula utilizada en cualquiera de los métodos de cribado que se describen en el presente documento es una célula en la que la vía de señalización de hedgehog está activa. En algunas realizaciones, la célula es una célula en la que la vía de señalización de hedgehog está constitutivamente activa. En algunas realizaciones, la célula es una célula que ha sido estimulada con proteína hedgehog o agonista de hedgehog. En algunas realizaciones, la actividad de la vía de hedgehog en una célula se determina al controlar los niveles de Gli1 o la actividad en un ensayo de indicador de Gli-luciferasa.

En algunas realizaciones, la célula utilizada en cualquiera de los métodos de cribado que se describen en el presente documento es una célula en cultivo. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método que comprende poner en contacto un cultivo que comprende una pluralidad de células. En algunas realizaciones, la célula está en un vertebrado. En algunas realizaciones, la célula está en un mamífero y el contacto con la célula comprende administrar el inhibidor de señalización de hedgehog al mamífero. En algunas realizaciones, el mamífero es un sujeto humano. En algunas realizaciones, la célula es una célula cancerosa y/o el mamífero es un mamífero diagnosticado con cáncer. En algunas realizaciones, la célula cancerosa es una célula cancerosa seleccionada entre el grupo que consiste en: una célula de cáncer de colon, pulmón, próstata, piel, sangre, hígado, riñón, mama, vejiga, hueso, cerebro, meduloblastoma, sarcoma, carcinoma de células basales, cáncer gástrico, de ovario, esofágico, pancreático o testicular. En algunas realizaciones, la célula cancerosa es una célula de meduloblastoma, una célula de carcinoma de células basales o una célula de carcinoma de células basales nevoide (células del síndrome de Gorlin).

En ciertas realizaciones, una vez que un agente se identifica como un inhibidor de la vía de hedgehog, el agente puede formularse y después evaluarse en un ensayo en animales o células. Por ejemplo, el agente puede someterse a ensayo en un modelo de cáncer en animal o en células para evaluar la eficacia como agente anticanceroso.

VI. Métodos de tratamiento

En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a métodos para modular un estado de diferenciación, la supervivencia y/o la proliferación de una célula que expresa una proteína smoothened que tiene cualquiera de las mutaciones de smoothened que se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, la célula está en un sujeto (por ejemplo, un paciente humano). En algunas realizaciones, la célula está en cultivo y el método comprende un método in vitro. En ciertas realizaciones, la célula es una célula cancerosa. En ciertas realizaciones, la célula se caracteriza por una proliferación celular no deseada o anormal. En algunas realizaciones, la célula comprende o se ha predeterminado para expresar una proteína smoothened que comprende cualquiera de las mutaciones de smoothened que se describen en el presente documento. En ciertas realizaciones, la célula se ha predeterminado para expresar un polipéptido smoothened que comprende una mutación, en relación con la SMO humana de tipo silvestre, en un aminoácido que corresponde a 281 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la célula expresa

un polipéptido *smoothened* que comprende sustitución en un aminoácido correspondiente a W281C, de la SEQ ID NO: 1.

5 En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para reducir la señalización de hedgehog en una célula, en la que la célula expresa una proteína *smoothened* que tiene cualquiera de las mutaciones de *smoothened* que se describen en el presente documento, en el que la célula responde a la proteína hedgehog o comprende una o más mutaciones en un gen de la vía de señalización de hedgehog (por ejemplo, un componente de la vía de señalización de hedgehog), en el que una o más mutaciones dan como resultado un aumento de la señalización de hedgehog y/o la activación de la vía de señalización de hedgehog en ausencia de ligando, en el que el método
10 comprende la etapa de poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un agente, en el que el agente es un inhibidor de la vía de hedgehog. En algunas realizaciones, el agente es un compuesto que se une selectivamente e inhibe la proteína *smoothened* mutante. En algunas realizaciones, el agente inhibe un componente de la vía de señalización de hedgehog que actúa corriente abajo de la proteína *smoothened* mutante en la célula. En otras realizaciones, el agente es un inhibidor de bromodominio.

15 En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para inhibir el crecimiento, la proliferación o la supervivencia no deseados de una célula, en el que la célula expresa una proteína *smoothened* que tiene cualquiera de las mutaciones de *smoothened* que se describen en el presente documento, en el que la célula responde a la proteína hedgehog o comprende una o más mutaciones en un gen de la vía de señalización de hedgehog, en el que la una o más mutaciones dan como resultado un aumento de la señalización de hedgehog y/o la activación de la vía de señalización de hedgehog en ausencia de ligando, en el que el método comprende la etapa de poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un agente, en el que el agente es un inhibidor de la vía de hedgehog. En algunas realizaciones, el agente es un agente que se une selectivamente e inhibe la proteína *smoothened* mutante. En algunas realizaciones, el agente inhibe un componente de la vía de señalización de hedgehog que actúa corriente abajo de la proteína *smoothened* mutante en la célula. En algunas realizaciones, el agente es un inhibidor de bromodominio.

20 En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para inhibir el crecimiento, la proliferación o la supervivencia de una célula tumoral, en el que la célula tumoral expresa una proteína *smoothened* que tiene cualquiera de las mutaciones de *smoothened* que se describen en el presente documento, en el que la célula responde a la proteína hedgehog o comprende una o más mutaciones en un gen de la vía de señalización de hedgehog, en el que una o más mutaciones dan como resultado un aumento de la señalización de hedgehog y/o la activación de la vía de señalización de hedgehog en ausencia de ligando, en el que el método comprende la etapa de poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un agente, en el que el agente es un inhibidor de la vía de hedgehog. En algunas realizaciones, el agente es un agente que se une selectivamente e inhibe la proteína *smoothened* mutante. En algunas realizaciones, el agente inhibe un componente de la vía de señalización de hedgehog que actúa corriente abajo de la proteína *smoothened* mutante en la célula. En otras realizaciones, el agente es un inhibidor de bromodominio. En algunas realizaciones, el método comprende administrar un agente a un paciente que lo necesite.

30 En algunas realizaciones, la célula tratada con cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento comprende una o más mutaciones en un gen que dan como resultado una activación o un aumento de la señalización de hedgehog. En algunas realizaciones, la una o más mutaciones están en el gen parcheado que da como resultado una pérdida de función parcheada. En algunas realizaciones, la una o más mutaciones en el gen parcheado dan como resultado un gen mutante que codifica una proteína parcheada que tiene una o más de las siguientes mutaciones: S616G, fs251, E380*, Q853*, W926*, P1387S, sp2667, Q501H, fs1017, fs108 o A1380V.

45 En algunas realizaciones, la una o más mutaciones en un gen que dan como resultado una activación o aumento de la señalización de hedgehog están en *smoothened* y la célula tiene una mutación de *smoothened*. En algunas realizaciones, la mutación de *smoothened* es una mutación de *smoothened* de ganancia de función. En algunas realizaciones, la mutación de *smoothened* de ganancia de función da como resultado una proteína *smoothened* constitutivamente activa. Véase, por ejemplo, el documento WO 2011/028950 y el documento WO2012047968.

50 En algunas realizaciones, la una o más mutaciones están en un gen *hedgehog* y dan como resultado la sobreexpresión de una proteína hedgehog. En algunas realizaciones, la proteína hedgehog sobreexpresada es una proteína hedgehog Sonic. En algunas realizaciones, la proteína hedgehog sobreexpresada es proteína hedgehog Indian. En algunas realizaciones, la proteína hedgehog sobreexpresada es una proteína hedgehog Desert.

55 En algunas realizaciones, la una o más mutaciones están en *supresor de fusionado* y la célula tiene pérdida de función de supresor de fusionado (SuFu o SUFU). En algunas realizaciones, esto da como resultado una pérdida de función en la actividad de SuFu. En algunas realizaciones, la mutación de SuFu se encuentra en un meduloblastoma, meningioma, carcinoma adenoide quístico, carcinoma de células basales y células de cáncer de rhabdomiocarcinoma. En algunas realizaciones, la mutación de SuFu es cualquiera de las mutaciones que se describen en Brugieres *et al.*, 2012, *JCO*, 30 (17): 2087-2093.

65 En algunas realizaciones, la mutación de SuFu es cualquiera de las mutaciones que se describen en las Tablas 1 o 2 o cualquiera de las mutaciones que se describen en Brugieres *et al.*, 2012, *JCO*, 30 (17): 2087-2093.

Tabla 1: Mutaciones SUFU en estirpes germinales

Edad en el diagnóstico de MB	Subtipo histológico	Síntomas asociados	Herencia de la mutación	Mutación
4 años	Desmoplásico	Retraso en el desarrollo, Abombamiento frontal hipertelorismo	ND	Pérdida de genes contiguos en 10q IVS1-1A→T
NA	Desmoplásico	Ninguno	ND	143insA
NA	Desmoplásico	Meningioma en campo de radiación	ND	
8 meses	MBNE	Macrocrania, cráteres palmoplantares	Heredada	c.1022 + 1G>A
<1 mes	MBNE	Ninguno	Heredada	c.72delC
<3 meses	MBNE	Ninguno	Heredada	c.72delC
<1 meses	MBNE	Ninguno	Heredada	c.72insC
6-12 meses	Desmoplásico/nodular	Ninguno	Heredada	c.72insC
<6 meses	Desmoplásico/nodular	Ninguno	Heredada	c.72insC
12-24 meses	MB NEOM	Ninguno	Heredada	c.72insC
22 meses	Desmoplásico/nodular	Ninguno	ND	c.846insC
23 meses	Desmoplásico/nodular	Ninguno	ND	c.1022 + 1G>A

Abreviaturas: MB, meduloblastoma; MBNE, MB con modularidad extendida; ND, no disponible; NEOM, no especificado de otro modo.

Tabla 2. Mutaciones SUFU patógenas en estirpes germinales

Exón/ Intrón	Tipo de mutación	Cambio de nucleótidos (en la SEQ ID NO: 44)	Consecuencia (en la SEQ ID NO: 43)	Análisis del tumor
Intrón 1	Corte y empalme →desplazamiento del marco de lectura	c.182 + 3A>T	p.Thr55fs	No disponible
Exón 2	Desplazamiento del marco de lectura	c.294_295dupCT	p.Tyr99fs	No disponible
Intrón 2	Corte y empalme →desplazamiento del marco de lectura	c.318-10delT	p.Phe107fs	Pérdida del alelo de tipo silvestre
Exón 3	Duplicación grande	c.318-?_454 + ?dup	p.Glu106-?_Glu152 + ?dup	VD (c.1022 + 5G>A)
Exón 3	Sentido erróneo	c.422T>G	p.Met141Arg	No disponible
Exón 9	Sin sentido	c.1123C>T	p.Gln375X	No disponible
Exón 9	Desplazamiento del marco de lectura	c.1149_1150dupCT	p.Cys384fs	Pérdida del alelo de tipo silvestre
Intrón 10	Corte y empalme →desplazamiento del marco de lectura	c.1297-1G>C	p.?	No disponible

Abreviatura: VD, variante desconocida.

- 5 En algunas realizaciones, la mutación de SuFu comprende una mutación en una posición que corresponde a cualquiera de las siguientes posiciones de aminoácidos en la SEQ ID NO: 8: posición 15, 184, 123, 295, 187. En ciertas realizaciones, la mutación de SuFu comprende cualquiera o más de: P15L, Q184X, R123C, L295fs o P187L, donde la mutación está en esa posición o en la posición que corresponde a la posición indicada en la SEQ ID NO: 8.
- 10 En algunas realizaciones, la mutación de SuFU es cualquiera de las mutaciones correspondientes a c.1022 + 1G>A (TVS8-1G>T), c.72delC, c.72insC, 143insA, c.846insC o IVS1-1A>T de la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, la mutación de SuFu es cualquiera de las mutaciones que se describen en Taylor *et al.* (2002) *Nat Genet* 31: 306-310 (por ejemplo, IVS8-1G>T (=c.1022 + 1G>A), 1129del, P15L y dos de Ng (todos + PDH)); Slade *et al.* (2011) *Fam Cancer* 10: 337-342, 2011 (por ejemplo, c.1022 + 1G>A; c.848insC); Pastorino *et al.* (2009) *Am J Med Genet A* 149A: 1539-1543 (por ejemplo, c.1022 + 1G>A); Ng *et al.* (2005) *Am J Med Genet A* 134: 399-403 (por ejemplo, 143insA;
- 15 IVS1-1A>T); Kijima *et al.* (2012) *Fam Cancer* 11: 565-70 (por ejemplo, C.550C>T (Q184X)); Aavikko *et al.* (2012) *Am J Hum Genet* 91: 520-526 (por ejemplo, c.367C>T (R123C)); Stephens *et al.* (2013) *J Clin Invest* 123: 2965-2968 (por ejemplo, x881_882insG (L295fs)); o Reifenberger *et al.* (2005) *Brit J Dermatology* 152: 43-51 (por ejemplo, c560C>T (P187L)).
- 20 En algunas realizaciones, la célula es una célula humana y tiene una duplicación del cromosoma 10 y/o una supresión

de una porción de 10q, en la que dicha porción contiene *SUFU* y *PTEN*. En algunas realizaciones, la célula comprende una mutación de *SUFU* Fs1017.

En algunas realizaciones, la célula tratada con cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento es una célula en la que la vía de señalización de hedgehog está activa. En algunas realizaciones, la célula es una célula en la que la vía de señalización de hedgehog está constitutivamente activa. En algunas realizaciones, la célula es una célula que ha sido estimulada con proteína hedgehog o agonista de hedgehog. En algunas realizaciones, la actividad de la vía de hedgehog en una célula se determina al controlar los niveles de Gli1 o la actividad en un ensayo de indicador de Gli-luciferasa.

En algunas realizaciones, la célula tratada con cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento es una célula en cultivo. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método que comprende poner en contacto un cultivo que comprende una pluralidad de células. En algunas realizaciones, la célula está en un vertebrado. En algunas realizaciones, la célula está en un mamífero y el contacto con la célula comprende administrar el inhibidor de señalización de hedgehog al mamífero. En algunas realizaciones, el mamífero es un sujeto humano. En algunas realizaciones, la célula es una célula cancerosa y/o el mamífero es un mamífero diagnosticado con cáncer. En algunas realizaciones, la célula cancerosa es una célula cancerosa seleccionada entre el grupo que consiste en: una célula de cáncer de colon, pulmón, próstata, piel, sangre, hígado, riñón, mama, vejiga, hueso, cerebro, meduloblastoma, sarcoma, carcinoma de células basales, cáncer gástrico, de ovario, esofágico, pancreático o testicular. En algunas realizaciones, la célula cancerosa es una célula de meduloblastoma, una célula de carcinoma de células basales o una célula de carcinoma de células basales nevoide (células del síndrome de Gorlin).

En algunas realizaciones, el inhibidor de la vía de hedgehog utilizado en cualquiera de los métodos que se desvelan en el presente documento es una molécula polinucleotídica que inhibe la expresión de cualquiera de las proteínas smoothed mutantes que se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, la molécula de polinucleótido es un oligonucleótido no codificante que hibrida específicamente con un ácido nucleico que codifica cualquiera de las proteínas smoothed mutantes que se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, la molécula no codificante no se hibrida con un ácido nucleico que codifica una proteína smoothed de tipo silvestre (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, el inhibidor de la vía de hedgehog es un antagonista de ARNi que se refiere al transcrito de ARNm que codifica cualquiera de los polipéptidos smoothed mutantes que se describen en algunas realizaciones, el antagonista de ARNi es un ARNip. En algunas realizaciones, el ARNip tiene una longitud de 19-23 nucleótidos. En algunas realizaciones, el ARNip es bicatenario e incluye un saliente o salientes cortos en uno o ambos extremos. En algunas realizaciones, el ARNip se refiere a un transcrito de ARNm que codifica cualquiera de los polipéptidos smoothed mutantes que se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, el ARNi o ARNip no se refiere a un transcrito de ARNm que codifica una proteína smoothed de tipo silvestre (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, el ARNi comprende un ARNhp.

En algunas realizaciones, el inhibidor de la vía de hedgehog utilizado en cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento es una pequeña molécula que se une específicamente a cualquiera de los polipéptidos smoothed mutantes que se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, la molécula pequeña se une a un polipéptido que actúa corriente debajo de smoothed en la vía de señalización de hedgehog. En algunas realizaciones, la molécula pequeña se une a un polipéptido en una vía distinta de la vía de señalización de hedgehog. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es un inhibidor de bromodominio. En algunas realizaciones, el inhibidor de bromodominio es un inhibidor de BRD4. En algunas realizaciones, el inhibidor de bromodominio es cualquiera de los inhibidores de bromodominio descritos en Ciceri *et al.*, 2014, *Nature Chemical Biology*, 10: 305-312; Muller *et al.*, 2014, *Med Chem Commun*, 5: 288-296; Garnier *et al.*, 2014, 24 (2): 185-199. En algunas realizaciones, el inhibidor de bromodominio es I-BET762, JQ1, JQ2, BRD4 por BI-2536 y TG-101348.

En algunas realizaciones, el inhibidor de la vía de hedgehog utilizado en cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento es un anticuerpo que se une específicamente a cualquiera de los polipéptidos smoothed mutantes que se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a un polipéptido que actúa corriente debajo de smoothed en la vía de señalización de hedgehog. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En algunas realizaciones, la célula en contacto con un agente de acuerdo con cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento también se pone en contacto con un inhibidor adicional de la vía de señalización de hedgehog (por ejemplo, un HPI). En algunas realizaciones, el inhibidor adicional de la vía de señalización de hedgehog es un alcaloide esteroideo de tipo veratrum. En algunas realizaciones, el alcaloide esteroideo de tipo veratrum es ciclopamina o KAAD-ciclopamina o cualquier derivado funcional de la misma (por ejemplo, IPI269609 o IPI-926). En algunas realizaciones, el alcaloide esteroideo de tipo veratrum es jervina o cualquier derivado funcional de la misma. En algunas realizaciones, el inhibidor adicional es vismodegib, sonidegib, BMS-833923, PF-04449913 o LY2940680 o cualquier derivado funcional de los mismos. En algunas realizaciones, el inhibidor adicional es un inhibidor de smoothed químicamente no relacionado con los alcaloides de veratrum o vismodegib, incluyendo, entre otros: sonidegib, BMS-833923, PF04449913, LY2940680, Erivedge, BMS-833923 (XL319), LDE225 (Erismodeg)

04449913, NVP-LDE225, NVPLEQ506, TAK-441, XL-319, LY-2940680, SEN450, Itraconazol, MRT-10, MRT-83 o PF-04449913.). En algunas realizaciones, el inhibidor adicional es cualquiera de los compuestos descritos en Amakye, *et al.*, *Nature Medicine*, 19 (11): 1410-1422. En algunas realizaciones, el inhibidor adicional de la vía de señalización de hedgehog es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo que se une, tal como se une específicamente, a las proteínas hedgehog. En algunas realizaciones, el inhibidor adicional de la vía de señalización de hedgehog es un antagonista de ARNi.

Los sujetos que necesitan tratamiento o diagnóstico incluyen aquellos que ya tienen una señalización de hedgehog aberrante, así como aquellos propensos a tener, o aquellos en los que debe prevenirse, la señalización de hedgehog aberrante. Por ejemplo, un sujeto o mamífero "tratado" satisfactoriamente para una señalización de hedgehog aberrante si, de acuerdo con el método de la presente divulgación, después de recibir un inhibidor de la vía de hedgehog, el paciente muestra una reducción observable y/o medible en presencia o ausencia de uno o más de los siguientes: reducción en el número de células tumorales o ausencia de dichas células; reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentización en cierta medida y, en algunas realizaciones, detención) de la infiltración de células tumorales en órganos periféricos, incluyendo la propagación del cáncer en tejidos blandos y huesos; inhibición (es decir, ralentización en cierta medida y, en algunas realizaciones, detención) de la metástasis tumoral; inhibición, en cierta medida, del crecimiento tumoral; y/o alivio en cierta medida, de uno o más de los síntomas asociados al cáncer específico; reducción de la morbilidad y la mortalidad y mejora de la calidad de vida. En la medida en que dichos inhibidores de la vía de hedgehog puedan prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, pueden ser citostáticos y/o citotóxicos. El paciente también puede sentir la reducción de estos signos o síntomas. Adicionalmente, la exposición satisfactoria al inhibidor de la vía de hedgehog (en particular en los casos en los que no puede medirse la respuesta del tumor) puede controlarse mediante la expresión de Gli1 ya sea en biopsias de perforación de la piel o folículos pilosos (como se hizo para el vismodegib).

En ciertas realizaciones, el sujeto tratado con cualquiera de los inhibidores de la vía de hedgehog que se desvelan en el presente documento expresa una proteína smoothed mutante que es resistente a vismodegib. En algunas realizaciones, el sujeto expresa una proteína smoothed que comprende cualquiera de las mutaciones de smoothed que se describen en el presente documento. En ciertas realizaciones, el sujeto expresa un polipéptido smoothed que comprende una mutación en un aminoácido que corresponde a 281 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el sujeto expresa un polipéptido smoothed que comprende una mutación en un aminoácido correspondiente a W281C de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, antes de ser tratado con cualquiera de los métodos de tratamiento que se describen en el presente documento, se ha determinado que el sujeto expresa una proteína smoothed que comprende cualquiera de las mutaciones de smoothed que se describen en el presente documento. En ciertas realizaciones, antes de ser tratado con cualquiera de los métodos de tratamiento que se describen en el presente documento, se ha determinado que el sujeto expresa un polipéptido smoothed que comprende una mutación en un aminoácido que corresponde a 281 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, antes de ser tratado con cualquiera de los métodos de tratamiento que se describen en el presente documento, se ha determinado que el sujeto expresa un polipéptido smoothed que comprende una mutación en un aminoácido correspondiente a W281C de la SEQ ID NO: 1.

Los parámetros anteriores para evaluar el tratamiento satisfactorio y la mejora en la enfermedad son fácilmente medibles por procedimientos habituales familiares para un médico. Para la terapia del cáncer, la eficacia puede medirse, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (THP) y/o determinando la tasa de respuesta (TR). La metástasis puede determinarse mediante ensayos de estadificación y ensayos para determinar el nivel de calcio y otras enzimas para determinar el grado de metástasis. También pueden hacerse tomografías computarizadas para detectar la propagación a regiones fuera del tumor o el cáncer. La divulgación que se describe en el presente documento con respecto al proceso de pronóstico, diagnóstico y/o tratamiento implica la determinación y evaluación de, por ejemplo, la expresión de Gli1.

"Mamífero" para los fines del tratamiento, alivio de los síntomas o diagnóstico de una enfermedad (por ejemplo, cáncer) se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja y animales de zoológico, de deporte o mascotas, tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, hurones, etc. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano. En algunas realizaciones, el mamífero es postnatal. En algunas realizaciones, el mamífero es pediátrico. En algunas realizaciones, el mamífero es un adulto.

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

En ciertas realizaciones, se usa un inhibidor de la vía de hedgehog en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre cualquiera de los cánceres que se describen en el presente documento o un cáncer en el que una o más células de un tumor comprenden una mutación en un componente de la vía de hedgehog, tal como cualquiera de las mutaciones que se describen en el presente documento. En general, debe apreciarse y se señala específicamente en el presente documento que los tumores comprenden células que pueden tener un nivel de heterogeneidad. En consecuencia, no todas las células de un tumor comprenden necesariamente una mutación perjudicial particular. En consecuencia, la divulgación contempla métodos en los que un cáncer o tumor que se está tratando comprende células que tienen una mutación en un componente de la vía de hedgehog, tal como cualquiera de las mutaciones que se describen en el

presente documento, incluso si dicha mutación no está presente en todas las células del tumor.

Se contempla adicionalmente que el uso de inhibidores de la vía de hedgehog puede dirigirse específicamente a trastornos en los que el tejido afectado y/o las células presentan una activación elevada de la vía de hedgehog. La expresión de los genes Gli activados por la vía de señalización de hedgehog, incluyendo Gli1 y Gli2, se correlaciona más uniformemente con la señalización de hedgehog en una amplia gama de tejidos y trastornos, mientras que Gli3 algo menos. Los genes *Gli* codifican factores de transcripción que activan la expresión de muchos genes necesarios para obtener todos los efectos de la señalización de hedgehog. Sin embargo, los factores de transcripción de Gli3 también pueden actuar como un represor de los genes efectores de hedgehog y, por tanto, la expresión de Gli3 puede provocar un efecto de disminución de la vía de señalización de hedgehog. Que Gli3 actúe como un activador o represor transcripcional depende de los acontecimientos postraduccionales y, por tanto, se espera que los métodos para detectar la forma activadora (en comparación con la forma represora) de la proteína Gli3 (tales como la transferencia Western) también sean una medida confiable de la activación de la vía de hedgehog. El gen Gli1 se expresa fuertemente en una amplia diversidad de cánceres, hiperplasias y pulmones inmaduros y sirve como marcador para la activación relativa de la vía de hedgehog. Además, los tejidos tales como el pulmón inmaduro, que tienen una alta expresión del gen Gli, se ven fuertemente afectados por los inhibidores de hedgehog. En consecuencia, se contempla que la detección de la expresión del gen Gli pueda usarse como una poderosa herramienta predictiva para identificar tejidos y trastornos que se beneficiarán particularmente del tratamiento con un antagonista de hedgehog. En algunas realizaciones, los niveles de expresión de Gli1 se detectan, ya sea por detección directa de la transcripción o por detección de niveles de proteína o actividad. Pueden detectarse transcripciones usando cualquiera de una amplia gama de técnicas que dependen principalmente de la hibridación o sondas para las transcripciones de Gli1 o para los ADNc sintetizados a partir de las mismas. Las técnicas bien conocidas incluyen la transferencia Northern, la PCR con transcriptasa inversa y el análisis de micromatrices de los niveles de transcripción. Los métodos para detectar los niveles de proteína Gli incluyen la transferencia Western, la inmunoprecipitación, la electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D SDS-PAGE - en algunas realizaciones comparada con un patrón en el que se ha determinado la posición de las proteínas Gli) y la espectroscopia de masas. La espectroscopia de masas puede combinarse con una serie de etapas de purificación para permitir la identificación de alto rendimiento de muchos niveles de proteínas diferentes en una muestra particular. La espectroscopia de masas y la 2D SDS-PAGE también pueden usarse para identificar modificaciones postraduccionales de proteínas, incluyendo acontecimientos proteolíticos, ubiquitinación, fosforilación, modificación de lípidos, etc. La actividad de Gli también puede evaluarse mediante el análisis de la unión al ADN del sustrato o la activación transcripcional in vitro de promotores de la diana. El ensayo de desplazamiento de gel, los ensayos de huella de ADN y los ensayos de entrecruzamiento ADN-proteína son todos los métodos que pueden usarse para evaluar la presencia de una proteína capaz de unirse a los sitios de unión de GU en el ADN. *J Mol. Med* 77 (6): 459-68 (1999); *Cell* 100 (4): 423-34 (2000); *Development* 127 (19): 4923-4301 (2000).

Debido a que Gli1 se expresa de manera ubicua durante la activación de hedgehog, cualquier grado de sobreexpresión de Gli1 debería ser útil para determinar que un inhibidor de la vía de hedgehog será un agente terapéutico eficaz. En algunas realizaciones, Gli1 debe expresarse a un nivel al menos dos veces más alto que en una célula/tejido/sujeto de control normal. En algunas realizaciones, la expresión de Gli1 es cuatro, seis, ocho o diez veces más alta que en una célula/tejido/sujeto normal.

En ciertas realizaciones, se miden los niveles de transcripción de Gli1 y los tejidos enfermos o con trastornos que muestran niveles de Gli1 anormalmente altos se tratan con un inhibidor de la vía de hedgehog. En otras realizaciones, se sabe que la afección que se está tratando tiene una correlación significativa con la activación aberrante de la vía de hedgehog, incluso aunque no se realice una medición de los niveles de expresión de Gli1 en el tejido que se está tratando. El tejido pulmonar prematuro, los cánceres de pulmón (por ejemplo, adenocarcinomas, adenocarcinoma broncoalveolar, carcinomas microcíticos), los cánceres de mama (por ejemplo, carcinomas ductales inferiores, carcinomas lobulares inferiores, carcinoma tubular), los cánceres de próstata (por ejemplo, adenocarcinomas) y las hiperplasias benignas de próstata muestran niveles de expresión de Gli1 muy elevados en ciertos casos. En consecuencia, los niveles de expresión de Gli1 son un potente dispositivo de diagnóstico para determinar cuál de estos tejidos debe tratarse con un inhibidor de la vía de Hedgehog. Además, existe evidencia correlativa sustancial de que los cánceres de las células uroteliales (por ejemplo, cáncer de vejiga, otros cánceres urogenitales) también tendrán niveles elevados de gli-1 en ciertos casos. Por ejemplo, se sabe que la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 9q22 es común en los cánceres de vejiga. El gen *Ptch1* se encuentra en esta posición y la pérdida de función de *Ptch1* es probablemente una causa parcial de hiperproliferación, como en muchos otros tipos de cáncer. En consecuencia, dichos cánceres también mostrarían una alta expresión de Gli1 y serían particularmente susceptibles de tratamiento con un antagonista de hedgehog.

En ciertas realizaciones, cualquiera de los inhibidores de la vía de hedgehog que se describen en el presente documento se usan para tratar a un sujeto que tiene un tumor que tiene una mutación *ptch-1* y/o *ptch-2*, por ejemplo, una mutación de pérdida de función *patched-1* o *patched-2*. La expresión de *ptch-1* y *ptch-2* también se activa por la vía de señalización de hedgehog, pero no normalmente en la misma medida que los genes *gli* y, como resultado, son inferiores a los genes *gli* como marcadores de la activación de la vía de hedgehog. En ciertos tejidos, solo se expresa uno de *ptch-1* o *ptch-2*, aunque la vía de hedgehog sea altamente activa. Por ejemplo, en el desarrollo testicular, el hedgehog Desert desempeña un papel importante y se activa la vía de hedgehog, pero solo se expresa *ptc-2*. En

consecuencia, estos genes pueden ser individualmente no confiables como marcadores para la activación de la vía de hedgehog, aunque se contempla la medición simultánea de ambos genes como un indicador más útil para los tejidos que se han de tratar con un antagonista de hedgehog.

5 A la luz de la amplia implicación de la señalización de hedgehog en la formación de las disposiciones espaciales ordenadas de tejidos diferenciados en vertebrados, los inhibidores de la vía de hedgehog de la presente divulgación podrían usarse en un proceso para generar y/o mantener una matriz de tejidos de vertebrados diferentes tanto in vitro como in vivo. El inhibidor de la vía de Hedgehog puede ser, según corresponda, cualquiera de las preparaciones descritas anteriormente.

10 En algunas realizaciones, los inhibidores de la vía de hedgehog pueden usarse como parte de una pauta de tratamiento para el meduloblastoma maligno y otros tumores neuroectodérmicos malignos primarios del SNC. El meduloblastoma, un tumor cerebral primario, es el tumor cerebral más común en niños. Un meduloblastoma es un tumor neuroectodérmico primitivo (TNEP) que surge en la fosa posterior. Representan aproximadamente el 25 % de todos los tumores cerebrales pediátricos. Histológicamente, son tumores de células redondas pequeñas dispuestas habitualmente en una roseta verdadera, pero pueden mostrar cierta diferenciación en astrocitos, células ependimarias o neuronas. Los TNEP pueden surgir en otras áreas del cerebro, incluyendo la glándula pineal (pineoblastoma) y el cerebro. Los que surgen en la región supratentorial generalmente tienen un pronóstico peor.

15 20 Se sabe que los meduloblastomas/TNEP reaparecen en cualquier lugar del SNC después de la resección y pueden incluso metastatizarse al hueso. Por tanto, la evaluación del tratamiento previo debe incluir un examen de la médula espinal para excluir la posibilidad de "metástasis caídas". La IRM potenciada con gadolinio ha reemplazado en gran medida a la mielografía para este fin y la citología del LCR se obtiene después de la operación como un procedimiento habitual.

25 En algunas realizaciones, los inhibidores de la vía de hedgehog se usan como parte de un programa de tratamiento para ependimomas. Los ependimomas representan aproximadamente el 10 % de los tumores cerebrales pediátricos en niños. En general, son tumores que surgen del revestimiento ependimario de los ventrículos y forman rosetas, canales y rosetas perivasculares de forma microscópica. En la serie CHOP de 51 niños diagnosticados con ependimomas, 3/4 fueron histológicamente benignos, aproximadamente 2/3 surgieron de la región del 4º ventrículo y un tercio se presentó en la región supratentorial. La edad de presentación es máxima entre el nacimiento y los 4 años. La mediana de la edad es de aproximadamente 5 años. Debido a que muchos niños con esta enfermedad son bebés, con frecuencia requieren terapia multimodal.

30 35 En algunas realizaciones, los inhibidores de la vía de hedgehog de la presente divulgación, basados en la implicación de la señalización de hedgehog en diversos tumores o en la expresión de hedgehog o sus receptores en dichos tejidos durante el desarrollo, pueden usarse para inhibir el crecimiento de un tumor que tenga una actividad de hedgehog desregulada. Dichos tumores incluyen, pero no se limitan a: tumores relacionados con el síndrome de Gorlin (por ejemplo, meduloblastoma, meningioma, etc.), tumores asociados a una mutación ptch (por ejemplo, hemangioma, rhabdomyosarcoma, etc.), tumores resultantes de la amplificación de Gli1 (por ejemplo, glioblastoma, sarcoma, etc.), tumores resultantes de la disfunción de Smo (por ejemplo, carcinoma de células basales, etc.), tumores relacionados con TRC8, un homólogo de ptc (por ejemplo, carcinoma renal, carcinoma de tiroides, etc.), tumores relacionados con Ext-1 (por ejemplo, cáncer de huesos, etc.), tumores inducidos por Sft/x (por ejemplo, cáncer de pulmón, condrosarcomas, etc.), tumores que sobreexpresan una proteína hedgehog y otros tumores (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer urogenital (por ejemplo, de riñón, vejiga, uréter, próstata, etc.), cáncer suprarrenal, cáncer gastrointestinal (por ejemplo, de estómago, intestino, etc.))

40 45 50 55 60 En algunas realizaciones, los inhibidores de la vía de hedgehog de la presente divulgación también pueden usarse para tratar varias formas de cáncer. Estos cánceres incluyen, pero no se limitan a: cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón (incluyendo microcítico y no microcítico), cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de endometrio u otro cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer de pene, cáncer de vagina, cáncer de uretra, cáncer de vesícula biliar, cáncer de esófago o cáncer de páncreas. Los tipos de cáncer adicionales incluyen cáncer de músculo esquelético o liso, cáncer de estómago, cáncer del intestino delgado, cáncer de la glándula salival, cáncer anal, cáncer de recto, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer de hipófisis y cáncer de nasofaringe. Formas de ejemplo de cáncer adicionales que pueden tratarse con los antagonistas de hedgehog de la presente divulgación incluyen cánceres que comprenden células que expresan hedgehog. Otras formas de ejemplo de cáncer adicionales que pueden tratarse con los antagonistas de hedgehog de la presente divulgación incluyen cánceres que comprenden células que expresan Gli. En una realización, el cáncer no se caracteriza por una mutación en patched-1. En algunas realizaciones, el cáncer se caracteriza por una mutación de smoothened y/o SuFu.

65 En ciertas realizaciones, los inhibidores de la vía de hedgehog pueden usarse para tratar a un sujeto que tiene carcinoma de células basales. En realizaciones particulares, el carcinoma de células basales es un carcinoma de células basales nevoide. En realizaciones particulares, el sujeto tiene el síndrome de Gorlin.

Los anteriores son meramente ejemplos de usos in vitro e in vivo para los inhibidores de la vía de hedgehog de la

divulgación. Los inhibidores de la vía de Hedgehog también son adecuados para su uso en la identificación de dianas naturales o compañeros de unión para proteínas smoothed mutantes (por ejemplo, una proteína smoothed que tiene una mutación W281C, 1408V, A459V, S533N y/o W535L), para estudiar la bioactividad de la smoothed mutante, para purificar la smoothed mutante y sus compañeros de unión de diversas células y tejidos y para identificar componentes adicionales de la vía de señalización de hedgehog.

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

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

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

Dichas terapias de combinación mencionadas anteriormente abarcan la administración combinada (cuando se incluyen dos o más agentes terapéuticos en las mismas formulaciones o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la divulgación puede ocurrir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico y/o adyuvante adicional. Los anticuerpos de la divulgación también pueden usarse en combinación con radioterapia.

En una realización, un anticuerpo de la divulgación se usa en un método para unir SMO mutante en un individuo que padece un trastorno asociado al aumento de la expresión y/o actividad de SMO mutante, comprendiendo el método administrar al individuo el anticuerpo de manera que la SMO mutante en el individuo esté unida. En una realización, la SMO mutante es SMO mutante humana y el individuo es un ser humano.

Un anticuerpo de la divulgación (y cualquier agente terapéutico o adyuvante adicional) puede administrarse por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, subcutánea, 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 mediante infusión por pulsos, en particular con dosis decrecientes del anticuerpo. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

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

La expresión intracelular de un intracuerpo puede efectuarse mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica el anticuerpo deseado o la porción de unión a antígeno del mismo (que carece de la secuencia líder de tipo silvestre y las señales secretoras normalmente asociadas al gen que codifica ese anticuerpo o fragmento de unión a antígeno) en una célula diana. Uno o más ácidos nucleicos que codifican todo o una porción de un anticuerpo de la divulgación pueden administrarse 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. Puede usarse cualquier método convencional de introducción de ácidos nucleicos en una célula, incluyendo, pero sin limitación, microinyección, inyección balística, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, liposomas y transfección con

vectores retrovéricos, adenovéricos, víricos adenoasociados y vacunales que llevan el ácido nucleico de interés.

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

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

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

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

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

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

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

Los métodos basados en receptores y canales de transporte de un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, entre otros, el uso de bloqueadores de glucocorticoides para aumentar la permeabilidad de la barrera

hematoencefálica (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 2002/0065259, 2003/0162695 y 2005/0124533); la activación de los canales de potasio (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 2005/0089473), la inhibición de transportadores de fármacos ABC (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 2003/0073713); el recubrimiento de los anticuerpos con una transferrina y la modulación de la actividad de uno o más receptores de transferrina (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 2003/0129186) y la cationización de los anticuerpos (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.004.697).

Los anticuerpos de la divulgación se formularían, dosificarían y administrarían de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores que se han de considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de entrega del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. No es necesario, pero el anticuerpo se formula opcionalmente con uno o más agentes que se usan actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan en general en las mismas dosificaciones y con las vías de administración que se describen en el presente documento o con aproximadamente del 1 al 99 % de las dosis que se describen en el presente documento o en cualquier dosificación y mediante cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente como apropiada.

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

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

VII. Formulaciones farmacéuticas

En algunas realizaciones, cualquiera de los inhibidores de la vía de hedgehog que se describen en el presente documento o los inhibidores de la vía de hedgehog de acuerdo con la divulgación pueden formularse en una composición farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas de los inhibidores de la vía de hedgehog utilizadas de acuerdo con la presente divulgación pueden prepararse para el almacenamiento mezclando el agente o agentes que tienen el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington: The Science of Practice of Pharmacy*, 20ª edición, Gennaro, A. et al., Ed., Colegio de Farmacia y Ciencia de Filadelfia (2000)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son atóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; tonificadores tales como trehalosa y cloruro de sodio; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensioactivo tal como polisorbato; contraiones formadores de sal, tales como el sodio; complejos metálicos (por

ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG).

5 En algunas realizaciones, cualquiera de las formulaciones de inhibidores de la vía de hedgehog de acuerdo con la presente divulgación y/o que se describen en el presente documento también pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, en algunas realizaciones, aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Debe reconocerse que, en ciertas realizaciones, un inhibidor de la vía de hedgehog y un segundo agente activo se formulan juntos (por ejemplo, una formulación o composición contiene ambos agentes). En otras realizaciones, los dos (o más) agentes activos se formulan por separado, de manera que las formulaciones separadas puedan comercializarse, venderse, almacenarse y usarse juntas o por separado. Cuando se formulan por separado, la divulgación contempla que puedan administrarse en el mismo momento o en momentos diferentes y, en ciertas realizaciones, que puedan combinarse y administrarse simultáneamente.

15 Por ejemplo, además del agente o agentes terapéuticos anteriores, puede ser deseable incluir en la formulación, un anticuerpo adicional, por ejemplo, un segundo agente terapéutico o un anticuerpo contra alguna otra diana (por ejemplo, un factor de crecimiento que afecte al crecimiento de un tumor). En algunas realizaciones, puede ser deseable incluir en la formulación un inhibidor de hedgehog (por ejemplo, robotcinina). Como alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender adicionalmente un agente quimioterápico, agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal y/o cardioprotector. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto. En algunas realizaciones, el compuesto activo adicional es un alcaloide esteroideo. En algunas realizaciones, el alcaloide esteroideo es ciclopamina o KAADciclopamina o jervina o cualquier derivado funcional de las mismas (por ejemplo, IPI-269609 o IPI-926). En algunas realizaciones, el compuesto activo adicional es vismodegib, sonidegib, BMS-833923, PF-04449913 o LY2940680 o cualquier derivado de los mismos. En algunas realizaciones, el compuesto activo adicional es cualquiera de los compuestos desvelados en Amakye, *et al.*, *Nature Medicine*, 19 (11): 1410-1422. En algunas realizaciones, el compuesto activo adicional es otro inhibidor de smoothed químicamente no relacionado con los alcaloides de veratrum o vismodegib, incluyendo pero no limitado a: Erivedge, BMS-833923 (XL319), LDE225 (Erismodegib), PF-04449913, NVP-LDE225, TAK-441, XL-319, LY-2940680, SEN450, Itraconazol, MRT-10, MRT-83 o PF-04449913). Como se ha señalado anteriormente, la divulgación contempla formulaciones en las que se formule un segundo agente activo junto con un inhibidor de la vía de hedgehog (por ejemplo, como una formulación única que comprenda dos agentes activos), así como realizaciones en las que los dos agentes activos estén presentes en dos formulaciones o composiciones separadas.

35 En algunas realizaciones, cualquiera de los inhibidores de la vía de hedgehog de la divulgación, tales como los que se describen en el presente documento, también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de entrega de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, citado anteriormente.

45 En algunas realizaciones, cualquiera de los inhibidores de la vía de hedgehog de la divulgación se formulan en preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de los EE.UU. N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D (-)-3-hidroxibutírico.

55 La cantidad de las composiciones de la divulgación para su uso en los métodos de la presente divulgación puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales y puede variar dependiendo de la indicación o uso particular. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo in vitro o en modelos animales.

60 En ciertas realizaciones, las composiciones de la divulgación, incluyendo las preparaciones farmacéuticas, son apirógenas. En otras palabras, en ciertas realizaciones, las composiciones están sustancialmente libres de pirógenos. En una realización, las formulaciones de la divulgación son formulaciones libres de pirógenos que están sustancialmente libres de endotoxinas y/o sustancias pirogénicas relacionadas. Las endotoxinas incluyen toxinas que están confinadas dentro de un microorganismo y se liberan solo cuando los microorganismos se descomponen o mueren. Las sustancias pirogénas también incluyen sustancias termoestables inductoras de fiebre (glucoproteínas) de la membrana externa de las bacterias y otros microorganismos. Ambas sustancias pueden provocar fiebre, hipotensión y choque si se administran a seres humanos. Debido a los posibles efectos nocivos, incluso las cantidades

bajas de endotoxinas deben retirarse de las soluciones de fármacos farmacéuticas administradas por vía intravenosa. La Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU. ("FDA", por sus siglas en inglés) ha establecido un límite superior de 5 unidades de endotoxinas (UE) por dosis por kilogramo de peso corporal en un solo período de una hora para aplicaciones de fármacos por vía intravenosa (*The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum* 26 (1): 223 (2000)). Cuando las proteínas terapéuticas se administran en dosis relativamente grandes y/o durante un período prolongado de tiempo (por ejemplo, durante toda la vida del paciente), incluso pequeñas cantidades de endotoxinas dañinas y peligrosas podrían ser peligrosas. En ciertas realizaciones específicas, los niveles de endotoxinas y pirógenos en la composición son inferiores a 10 EU/mg o inferiores a 5 EU/mg o inferiores a 1 EU/mg o inferiores a 0,1 EU/mg o inferiores a 0,01 EU/mg o inferiores a 0,001 EU/mg.

En algunas realizaciones, los inhibidores de la vía de hedgehog se formulan en formulaciones estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

IX. Artículos de fabricación y kits

En algunas realizaciones, los inhibidores de la vía de hedgehog de la presente divulgación, tales como los inhibidores de la vía de hedgehog que se describen en el presente documento se preparan en un artículo de fabricación. De manera similar, pueden prepararse polipéptidos y ácidos nucleicos de la divulgación, tales como polipéptidos SMO mutantes, como un artículo de fabricación. En algunas realizaciones, el artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o un prospecto dentro o asociados al recipiente que indican un uso para la inhibición total o parcial de la señalización de hedgehog, o como alternativa para el tratamiento de un trastorno o afección resultante de la activación de la vía de señalización de hedgehog. En otras realizaciones, el artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o un prospecto dentro o asociados al recipiente que indican un uso en un ensayo de cribado. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. En algunas realizaciones, el recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección cancerosa y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un inhibidor de la vía de hedgehog. La etiqueta o el prospecto comprenderán adicionalmente instrucciones para administrar el inhibidor de la vía de hedgehog o para el uso del polipéptido SMO o el ácido nucleico o el vector o la célula hospedadora. Adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (ABPA), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. El artículo de fabricación puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

En algunas realizaciones, se proporcionan kits que son útiles para otros fines diversos, por ejemplo, para ensayos de destrucción de células que expresan la proteína SMO mutante, para la purificación o la inmunoprecipitación del polipéptido de señalización de hedgehog a partir de las células. Para el aislamiento y la purificación de la proteína SMO mutante, el kit puede contener el reactivo de unión a la proteína SMO mutante respectivo acoplado a perlas (por ejemplo, perlas de sefarosa). Pueden proporcionarse kits que contengan dichas moléculas para la detección y cuantificación de la proteína SMO mutante in vitro, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. En algunas realizaciones, al igual que con el artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o un prospecto dentro o asociados al recipiente. En algunas realizaciones, el recipiente contiene una composición que comprende al menos uno de dichos reactivos inhibidores de la vía de hedgehog utilizable con la divulgación. En algunas realizaciones, pueden incluirse recipientes adicionales que contengan, por ejemplo, diluyentes y tampones, anticuerpos de control. En algunas realizaciones, la etiqueta o el prospecto pueden proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso in vitro o de diagnóstico previsto.

Ejemplos

La divulgación que ahora se describe en general, se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente con fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente divulgación y no pretenden limitar la divulgación.

Ejemplo 1

Análisis genético de carcinomas de células basales resistentes a vismodegib. Las respuestas clínicas a terapias dirigidas (por ejemplo, terapias contra el cáncer) pueden ser de corta duración debido a la adquisición de alteraciones genéticas que confieren resistencia a los fármacos. La identificación de mecanismos de resistencia guiará estrategias terapéuticas novedosas. La señalización de Hh inadecuada está relacionada con varios cánceres, incluido el carcinoma de células basales (CCB). Las mutaciones de pérdida de función en PTCH (~90 %) y las mutaciones de activación en SMO (~10 %) son los principales activadores del CCB. Los mecanismos clínicos de resistencia al vismodegib (GDC-0449) se identificaron usando exoma, ARN y análisis del número de copias de los carcinomas de células basales recidivantes.

Como se muestra en la Figura 2, la resistencia al vismodegib se asoció a una señalización elevada de la vía del

hedgehog en pacientes con CCB resistentes al vismodegib. Los resultados de la secuenciación del exoma y del análisis del número de copias* de CCB resistentes a vismodegib se muestran a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3

Paciente	Activador oncogénico	Posible mecanismo de resistencia
MG	PTCH1.spc1504 (estirpe germinal)	SMO.W535L
JT	SMO.W535L (somático)	Desconocido
KL	PTCH1.P1387S,PTCH1.Q853*	Desconocido
*PT 20764	PTCH1.Fs1017 (desplazamiento del marco de lectura (estirpe germinal) y PDH)	SMO.W281C (G>T)
*PT 20741	PTCH1.A1380V	SUFU.Fs241
*PT 20849	PTCH1.S616G (corte y empalme y PDH)	Supresión de SUFU Het., Supresión de PTEN Het.
*PT 20840	PTCH1.Q501H (corte y empalme y PDH)	SMO.A459V (C>T)
*PT 20842	PTCH1.Fs 108 (desplazamiento del marco de lectura y PDH)	(C>T) SMO.A459V

5

La genotipificación reveló un tercer ejemplo de una Mutación SMO-A459V en un tumor adicional resistente a vismodegib. SMO-A459V es una mutación recurrente que se encuentra en biopsias posteriores al tratamiento en tres de los nueve pacientes resistentes analizados. La mutación SMO-A459V estaba presente solo después del tratamiento y ausente de 42 muestras independientes de CCB no tratado anteriormente. (Vea la Figura 3). La mutación SMO-A459V fue capaz de activar SMO.

10

También se detectó una mutación SMO-W281C en CCB recidivante. Como se muestra en la Figura 4, SMO-W281C se encuentra en el bolsillo de unión de vismodegib.

15

Se cotransfectaron WT-SMO, SMO-W281C, SMO-A459V, PTCH o vector vacío (VV) en células C3H10T1/2 con un indicador de luciferasa GLI1. Se demostró que SMO-A459V es una mutación activadora que tiene una sensibilidad disminuida a PTCH1 y vismodegib. (Figuras 5A-5C. Las barras de errores representan la desviación típica). SMO-W281C es tan sensible a la inhibición de PTCH como SMO-WT. (Figuras 5D-5E. Las barras de error representan la desviación típica). Se incubaron 293 células, transfectadas con las construcciones indicadas, con [³H]-vismodegib 5 nM con o sin vismodegib frío 50 μM. Unión específica = Total - unión no específica (Figura 5E. Las barras de errores representan la desviación típica).

20

Parece que hay dos subgrupos de mutaciones clínicas de SMO. 1) Activación, con sensibilidad reducida al fármaco (incluyendo A459V y W535L) y 2) Mutaciones que mantienen la sensibilidad de Ptch, pero interrumpen la conformación del bolsillo de unión de vismodegib (incluyendo D473H y W281C).

25

Ejemplo 2: Análisis genómico de CCB resistentes a vismodegib y sin tratar

Para identificar mutaciones asociadas a la resistencia a vismodegib, se realizó una secuenciación del exoma completo (WES, por sus siglas en inglés) de CCB de pacientes con síndrome de Gorlin (n = 5) y esporádicos (n = 6) y una secuenciación de SMO dirigido de una muestra incluida en parafina fijada con formol (IPFF) de un paciente con Gorlin adicional. Todos los pacientes experimentaron inicialmente un beneficio clínico con vismodegib, pero posteriormente progresaron durante el tratamiento.

35

Se recogieron dos biopsias distintas de cuatro de los pacientes, de manera que se analizaron un total de dieciséis biopsias de CCB resistentes a vismodegib. Los pacientes fueron diagnosticados inicialmente con CCB metastásico (Figura 6B) o localmente avanzado (Figura 6C) y se confirmó histológicamente que las lesiones resistentes al fármaco eran CCB (Figura 6D). Para la comparación, se sometieron a WES pacientes con CCB con síndrome de Gorlin (n = 16) y esporádicos (n = 27) sin tratar. Se obtuvieron dos biopsias distintas de cinco de los pacientes con Gorlin proporcionando 48 biopsias de CCB sin tratar en total. La tasa de mutación somática media de muestras de CCB sin tratar de pacientes con Gorlin fue de 33,5/megabase (Mb), variando de 6,2 a 68,9/Mb, y para pacientes esporádicos fue de 50,5/Mb con un intervalo de 2,4-162,2/Mb. Estas tasas son altas en comparación con otros cánceres, incluyendo el melanoma (Lawrence *et al.*, 2013). El análisis global del espectro de mutaciones somáticas reveló un predominio de mutaciones de transición de citosina a timina (C>T) en ambas cohortes, indicativo de mutagénesis inducida por luz ultravioleta (Miller, 1985).

El análisis transcripcional de las biopsias de CCB recidivantes (n = 11) usando secuenciación de ARN, reveló que el gen diana de Hh *GLI1* se expresó 10 veces más (DESeq2, p < 0,003) que en una colección de muestras de piel normales (Figura 6E). Adicionalmente, los niveles de expresión de *GLI1* estaban altamente correlacionados (R = 0,96) con los niveles de expresión del marcador de proliferación *MKI67*, coherentes con la reactivación de la señalización de Hh que activaba el recrecimiento de CCB. Por tanto, el análisis se centró en identificar los mecanismos genéticos que reactivan la señalización de Hh para evitar la inhibición de SMO por vismodegib. Con este fin, se identificaron mutaciones en los genes de cáncer seleccionados (Kandoth *et al.*, 2013) y componentes de la vía de Hh canónica. A continuación, se determinaron alteraciones en el número de copias de todo el genoma y PDH en CCB resistentes a vismodegib usando un polimorfismo de nucleótido único (SNP; n = 11) y matrices de hibridación genómica comparativa (CGH; n = 4).

Ejemplo 3: Mutaciones de *PTCH1* y *SMO* en el inicio de CCB

Coherente con informes anteriores sobre la genética de CCB (Jayaraman *et al.*, 2014; Reifengerger *et al.*, 2005), todos los CCB Gorlin (100 %) y la mayor parte de los esporádicos (75 %) recidivantes mostraron mutaciones en el supresor de tumores *PTCH1*, que ocurren a lo largo del gen y son probablemente perjudiciales: siete son truncadoras, cuatro pueden afectar al corte y empalme del exón y se predice que dos son perjudiciales mediante el algoritmo Condel (González-Pérez y López-Bigas, 2011). El CCB del paciente con Gorlin (PT12) también pudo haberse iniciado por alteraciones en *PTCH1*. Los tumores esporádicos recidivantes sin alteraciones de *PTCH1* (n = 2) albergaban la mutación oncogénica conocida SMO-W535L (Xie *et al.*, 1998). Es probable que estas variantes *PTCH1* y *SMO* sean los acontecimientos iniciadores en los CCB que respondieron primero y, posteriormente, mostraron resistencia a vismodegib.

Una tendencia similar para la frecuencia de variantes de *PTCH1* se observó en los CCB Gorlin (90 %) y esporádicos (78 %) sin tratar e identificó mutaciones SMO oncogénicas conocidas en tres casos esporádicos (Figura 7). Los CCB recidivantes mostraron una frecuencia similar de variantes de *TP53* entre los casos de Gorlin (50 %) y esporádicos (57 %), mientras que en la cohorte sin tratar se observaron variantes de *TP53* con mayor frecuencia en CCB esporádicos (59 %) que en los CCB Gorlin (24 %), lo que podría reflejar las tasas de mutación más altas observadas en los CCB esporádicos sin tratar.

Ejemplo 4: Selección dependiente de vismodegib de variantes de *SMO*

Sorprendentemente, la mayoría de las biopsias de tumores recidivantes albergaban mutaciones en la SMO diana del fármaco (11/16; 69 %) y la mayor parte se produjo con las variantes de *PTCH1*. En comparación, las variantes de *SMO* estaban completamente ausentes en los CCB Gorlin sin tratar y se presentaron en solo 4/27 (15 %) de los CCB esporádicos sin tratar. Las mutaciones de *SMO* identificadas en los CCB recidivante se esbozan en la Figura 8A. Las mutaciones SMO-L412F, SMO-W535L y SMO-S533N se publicaron anteriormente como activadores oncogénicos (Reifengerger *et al.*, 1998; Sweeney *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 1998), mientras que SMO-W281C y SMO-V321M se identificaron recientemente en CCB resistentes a vismodegib (Brinkhuizen *et al.*, 2014). Se descubrieron cuatro mutaciones de *SMO*, incluyendo SMO-I408V y SMO-A459V que no se observaron en la cohorte CCB sin tratar o en análisis genómicos previos de cánceres activados por Hh (Brastianos *et al.*, 2013; Clark *et al.*, 2013; Jayaraman *et al.*, 2014; Kool *et al.*, 2014; Reifengerger *et al.*, 1998), implicándolos fuertemente en la resistencia al vismodegib. Todas las mutaciones de *SMO* de este estudio se sitúan dentro de la región TM (Figuras 8B y 9A) y confieren sustituciones de aminoácidos en restos que están altamente conservados entre las proteínas SMO de varias especies, lo que probablemente refleja su importancia en la función de SMO.

Pueden adquirirse mecanismos de resistencia *de novo* o, más probablemente, mediante la selección de subclones menores presentes en el tumor previo al tratamiento. En ambos escenarios, se esperaba que se observara el enriquecimiento de las alteraciones responsables de la resistencia a los fármacos con el tratamiento. Para evaluar la selección dependiente del fármaco de mutantes de SMO, se examinó la detección de mutaciones en tumores previos al tratamiento y la proporción de células tumorales que albergaban mutaciones de SMO. Con este fin, se secuenciaron las muestras de tumores IPFF antes del tratamiento que estaban disponibles de seis pacientes y se analizaron para determinar la clonalidad tumoral posterior al tratamiento. Se detectó SMO-A459V en biopsias posteriores al tratamiento en tres pacientes, pero no fue detectable por encima de los niveles de fondo en las correspondientes biopsias

anteriores al tratamiento (Figura 8C). De manera similar, los cambios de nucleótidos correspondientes a SMO-V321M solo fueron detectables por encima de los niveles de fondo en las muestras posteriores al tratamiento, lo que es coherente con la selección inducida por el fármaco de células con SMO mutantes que surgieron *de novo* o estaban inicialmente presentes a niveles por debajo del límite de detección del ensayo (Figuras 8D y 8E). Curiosamente, la mutación SMO-L412F notificada anteriormente se detectó fácilmente en muestras anteriores y posteriores al tratamiento del paciente PT11, lo que sugiere que esta variante probablemente sea el activador oncogénico para este tumor (Figura 8F). Téngase en cuenta que la frecuencia de los nucleótidos mutantes parece disminuir tras el tratamiento; esto se debe a un mayor nivel de tejido normal contaminante en la muestra posterior al tratamiento. El análisis por número de copias y matriz de SNP revelaron que este tumor era inicialmente diploide para *PTCH1* y adquirió la pérdida de número de copias de *PTCH1* después del tratamiento. Sin desear quedar ligado a la teoría, el hecho de que este paciente respondiera inicialmente a vismodegib (Figura 8H) plantea la posibilidad de que niveles reducidos de *PTCH1* (a través de la pérdida de copias), en el contexto de esta mutación oncogénica, podrían promover el recrecimiento del tumor mientras se estaba en tratamiento con el fármaco.

Para determinar si las mutaciones de SMO estaban presentes en los clones dominantes en los CCB recidivantes, las fracciones de células tumorales de *PTCH1* y las variantes de SMO se calcularon usando las frecuencias alélicas de WES, así como el número de copias y la información del contenido tumoral derivados de las matrices de SNP (Greenman *et al.*, 2010; Nik-Zainal *et al.*, 2012; Stjermqvist *et al.*, 2011). Las mutaciones *PTCH1* de estirpes germinales heterocigóticas se explican por la contaminación de la piel normal en biopsias de pacientes con Gorlin y, cuando se observó, PDH posterior en células tumorales. Excepto PT09, SMO fue diploide en CCB recidivantes, por tanto, las frecuencias alélicas esperadas de las variantes de SMO heterocigóticas completamente clonales fueron el 50 % del contenido tumoral, que después se compararon con la frecuencia del alelo observada. Las mutaciones *PTCH1* estaban presentes en >80 % de las células tumorales, lo que es coherente con los acontecimientos perjudiciales en *PTCH1* que son los activadores oncogénicos en estos tumores. Basándose en la contaminación normal y en las frecuencias alélicas observadas, se estimó que todas las mutaciones de SMO estaban presentes en >60 % de las células tumorales en estos CCB resistentes a vismodegib, lo que es coherente con su selección tras el tratamiento con el fármaco.

Ejemplo 5: Mutaciones en el bolsillo de unión a fármaco de SMO confieren resistencia a vismodegib

Para conocer mejor las propiedades de las mutaciones de SMO descubiertas en este estudio, se utilizó la estructura cristalina recientemente resuelta de la región TM de SMO (Wang *et al.*, 2013). El acoplamiento computacional de vismodegib en la estructura de SMO reveló que SMO-W281, SMO-V321 y SMO-I408 están localizadas cerca del bolsillo de unión al fármaco (BUF; Figura 10A). El indol aromático de SMO-W281 forma una interacción de apilamiento pi de borde a cara con el anillo de piridina de vismodegib y ayuda a formar un bolsillo estrecho e hidrófobo, que se ve interrumpida por la sustitución del azufre menos voluminoso del mutante SMO-W281C (Figura 10B, panel central). Además, es probable que la mutación de valina 321 a metionina interfiera con la posición de W281, ejerciendo un efecto secundario sobre la unión del fármaco (Figura 10B, panel derecho). A diferencia de W281, el resto 1408 no entra en contacto directamente con el fármaco en el modelo computacional sometido a ensayo; en su lugar, se empaqueta contra los restos H470 y V404 del bolsillo de unión con su grupo metilo delta, que cuando se pierde se espera que afecte a la unión mediante el cambio de las conformaciones de estos restos (Figura 10C).

Para someter a ensayo el impacto funcional de las mutaciones en el BUF, se usó un ensayo de indicador de Hh basado en *Gli-luciferasa*. Las mutaciones de BUF aumentaron la CI50 de vismodegib de 12 a 49 veces más que la de SMO-WT, que tenía una CI50 de 80 nM (Figura 12A). Cabe señalar que estos valores de CI50 son sobreestimaciones debido a la sobreexpresión de SMO en este ensayo (Dijkgraaf *et al.*, 2011). Aunque cada mutante de BUF mostró un pequeño aumento (<1,5 veces) en la actividad basal en comparación con SMO-WT (Figura 11A), todos, excepto SMO-I408V, fueron inhibidos fácilmente por la sobreexpresión de *PTCH1* (Figura 11B). A continuación, se sometió a ensayo la unión de vismodegib marcado con [3H] a SMO-I408V y SMO-W281C, que presentaron respectivamente los aumentos más pequeños y más grandes en la CI50 (Figura 12A). Ambos mutantes se expresaron a niveles de superficie celular similares a SMO-WT, pero mostraron una unión de vismodegib alterada (Figuras 12B y 11C).

Se ha demostrado en modelos preclínicos de tumores que la vía de Hh debe inhibirse >90 % en el nivel transcripcional para inducir la regresión del tumor (Wong *et al.*, 2011). Para comprender mejor el impacto de estas mutaciones de SMO en la proliferación celular en presencia de vismodegib, se desarrolló un ensayo para la transducción vírica de células precursoras de neuronas de los gránulos cerebelosos (PNGC). Anteriormente se observó que las células tumorales activadas por Hh pierden rápidamente su dependencia de la vía de Hh durante el cultivo (Sasai *et al.*, 2006). Sin embargo, las PNGC proliferan *in vivo* de una manera dependiente de Hh y mantuvieron su dependencia de la vía de Hh en el cultivo durante un período finito (Wechsler-Reya y Scott, 1999). Las PNGC aisladas de crías *Ptch1loxP/loxP Tp53loxP/loxP Rosa26LSL-tdTomato* (PPT) se infectaron con construcciones lentivíricas que expresan una variante de SMO junto con una proteína fluorescente de color verde potenciada proteína de fusión (eGFP)-Cre (Figura 12C). La recombinasa Cre induce la pérdida de *Ptch1* y, por tanto, garantiza que solo las PNGC transducidas puedan proliferar en ausencia del ligando de hedgehog Sonic exógeno (SHH; Figura 11D). Esto les permitió a los inventores someter a ensayo la capacidad de los diversos mutantes de SMO para promover la proliferación en presencia de vismodegib y otros inhibidores, después de la retirada del ligando de SHH. Se controló la proliferación por incorporación de metil-[3H]-timidina, mientras que la expresión del dímero en tándem dependiente de Cre (td) Tomato

permitió la visualización y cuantificación de células infectadas. Este sistema también permitió un mejor modelo de genética del paciente porque la mayoría de las mutaciones de *SMO* se identificaron en tumores que albergaban mutaciones *TP53* y se activaron por la pérdida de *PTCH1*. Las PNGC de PPT infectadas con *SMO*-WT y Cre tuvieron una CI50 de ~22 nM y la proliferación se inhibió al máximo a 100 nM de vismodegib. En contraste, todas las mutaciones de BUF tuvieron un efecto drástico en la sensibilidad de vismodegib, con células infectadas que continúan proliferando a niveles altos de vismodegib (>1 µM; Figura 12D). Curiosamente, las células infectadas con *SMO*-W281C continuaron proliferando a niveles casi sin tratar, incluso en presencia de vismodegib 5 µM, lo que posiblemente refleja el papel directo de estos restos en la unión del fármaco. Se confirmó que las PNGC se infectaron a frecuencias similares mediante el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la expresión del indicador tdTomato dependiente de Cre y que las variantes de *SMO* se expresaron a niveles equivalentes mediante PCR cuantitativa de transcripción inversa (qRT).

Ejemplo 6: Predicción de la resistencia a vismodegib a través de la mutación del bolsillo de unión del fármaco de *SMO*

Para investigar si otras mutaciones de BUF podrían promover la resistencia al fármaco, se usó un modelo computacional para identificar los 21 restos de *SMO* con átomos ubicados dentro de 4,5 Å de vismodegib (Figura 13A). Se usó un algoritmo para identificar 160 variantes diferentes de nucleótidos únicos que dieron como resultado cambios no sinónimos en estos restos de BUF, incluidos *SMO*-W281C y *SMO*-I408V a partir de este estudio (Tabla 4).

Tabla 4: Identificación de restos de *SMO* con átomos dentro de 4,5 Angstroms de ambos vismodegib y LY2940680

Posición del AA	AA	Codón	Cambio de un solo nucleótido no sinónimo	Cambios de AA	Cambios C/G>T/A	Comentarios de la mutación
219	N	AAC	TAC, GAC, CAC, ATC, AGC, ACC, AAA, AAG	Y, D, H, I, S, T, K, K	Ninguno	N219D redujo la sensibilidad a vismodegib y LDE-225 (Este estudio y Buonamici <i>et al.</i> 2010)
221	L	CTC	ATC, TTC, GTC, CAC, CGC, CCC	I, F, V, H, R, P	F	L221R redujo la sensibilidad a LDE-225 (Buonamici <i>et al.</i> 2010)
230	M	ATG	TTG, GTG, CTG, AAG, AGG, ACG, ATA, ATT, ATC	L, V, L, K, R, T, I, I, I	I	
281	W	TGG	AGG, GGG, CCG, TAG, TTG, TCG, TGA, TGT, TGC	R, G, R, *, L, S, *, C, C	*	W281C, este estudio y Brinkhuizen <i>et al.</i> 2014
325	L	CTG	ATG, GTG, CAG, CGG, CCG	M, V, Q, R, P	Ninguno	
384	D	GAC	AAC, TAC, CAC, GTC, GGC, GCC, GAA, GAG	N, Y, H, V, G, A, E, E	N	D384N redujo la sensibilidad a vismodegib y LDE-225 (Este estudio y Buonamici <i>et al.</i> 2010)
389	I	ATT	TTT, GTT, CTT, AAT, AGT, ACT, ATG	F, V, L, N, S, T, M	Ninguno	
391	F	TTT	ATT, GTT, CTT, TAT, TGT, TCT, TTA, TTG	I, V, L, Y, C, S, L, L	Ninguno	
394	Y	TAC	AAC, GAC, CAC, TTC, TGC, TCC, TAA, TAG	N, D, H, F, C, S, *, *	Ninguno	
400	R	CGT	AGT, TGT, GGT, CAT, CTT, CCT	S, C, G, H, L, P	C	R400A, parcialmente funcional (Dijkgraaf <i>et al.</i> 2011)
408	I	ATC	TTC, GTC, CTC, AAC, AGC, ACC, ATG	F, V, L, N, S, T, M	Ninguno	I408V, este estudio
470	H	CAC	AAC, TAC, GAC, CTC, CGC, CCC, CAA, CAG	N, Y, D, L, R, P, Q, Q	Y	H470A no expresada (Dijkgraaf <i>et al.</i> 2011)
477	Q	CAG	AAG, TAG, GAG, CTG, CGG, CCG, CAT, CAC	K, *, E, L, R, P, H, H	E	

Posición del AA	AA	Codón	Cambio de un solo nucleótido no sinónimo	Cambios de AA	Cambios C/G>T/A	Comentarios de la mutación
480	W	TGG	AGG, GGG, CCG, TAG, TTG, TCG, TGA, TGT, TGC	R, G, R, *, L, S, *, C, C	*	W480A no expresada, (Dijkgraaf <i>et al.</i> 2011)
481	E	GAG	AAG, TAG, CAG, GTG, GGG, GCG, GAT, GAC	K, *, Q, V, G, A, D, D	K	
484	F	TTC	ATC, GTC, CTC, TAC, TGC, TCC, TTA, TTG	I, V, L, Y, C, S, L, L	Ninguno	
515	L	CTT	ATT, TTT, GTT, CAT, CGT, CCT	I, F, V, H, R, P	F	L515A expresada, activadora, sensible a la inhibición 1 mM por vismodegib (Dijkgraaf <i>et al.</i> 2011)
518	E	GAG	AAG, TAG, CAG, GTG, GGG, GCG, GAT, GAC	K, *, Q, V, G, A, D, D	K	E518K y E518A redujeron la sensibilidad a vismodegib (Dijkgraaf <i>et al.</i> 2011)
521	N	AAC	TAC, GAC, CAC, ATC, AGC, ACC, AAA, AAG	Y, D, H, I, S, T, K, K	Ninguno	N521A no expresada (Dijkgraaf <i>et al.</i> 2011)
522	L	CTG	ATG, GTG, CAG, CCG, CCG	M, V, Q, R, P	Ninguno	
525	M	ATG	TTG, GTG, CTG, AAG, AGG, ACG, ATA, ATT, ATC	L, V, L, K, R, T, I, I, I	I	
321	V	GTG	ATG, TTG, CTG, GAG, GGG, GCG	M, L, L, E, G, A	M	V321 M, este estudio y Brinkhuizen <i>et al.</i> 2014
387	S	AGT	TGT, GGT, CGT, AAT, ATT, ACT, AGA, AGG	C, G, R, N, I, T, R, R	N	S387N redujo la sensibilidad a vismodegib y LDE-225 (Este estudio y Buonamici <i>et al.</i> 2010)
459	A	GCC	ACC, TCC, CCC, GAC, GTC, GGC	T, S, P, D, V, G	V	A459V, este estudio
473	D	GAC	AAC, TAC, CAC, GTC, GGC, GCC, GAA, GAG	N, Y, H, V, G, A, E, E	N	D473H (Yauch <i>et al.</i> 2009). Todos los aa excepto P reducen la sensibilidad a vismodegib (Dijkgraaf <i>et al.</i> 2011)

Los aminoácidos correspondientes a las posiciones 219, 221, 281, 384, 408 y 518 de la SEQ ID NO: 1 están en el bolsillo de unión de vismodegib. Los aminoácidos correspondientes a las posiciones 321, 387, 459 y 473 de la SEQ ID NO: 1 se asocian a mutaciones clínicas, pero no se encuentran dentro de los 4,5 Angstroms de vismodegib cuando se unen a SMO. SMO-D473 no se identificó con este método, pero la estructura cristalina de SMO reveló que D473 forma una red de enlace de hidrógeno con varios restos que hacen contacto directo con vismodegib, incluyendo R400, H470, E518 y N521 (Wang *et al.*, 2013; Yauch *et al.*, 2009). SMOE518 se identificó anteriormente por mutagénesis de rastreo con alanina como un resto que afecta la sensibilidad al vismodegib cuando se muta (Dijkgraaf *et al.*, 2011). Este enfoque también identificó restos que se habían implicado anteriormente en modelos preclínicos de resistencia al inhibidor de SMO sonidegib (LDE225), incluyendo N219 y D384 (Tabla 4; Buonamici *et al.*, 2010), que se predice que estabilizan la conformación de SMO a través de una red de enlace de hidrógeno (Figura 13B). Sorprendentemente, SMO-N219D, SMO-D384N y SMO-S387N mostraron una sensibilidad reducida a vismodegib en comparación con SMO-WT en el ensayo de indicador de Hh basado en *Gli* luciferasa (Figura 13C). Además, se descubrió que el inhibidor de SMO LY2940680 y vismodegib comparten 14 restos de contacto (Tabla 4). Sin desear quedar ligados a la teoría, esto sugiere que los inhibidores químicamente distintos interactúan con restos de SMO superpuestos y que la resistencia cruzada entre los inhibidores podría producirse en la clínica.

Ejemplo 7: Mutaciones de SMO más allá del bolsillo de unión al fármaco confieren resistencia a vismodegib

Las mutaciones de SMO localizadas distalmente con respecto al bolsillo de unión de vismodegib también se asociaron a la resistencia a vismodegib (Figura 14A). Curiosamente, SMO-A459V mostró una mayor actividad basal sobre SMO-WT, aunque en menor medida que las mutaciones oncogénicas establecidas (Figura 14B). Esta actividad elevada se correlacionó con una sensibilidad reducida a la inhibición tanto por vismodegib (Figuras 15A) como por sobreexpresión de PTCH1, con SMO-A459V cambiando la CI50 de vismodegib aproximadamente 9 veces, respectivamente. Adicionalmente, todos los mutantes de activación sometidos a ensayo mostraron una unión alterada de vismodegib a

pesar de niveles comparables de expresión en la superficie celular a SMO-WT (Figuras 15B y 15C).

Se usó un ensayo de PNGC de PPT para investigar el impacto de las mutaciones SMO no de BUF en la proliferación en presencia de vismodegib. SMO-A459V y SMOW535L que expresan PNGC continuaron proliferando a altas concentraciones de vismodegib (Figuras 14C y 15D). Estos datos son coherentes con mutaciones fuera del BUF que desestabilizan la arquitectura de SMO para promover la activación y reducir la afinidad por los antagonistas, como se ha observado para los GPCR (Gether *et al.*, 1997). Sin embargo, no pueden descartarse posibles efectos alostéricos en el BUF por estas mutaciones. Varios CCB (de PT01, PT07 y PT11) que eran *PTCH1* de tipo silvestre y albergaban mutaciones de SMO oncogénicas respondieron inicialmente al tratamiento a pesar del hecho de que estas mutaciones de SMO reducen la sensibilidad a la inhibición de vismodegib (Figura 15A). Esto podría sugerir un papel para la pérdida de función de *PTCH1* en la sensibilidad de los mutantes SMO al vismodegib.

Ejemplo 8: Opciones terapéuticas para superar la resistencia a vismodegib

Habiendo establecido que múltiples mutaciones de SMO pueden conferir resistencia a vismodegib, a continuación, se abordó si los inhibidores de SMO químicamente distintos podrían superar la resistencia a vismodegib. LY2940680 y LDE225 están actualmente en ensayos clínicos para diversos cánceres (Clinicaltrials.gov) y el compuesto 5 es un inhibidor de SMO que mostró eficacia preclínica contra SMO-D473H (Dijkgraaf *et al.*, 2011). Si bien todos los compuestos inhibieron de manera similar la proliferación de SMN-WT que expresa PNGC de PPT, las células que expresan mutantes de SMO continuaron proliferando, aunque en diferentes grados (Figura 16A). Esta resistencia cruzada observada entre los diversos inhibidores de SMO es coherente con las predicciones estructurales y sugiere que la combinación de antagonistas de SMO no es una opción terapéutica adecuada para superar la resistencia adquirida. Además, la identificación de las variantes *SUFU* y *GLI2* recurrentes en tumores recidivantes podría argumentar, adicionalmente, la orientación de los componentes de la vía de Hh corriente abajo de SMO. Mientras que los inhibidores de GLI desarrollados hasta ahora carecen de potencia y biodisponibilidad, estudios recientes descubrieron que la proteína BRD4 que contiene bromodominio ocupa promotores de GLI y se necesita para la salida transcripcional de la vía de Hh (Long *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2014). Las PNGC de PPT que expresan mutantes de SMO resistentes a vismodegib mostraron una proliferación reducida de la presencia del inhibidor de bromodominio JQ1 (Figura 16B).

Materiales y métodos para los Ejemplos 2-9

Muestras de pacientes y tejidos

Las muestras de pacientes tratados con vismodegib se obtuvieron después de recibir un consentimiento informado por escrito de acuerdo con las directrices federales y según lo aprobado por las juntas de revisión institucional (JRI) de los centros contribuyentes que participan en los estudios clínicos SHH3925g, SHH4476g y STEVIE. Para el análisis de los mecanismos de resistencia a vismodegib, se obtuvieron biopsias en el momento de la progresión de la enfermedad de 12 pacientes con CCB localmente avanzado o metastásico, que experimentaron un beneficio clínico previo en el tratamiento evaluado por un investigador, como se describió anteriormente (LoRusso *et al.*, 2011; Sekulic *et al.*, 2012). Se recogieron biopsias de 43 pacientes sin tratar y se secuenciaron para su comparación de acuerdo con los protocolos aprobados por las JRI de la Universidad de Michigan y la Universidad de Stanford.

Análisis genómico

Se sometió a WES de ADN de 15 muestras de CCB resistente a vismodegib, 48 CCB sin tratar y 52 muestras de sangre pareadas. La WES de biopsias de tumor se consiguió con una cobertura promedio mínima de más de ~67 veces. Los cambios en el número de copias se evaluaron para CCB resistentes a vismodegib mediante matrices de SNP o CGH. El ARN de 11 muestras de CCB resistente se sometió a secuenciación de ARN. Se analizó el ADN de 7 muestras de IPFF mediante pirosecuenciación. Se usaron datos de secuenciación ARN de cinco muestras de piel normal (obtenidas de ProteoGenex) como expresión génica basal para comparaciones con muestras de pacientes con CCB.

Animales

Todos los ratones se alojaron y se mantuvieron de acuerdo con los protocolos aprobados por el comité institucional de cuidado y uso de animales de Genentech Inc., que se ajustaron a las directrices de uso de animales de Genentech Inc. y a las prácticas legales y éticas del estado de California.

60

Análisis funcionales

Se generaron mutantes de SMO en los vectores pRK5-SMO como se describe (Dijkgraaf *et al.*, 2011; Yauch *et al.*, 2009) y se utilizaron ya sea en ensayos indicadores de *Gli*-luciferasa descritos (Dijkgraaf *et al.*, 2011) o se clonaron en vectores lentivíricos para la transducción de cultivos primarios de PNGC. La proliferación se sometió a ensayo usando la incorporación de metil-[3H]-timidina (Kool *et al.*, 2014). La unión de [3H]-vismodegib a mutantes de SMO se realizó en células HEK293 como se describe (Dijkgraaf *et al.*, 2011).

Muestras de pacientes

Se recogieron muestras de tumores recidivantes después de recibir un consentimiento informado por escrito de acuerdo con las directrices federales y de la junta de revisión institucional (JRI) en los centros contribuyentes. Las muestras de CCB esporádico sin tratar se obtuvieron de acuerdo con los protocolos HUM00069052 y HUM00050085 aprobados por la JRI de la Universidad de Michigan. Las muestras de pacientes con Gorlin sin tratar se obtuvieron de acuerdo con el protocolo 2012-029 aprobado por la JRI de la Universidad de Stanford.

Histología

Se seccionaron muestras incluidas IPFF y de compuesto O.C.T (Tissue-Tek) y se tñieron con HyE de acuerdo con procedimientos convencionales. Las imágenes se adquirieron usando un microscopio Zeiss Axioskop 2 (Zeiss).

Aislamiento de ADN y ARN

Los tumores CCB congelados se homogeneizaron en RLT más tampón de lisis (Qiagen) usando Bullet Blender (Next Advance) o Tissue Lyzer (Qiagen). Los ácidos nucleicos se aislaron con el mini kit de DNA/ARN Allprep (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Las secciones de tumores IPFF se macrodisecionaron, se desparafinaron y se extrajeron usando el kit de IPFF de DNA/ARN Allprep (Qiagen).

Captura y secuenciación del exoma

La captura del exoma se realizó con el kit de todo el exoma humano (50 Mb) Agilent SureSelect (Santa Clara, CA). Las bibliotecas de captura de exoma se secuenciaron en HiSeq 2000 (Illumina, CA) para generar datos de extremos pareados de 2 x 75 pb.

Asignación de variantes

Las lecturas de secuenciación de exoma se alinearon con el genoma humano UCSC (GRCh37/hg19) usando gsnap (Wu y Nacu, 2010) versión 10-10-2013 con los parámetros "-M 2 -n 10 -B 2 -i 1 --pairmax-dna=1000 --terminal-threshold=1000 -gmap-mode=none-clip-overlap". La realineación local se realizó usando el GATK Indel Realigner (DePristo *et al.*, 2011). Se retiraron lecturas duplicadas usando Picard. Se realizó la asignación de variantes somáticas en muestras de tumor y muestras normales emparejadas usando VariantTools2 con parámetros predeterminados (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/VariantTools.html>). Las variaciones en la estirpe germinal conocidas representadas en dbSNP Build 131 (Sherry *et al.*, 2001) pero ausentes en COSMIC v62 (Forbes *et al.*, 2010) se retiraron por filtrado para todas las muestras. El efecto de todas las mutaciones somáticas no sinónimas en la función del gen se predijo usando Condel (González-Pérez y López-Bigas, 2011). Todas las variantes se anotaron usando Ensembl Release 63.

Secuenciación de ARN y análisis de datos

Se prepararon bibliotecas secuenciación de ARN usando el kit de preparación de muestras de ARN TruSeq (Illumina, CA). Las bibliotecas se multiplexaron tres por línea y se secuenciaron en HiSeq 2000 para obtener al menos ~30 millones de lecturas de extremos pareados (2 x 75 pb) por muestra. Las lecturas de secuenciación de ARN se alinearon con el genoma humano UCSC (GRCh37/hg19) usando gsnap (Wu y Nacu, 2010) versión 10-10-2013 con los parámetros "-M 2 -n 10 -B 2 -i 1 -N 1 -w 200000 -E 1 -- pairmax-rna=200000 --clip-overlap". Los recuentos de expresión por gen se obtuvieron contando el número de lecturas que se alinearon de manera concordante dentro de un par y de manera única para cada locus génico según lo definido por las anotaciones génicas NCBI y Ensembl y secuencias de ARNm RefSeq. El análisis de la expresión génica diferencial se realizó usando el paquete Bioconductor DESeq2 (Anders y Huber, 2010).

Procesamiento de datos de secuencia

Todas las lecturas de secuenciación se evaluaron para determinar la calidad usando el paquete Bioconductor ShortRead (Morgan *et al.*, 2009). Para confirmar que todas las muestras se identificaron correctamente, todas las variantes de datos de secuenciación de exoma y ARN se compararon de forma cruzada y se verificó su coherencia genética usando el paquete Bioconductor VariantTools2. Todas las muestras pareadas de pacientes se emparejaron correctamente y no coincidieron con ningún otro paciente usando un valor de corte del 90 %.

Hibridación genómica comparativa (CGH)

Se sometieron a ensayo muestras de tumores en micromatrices 1 M de Agilent Human Genome CGH. Se usó ADN genómico masculino humano (Promega P/N G1471) como referencia. Se obtuvieron relaciones log₂ individuales de intensidades de señal restadas del fondo del software Agilent Feature Extraction versión 10.7. Las relaciones log₂ se corrigieron para el efecto de onda del contenido de GC (Diskin *et al.*, 2008) usando ventanas de 1 Mb para el contenido de GC del genoma. Los valores de relación log₂ resultantes para cada sonda se segmentaron usando el algoritmo cghFLasso (Tibshirani y Wang, 2008) una muestra y un cromosoma a la vez. La segmentación se realizó usando los parámetros lambda₁ = 0 y lambda₂ = 1000 * la fracción de sondas en el cromosoma actual. A todas las sondas dentro de los límites genómicos de un segmento dado se les proporcionó el valor de número de copia promedio de las sondas dentro de ese segmento.

Matriz de SNP

Se procesaron matrices Illumina HumanOmni 2,5-8 usando una versión modificada anteriormente utilizada de un método desarrollado por (Rudin *et al.*, 2012). Como antes, se usó un panel grande de muestras normales para conocer el comportamiento de las dos sondas para cada SNP. Para el análisis actual, se usaron 450 muestras normales de HapMap. Como antes, la señal sin procesar para cada sonda en cada muestra se transformó en una escala donde 0, 1 o 2 copias subyacentes verdaderas de un alelo cartografiado se asignan a 1, 2 o 3, según lo requiere el modelo de Markov oculto de PICNIC. Estos valores para las sondas A y B para cada alelo se usaron para calcular la relación del número de copias (CNR, por sus siglas en inglés, Fórmula 1) y *Theta* (Fórmula 2). La CNR puede interpretarse como la relación del número total de copias en un locus dado con respecto a la ploidía de la muestra general, es decir, el número promedio de copias en todo el genoma. Los valores de CNR se corrigieron para el efecto de onda del contenido de GC (Diskin *et al.*, 2008) usando ventanas de 1 Mb para el contenido de GC del genoma.

$$\text{Fórmula 1: } CNR = (A+B)/4$$

$$\text{Fórmula 2: } \theta = 2/\pi * \arctan(B/A)$$

Después se introdujeron CNR y *Theta* en la etapa de preprocesamiento de PICNIC, que estima α , el valor de fondo para CNR cuando hay cero copias presentes; π , la fracción de señal proveniente de la contaminación celular normal; y \emptyset , ploidía global o el número de copia media en todas las posiciones SNP interrogadas. Esta estimación requiere una segmentación inicial de CNR a lo largo del genoma. En el presente trabajo, se usó cghFLasso (L2L1 VitPath con lambda₁ = 0 y lambda₂ = 1000, (Tibshirani y Wang, 2008)), que se ha demostrado que proporciona una segmentación más precisa que CBS (Venkatraman y Olshen, 2007) o el algoritmo interno de PICNIC. Además, el procedimiento de PICNIC para estimar α , π y \emptyset se corrigió para usar un número de copias esperado específico del sexo (p_i) para los cromosomas X e Y. Finalmente, las distribuciones anteriores originales de PICNIC para estos tres parámetros resultaron inadecuadas para esta plataforma de matriz. En cambio, α se modeló como un gaussiano con una media de 0,7 y una desviación típica de 0,05; π se modeló como una distribución beta con un parámetro alfa de 0,05 y un parámetro beta de 100; y \emptyset se modeló como una distribución gamma con un parámetro de forma de 6,7143 y un parámetro de escala de 0,35.

Una vez que se estimaron α , π y \emptyset para cada muestra, se aplicó el HMM de PICNIC para segmentar los datos y generar un número de copias específico del alelo entero. Los segmentos del genoma en los que el menor del número de copias específico del alelo era igual a cero son regiones de PDH.

Aunque el ajuste de HMM fue generalmente bastante preciso para la mayoría de los cromosomas en la mayoría de las muestras, se observó que la CNR ocasionalmente se encontraba entre los valores esperados para dos enteros adyacentes. Esto produjo fluctuaciones entre dos estados HMM adyacentes que se cree que no son un reflejo de la realidad biológica. Para solucionar esto, la estimación del número total de copias producidas por el HMM de PICNIC se reemplazó por el valor sin restricciones producido por cghFLasso (CNR). Para producir el número total de copias informado y ajustar la contaminación normal, las estimaciones de α , π y \emptyset y se aplicaron a los resultados de cghFLasso según PICNIC:

$$\text{Fórmula 3. } \delta = (1 - \alpha) / ((2 \pi) + \phi(1 - \pi))$$

$$\text{Fórmula 4. } CNR = \left(\frac{CNR_k - \alpha}{\delta - p_i \pi} \right) / (1 - \pi)$$

Fracciones de células tumorales

Las fracciones de células tumorales se calcularon como se describe (Nik-Zainal *et al.*, 2012). En resumen, las células tumorales que llevan una mutación determinada se determinaron mediante la siguiente fórmula:

$$f = \min\left(1, \frac{r \cdot p n_T + (1-p) n_N}{s}\right)$$

donde r es la fracción de células en una biopsia que son células tumorales, como se determina por matriz SNP; r es el número de lecturas que notifican la variante del alelo de R lecturas totales en la base de interés; y h_T y h_N son el número de copias del genoma en esa base en el tumor y en los genomas normales, respectivamente. Todas las frecuencias se convirtieron a porcentajes. Algunas frecuencias de células tumorales fueron superiores al 100 % porque este modelo no tiene en cuenta las mutaciones de la estirpe germinal o la copia de PDH neutra. Para las mutaciones de la estirpe germinal verificadas, la fórmula se ajustó para tener en cuenta las lecturas mutantes en una relación diferente en el tejido contaminante:

$$f = \min\left(1, \frac{r}{R} p n_T + (1-p) n_N\right)$$

Modelo de unión a vismodegib

La estructura cristalina de SMO con LY2940680 unido (PDB ID: 4JKV) sirvió como punto de partida para el acoplamiento. El paquete de programas Schrodinger disponible en Maestro versión 9.5 (Schrodinger, Inc.) se usó para realizar la preparación de proteínas con PrepWiz, la preparación de ligandos de vismodegib con Ligprep y el acoplamiento con Glide Standard Precision, conservando los parámetros predeterminados para todas las etapas, excepto las siguientes modificaciones en la etapa de acoplamiento Glide. Se incluyeron cincuenta orientaciones para realizar la minimización posterior al acoplamiento, con los términos de corrección de tensión activados. Las diez orientaciones principales se escribieron para su análisis, todas las cuales dieron modos de enlace similares. La piridina y los anillos orto-clorofenilo adyacentes permanecieron en aproximadamente las mismas posiciones, con variaciones en los ángulos de torsión de la amida que provocan ligeras variaciones en las posiciones de la metilsulfona y su anillo unido. La posición superior se seleccionó para las cifras en este estudio, pero las variaciones descritas anteriormente no habrían cambiado ninguna interpretación con respecto a los efectos mutacionales. Las Figuras 2B, 3A-C, 5A-B y 6A se prepararon usando MOE 2013.0801 (Chemical Computing Group, Inc.). Las áreas de superficie mostradas para el bolsillo de unión y la interacción Ile-408 son accesibles para el disolvente.

Pirosecuenciación

Se diseñaron cebadores de PCR (BSP) específicos de mutación usando el software PyroMark Assay Design v2.0 (Qiagen). Los cebadores de PCR se sintetizaron con un marcador de biotina 5' en el cebador directo o inverso para facilitar la unión del producto de la PCR a las perlas de estreptavidina sefarosa. Los cebadores de secuenciación se diseñaron en la dirección inversa del cebador de PCR marcado con biotina 5' usando el software PyroMark Assay Design v2.0 (Qiagen). El ADN genómico (20 ng) se amplificó en una reacción de 25 μ l usando Platinum PCR Supermix (Invitrogen) y se usaron 20 μ l de producto de PCR para la secuenciación en el Pyromark Q24 (Qiagen). Los productos de PCR se incubaron con perlas de estreptavidina sefarosa durante 10 minutos, seguidos de lavados con etanol al 70 %, solución de desnaturalización Pyromark y tampón de lavado Pyromark. Los productos de la PCR desnaturalizados se secuenciaron después usando un cebador de secuenciación 0,3 μ M. Los pirogramas se visualizaron y evaluaron para determinar la calidad de la secuencia y se determinó el porcentaje de mutantes en las posiciones SMO L412 y A549 usando el software PyroMark versión 2.0.4 (Qiagen).

Ensayo de número de copias

El ADN genómico se aisló a partir de sangre, muestras de tumores antes y después del tratamiento y se usaron 10 ng por reacción como molde en los ensayos de Taqman por cuadruplicado (Applied Biosystems/Life Technologies) para determinar el número de copias de *PTCH1* y *RNasa P* (de referencia) con CopyCaller Software (Applied Biosystems/Life Technologies).

RT-PCR en tiempo real

Se transcribieron de uno a cuatro μ g de ARN total de manera inversa usando el kit de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems/Life Technologies). Las reacciones de PCR cuantitativas se realizaron usando la mezcla maestra de PCR universal TaqMan (Applied Biosystems/Life Technologies). Las secuencias de cebador/sonda Taqman específicas del gen están disponibles por pedido.

Plásmidos

Se generaron mutantes puntuales de SMO en pRK5-SMO con el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange II (Stratagene). Los mutantes puntuales de SMO se clonaron en pRK5-SMO-Flag y pRK7-gD-SMO-myc. pRK5-PTCH1 y pRK5-eGFP fueron descritos anteriormente por (Yauch *et al.*, 2009). La construcción Gli-BS de indicador de luciferasa de Hh fue descrito anteriormente por (Murone *et al.*, 1999) y el plásmido de control de la transfección Renilla pRL-TK es de Promega. pGEGC es un vector lentivírico autoinactivador basado en el VIH que se creó al reemplazar

el contenido de Zeo^R-CMV_{ie}-tGFP-IRES-Puro^R-shRNA-WRE de pGIPZ (Open Biosystems), por un fragmento que contiene el promotor EF1 α , un sitio de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés), un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES, por sus siglas en inglés) y Cre-recombinasa fusionada al término C de la proteína fluorescente de color verde potenciada (eGFP-Cre; Harfe *et al.*, 2004). Todas las construcciones se confirmaron por secuenciación; los detalles de clonación, los mapas vectoriales y los archivos de secuencia están disponibles por pedido.

Ensayo de indicador luciferasa

Se sembraron células C3H10T $\frac{1}{2}$ (ATCC) en placas de seis pocillos a 1,75 x 10⁵ células/pocillo en DMEM de Alta Glucosa con glutamina 4 mM, Hepes 10 mM, pH 7,2 y FBS al 10 %. Después de 16 h, las células se transfectaron con 400 ng de construcción de expresión, 400 ng de 9x-Gli-BS y 200 ng de pRL-TK por pocillo usando reactivo de transfección GeneJuice (Novagen). Para los experimentos de inhibición de PTCH1, las células se transfectaron con 200 ng de construcción de expresión de SMO y 200 ng adicionales de ADN que contienen proporciones variables de PTCH 1 a vector vacío. Seis horas más tarde, las células de un pocillo se tripsinizaron y redistribuyeron en cuatro pocillos de una placa de 12 pocillos. Después de 16 horas, el contenido de FBS del medio de cultivo se redujo al 0,5 % para inducir la formación de cilios primarios y se añadieron inhibidores de Hh de molécula pequeña a las concentraciones indicadas. La actividad de luciferasa de luciérnaga se determinó 24 horas después con el Sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo (Promega) y se leyó usando un lector de placas Wallac EnVision (Perkin Elmer). Los valores se dividieron por actividades de luciferasa de renilla para normalizar la eficiencia de transfección. Los experimentos individuales se realizaron por duplicado o triplicado y se repitieron al menos una vez. Los datos de respuesta a la dosis se ajustaron a una ecuación de 4 parámetros en GraphPad Prism,

$$Y = 1 + \frac{1-B}{(1+10^{(X-H)/S})^A}$$

donde 'Y' es la señal de Gli-luciferasa normalizada o la incorporación de timidina normalizada calculada como una fracción de control que no incluía el inhibidor y 'X' es la concentración del inhibidor. Los valores superior e inferior (B) se limitaron a ser iguales para cada muestra. 'H' es la pendiente de Hill.

Ensayo de unión a [³H]-vismodegib

Se sembraron 2 x 10⁶ células HEK-293 células en placas de 10 cm y se transfectaron 16 horas más tarde con 3 μ g de cualquier vector vacío o construcción de expresión SMO usando GeneJuice (Novagen). Las células se recogieron 40 horas más tarde en PBS con EDTA 1 mM y se fijaron en PBS con PFA al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA), después de lo cual se lavaron 3 veces en PBS con EDTA 1 mM y se colocaron en placas de 96 pocillos a 100.000 células por pocillo. Las células se incubaron durante 1 hora a TA con [³H]-vismodegib (Selcia) 5 nM en ausencia o presencia de vismodegib sin marcar 50 μ M, y se transfirieron posteriormente a una placa de filtro (Perkin Elmer) usando un cosechador de células Filtermate Cell (Perkin Elmer). Se añadieron cuarenta μ m de fluido MicroScint (Perkin Elmer) por pocillo y se evaluaron los recuentos por minuto usando un TopCount NXT de PerkinElmer. Todas las muestras se analizaron por triplicado. La unión específica se calculó después de la competencia con un exceso de vismodegib sin marcar restando la unión no específica de la unión total.

Análisis por FACS de la expresión en la superficie celular de gD-SMO

Se sembraron 1x10⁶ células HEK-293 en placas de 10 cm y se transfectaron 6 horas más tarde con 3 μ g de la construcción de expresión gD-SMO usando GeneJuice (Novagen). Las células se desalojaron 48 horas más tarde en PBS con EDTA 1 mM y se incubaron secuencialmente durante 30 minutos con anticuerpo anti-gD (5B6, a 1 μ g/ml), seguido de dos incubaciones de 20 minutos con biotín-SP 1:100 conjugado con anticuerpo de cabra anti IgG de ratón Affinipure y estreptavidina conjugada con Ficoeritrina-R 1:50 (ambos de Jackson Immunoresearch Labs). Las células se resuspendieron en yoduro de propidio (500 ng/ml) y se analizaron en un HTS FacsCalibur (BD Biosciences).

Producción de virus y titulación

Se sembraron células HEK-293T en placas de 15 cm a 1,5x10⁶ células/placa en DMEM de alta glucosa con FBS al 10 % inactivado por calor 24 horas antes de la transfección. Los sobrenadantes lentivíricos se prepararon mediante cotransfección usando 6 μ g de pGEIGC-SMO, 12 μ g del vector de empaquetamiento Δ 8,9 (Zufferey *et al.*, 1997), 3 μ g del vector de envoltura pVSV-G (Clontech) y el reactivo de transfección GeneJuice (Novagen). El medio de cultivo se reemplazó 12 horas después de la transfección y el sobrenadante vírico se recogió 24 horas después, se filtró a través de un filtro PES de 0,45 μ m (Nalgene) y se almacenó a 4 °C hasta su posterior procesamiento. Los sobrenadantes víricos se concentraron 200 veces mediante ultracentrifugación a 100.000 xg durante 1 hora y 30 minutos (Zufferey y Trono, 2000). Los sedimentos víricos se resuspendieron en medio de PNGC y se almacenaron a -80 °C. Los títulos víricos se determinaron en células HEK-293T que se colocaron en placas a 2x10⁵ células/pocillo en placas de seis pocillos. Las células se dejaron adherir durante 12 h, después de lo cual el medio se reemplazó por 2 ml de concentrado vírico diluido 1:400 o 1:4000. El número de células por pocillo se contó en el momento de la adición del

virus y se usó el promedio de seis pocillos para calcular el título vírico. Los sobrenadantes víricos permanecieron en las células durante 60 h, después de lo cual las células se recogieron y se analizaron para determinar la expresión de proteínas fluorescentes mediante FACS. Los títulos víricos se calcularon en unidades de transducción (UT)/ml de acuerdo con la ecuación [número de células/100 x % de células fluorescentes] x 1000 por μ l de concentrado vírico (Zufferey y Trono, 2000). Solo se utilizaron las transducciones que dieron como resultado menos de un 15 % de células fluorescentes para los cálculos de títulos.

Ratones

La cepa loxp de *Ptch1* fue un amable regalo de R. Töftgard y S. Teglund (Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia; Kasper *et al.*, 2011). La cepa *Tp53*^{loxp} fue un amable regalo de A. Berns (Instituto Neerlandés del Cáncer, Ámsterdam, Países Bajos; Jonkers *et al.*, 2001). La cepa *Rova26*^{LSLtdTomato} se adquirió de Jackson Labs (número de materia prima: 007909; Madisen *et al.*, 2010). Todos los ratones se alojaron y se mantuvieron de acuerdo con las pautas de uso animal de Genentech Inc., de acuerdo con las prácticas legales y éticas del estado de California.

Aislamiento y transducción de PNGC

Se disociaron cerebelos de ratones *Ptch1*^{loxp/loxp}*Rosa26*^{LSLtdTomato}*Tp53*^{loxp/loxp} de 5-7 días de edad en tripsina al 0,05 % durante 10 min a 37 °C. Las células se recogieron mediante centrifugación a 514 xg durante 10 min a 4 °C, se resuspendieron en medio PNGC (medio Neurobasal (Life Technologies) que contenía 1x B27 (sin vitamina A; Life Technologies), glucosa al 0,45 % (Sigma Aldrich), KCl 25 mM, albúmina de suero bovino al 0,4 % (Sigma Aldrich), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml (Life Technologies), estreptomycin 100 μ g/ml (Life Technologies), SHH recombinante octilado 200 ng/ml y se filtró a través de un filtro de 0,45 μ m (Falcon). Las células se colocaron en placas de 6 pocillos recubiertas con poli-D-lisina (Corning) a 5x10E5 células/pocillo y se infectaron con lentivirus a una multiplicidad de infección (MOI) de 1. Después de 24 h, las células se recogieron mediante tripsinización, se recogieron en medio de PNGC y se volvieron a sembrar en placa para aplicaciones corriente abajo.

Incorporación de metil-[3H]-timidina

Para examinar los efectos de los HPI en la proliferación, se sembraron en placas de PNGC transducidas víricamente en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina (Corning) a 25.000 células/pocillo en medio PNGC sin SHH. Las concentraciones de inhibidor se sometieron a ensayo en pocillos triplicados y fueron de 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 5000 nM para vismodegib, 500 nM para LDE225, 500 nM para LY2940680, 500 nM para el compuesto 5, 1 μ M para JQ1 y el 0,1 % para DMSO (control de vehículo de mayor concentración). Después de 24 h, las células se pulsaron con 1 μ Ci/ml de metil-[3H]-timidina (Amersham/GE Healthcare) y se cultivaron durante 16-24 h adicionales. Las células se recogieron en placas de filtro de 96 pocillos (Perkin Elmer) usando un recogedor de células Filtermate (Perkin Elmer) y la radioactividad incorporada se cuantificó mediante espectrofotometría de centelleo líquido en un TopCount NXT (PerkinElmer).

Compuestos

GDC-0449, el compuesto 5 y JQ-1 se prepararon como se describe en los documentos WO2006028956, WO2007059157 y Filippakopoulos *et al.*, 2010. LDE225 (HY-16582) y LY2940680 (HY-13242) eran de MedchemExpress.

Referencias citadas

- Amakye, D., Jagani, Z. y Dorsch, M. (2013). *Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. Nature medicine* 19, 1410-1422.
- Atwood, S. X., Li, M., Lee, A., Tang, J. Y. y Oro, A. E. (2013). *GLI activation by atypical protein kinase C iota/lambda regulates the growth of basal cell carcinomas. Nature* 494, 484-488.
- Brastianos, P. K., Horowitz, P. M., Santagata, S., Jones, R. T., McKenna, A., Getz, G., Ligon, K. L., Palesscandolo, E., Van Hummelen, P., Ducar, M. D., *et al.* (2013). *Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations. Nature genetics* 45, 285-289.
- Brinkhuizen, T., Reinders, M. G., van Geel, M., Hendriksen, A. J., Paulussen, A. D., Winnepeninckx, V. J., Keymeulen, K. B., Soetekouw, P. M., van Steensel, M. A. y Mosterd, K. (2014). *Acquired resistance to the Hedgehog pathway inhibitor vismodegib due to smoothed mutations in treatment of locally advanced basal cell carcinoma. Journal of the American Academy of Dermatology.*
- Buonamici, S., Williams, J., Morrissey, M., Wang, A., Guo, R., Vattay, A., Hsiao, K., Yuan, J., Green, J., Ospina, B., *et al.* (2010). *Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. Sci Transl Med* 2, 51ra70.
- Chang, A. L. y Oro, A. E. (2012). *Initial assessment of tumor regrowth after vismodegib in advanced Basal cell carcinoma. Archives of dermatology* 148, 1324-1325.
- Clark, V. E., Erson-Omay, E. Z., Serin, A., Yin, J., Cotney, J., Ozduman, K., Avsar, T., Li, J., Murray, P. B., Henegariu, O., *et al.* (2013). *Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1 y SMO. Science* 339, 1077-1080.

- Das Thakur, M. y Stuart, D. D. (2013). *The evolution of melanoma resistance reveals therapeutic opportunities. Cancer research* 73, 6106-6110.
- Dijkgraaf, G. J., Aliche, B., Weinmann, L., Januario, T., West, K., Modrusan, Z., Burdick, D., Goldsmith, R., Robarge, K., Sutherlin, D., et al. (2011). *Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothed mutants and downstream mechanisms of drug resistance. Cancer research* 71, 435-444.
- 5 • Gether, U., Ballesteros, J. A., Seifert, R., Sanders-Bush, E., Weinstein, H. y Kobilka, B. K. (1997). *Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor. Agonist-independent activation due to conformational flexibility. The Journal of biological chemistry* 272, 2587-2590.
- Gonzalez-Perez, A. y Lopez-Bigas, N. (2011). *Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel. American journal of human genetics* 88, 440-449.
- 10 • Greenman, C. D., Bignell, G., Butler, A., Edkins, S., Hinton, J., Beare, D., Swamy, S., Santarius, T., Chen, L., Widaa, S., et al. (2010). *PICNIC: an algorithm to predict absolute allelic copy number variation with microarray cancer data. Biostatistics* 11, 164-175.
- Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulos, P. G., Gailani, M. R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Uden, A. B., Gillies, S., et al. (1996). *Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. Cell* 85, 841-851.
- 15 • Inukai, M., Toyooka, S., Ito, S., Asano, H., Ichihara, S., Soh, J., Suehisa, H., Ouchida, M., Aoe, K., Aoe, M., et al. (2006). *Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. Cancer research* 66, 7854-7858.
- Jayaraman, S. S., Rayhan, D. J., Hazany, S. y Kolodney, M. S. (2014). *Mutational landscape of basal cell carcinomas by whole-exome sequencing. The Journal of investigative dermatology* 134, 213-220.
- Johnson, R. L., Rothman, A. L., Xie, J., Goodrich, L. V., Bare, J. W., Bonifas, J. M., Quinn, A. G., Myers, R. M., Cox, D. R., Epstein, E. H., Jr. y Scott, M. P. (1996). *Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. Science* 272, 1668-1671.
- 25 • Kandath, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J. F., Wyczalkowski, M. A., et al. (2013). *Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. Nature* 502, 333-339.
- Katritch, V., Cherezov, V. y Stevens, R. C. (2013). *Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. Annual review of pharmacology and toxicology* 53, 531-556.
- Kijima, C., Miyashita, T., Suzuki, M., Oka, H. y Fujii, K. (2012). *Two cases of nevoid basal cell carcinoma syndrome associated with meningioma caused by a PTCH1 or SUFU germline mutation. Fam Cancer* 11, 565-570.
- 30 • Kool, M., Jones, D. T., Jager, N., Northcott, P. A., Pugh, T. J., Hovestadt, V., Piro, R. M., Esparza, L. A., Markant, S. L., Remke, M., et al. (2014). *Genome Sequencing of SHH Medulloblastoma Predicts Genotype-Related Response to Smoothed Inhibition. Cancer cell* 25, 393-405.
- Lackner, M. R., Wilson, T. R. y Settleman, J. (2012). *Mechanisms of acquired resistance to targeted cancer therapies. Future Oncol* 8, 999-1014.
- 35 • Lee, Y., Kawagoe, R., Sasai, K., Li, Y., Russell, H. R., Curran, T. y McKinnon, P. J. (2007). *Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis. Oncogene* 26, 6442-6447.
- Long, J., Li, B., Rodriguez-Blanco, J., Pastori, C., Volmar, C. H., Wahlestedt, C., Capobianco, A., Bai, F., Pei, X. H., Ayad, N. G. y Robbins, D. J. (2014). *The BET bromodomain inhibitor I-BET151 acts downstream of Smoothed to abrogate the growth of Hedgehog driven cancers. The Journal of biological chemistry.*
- 40 • LoRusso, P. M., Rudin, C. M., Reddy, J. C., Tibes, R., Weiss, G. J., Borad, M. J., Hann, C. L., Brahmer, J. R., Chang, I., Darbonne, W. C., et al. (2011). *Phase I trial of hedgehog pathway inhibitor vismodegib (GDC-0449) in patients with refractory, locally advanced or metastatic solid tumors. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 2502-2511.
- 45 • Metcalfe, C., Aliche, B., Crow, A., Lamoureux, M., Dijkgraaf, G. J., Peale, F., Gould, S. E. y de Sauvage, F. J. (2013). *PTEN loss mitigates the response of medulloblastoma to Hedgehog pathway inhibition. Cancer research* 73, 7034-7042.
- Miller, J. H. (1985). *Mutagenic specificity of ultraviolet light. J Mol Biol* 182, 45-65.
- Nedelcu, D., Liu, J., Xu, Y., Jao, C. y Salic, A. (2013). *Oxysterol binding to the extracellular domain of Smoothed in Hedgehog signaling. Nature chemical biology* 9, 557-564.
- 50 • Negrini, S., Gorgoulis, V. G. y Halazonetis, T. D. (2010). *Genomic instability-an evolving hallmark of cancer. Nature reviews Molecular cell biology* 11, 220-228.
- Nik-Zainal, S., Van Loo, P., Wedge, D. C., Alexandrov, L. B., Greenman, C. D., Lau, K. W., Raine, K., Jones, D., Marshall, J., Ramakrishna, M., et al. (2012). *The life history of 21 breast cancers. Cell* 149, 994-1007.
- 55 • Oro, A. E., Higgins, K. M., Hu, Z., Bonifas, J. M., Epstein, E. H., Jr. y Scott, M. P. (1997). *Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. Science* 276, 817-821.
- Pastorino, L., Ghiorzo, P., Nasti, S., Battistuzzi, L., Cusano, R., Marzocchi, C., Garre, M. L., Clementi, M. y Scarra, G. B. (2009). *Identification of a SUFU germline mutation in a family with Gorlin syndrome. Am J Med Genet A* 149A, 1539-1543.
- 60 • Pesz, K. A., Bieniek, A., Makowska, I. y Sasiadek, M. M. (2013). *Basal cell carcinoma of the skin: whole genome screening by comparative genome hybridization revisited. Journal of cutaneous pathology* 40, 25-29.
- Pricl, S., Cortelazzi, B., Dal Col, V., Marson, D., Laurini, E., Fermeglia, M., Licitra, L.,
- Pilotti, S., Bossi, P. y Perrone, F. (2014). *Smoothed (SMO) receptor mutations dictate resistance to vismodegib in basal cell carcinoma. Molecular oncology.*
- 65 • Reifemberger, J., Wolter, M., Knobbe, C. B., Kohler, B., Schonicke, A., Scharwachter, C., Kumar, K., Blaschke, B., Ruzicka, T. y Reifemberger, G. (2005). *Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic*

- basal cell carcinomas. Br J Dermatol* 152, 43-51.
- Reifengerger, J., Wolter, M., Weber, R. G., Megahed, M., Ruzicka, T., Lichter, P. y Reifengerger, G. (1998). *Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. Cancer research* 58, 1798-1803.
 - 5 • Sasai, K., Romer, J. T., Lee, Y., Finkelstein, D., Fuller, C., McKinnon, P. J. y Curran, T. (2006). *Shh pathway activity is down-regulated in cultured medulloblastoma cells: implications for preclinical studies. Cancer research* 66, 4215-4222.
 - Sekulic, A., Migden, M. R., Oro, A. E., Dirix, L., Lewis, K. D., Hainsworth, J. D., Solomon, J. A., Yoo, S., Arron, S. T., Friedlander, P. A., et al. (2012). *Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. The New England journal of medicine* 366, 2171-2179.
 - 10 • Smith, M. J., Beetz, C., Williams, S. G., Bhaskar, S. S., O'Sullivan, J., Anderson, B., Daly, S. B., Urquhart, J. E., Bholah, Z., Oudit, D., et al. (2014). *Germline Mutations in SUFU Cause Gorlin Syndrome-Associated Childhood Medulloblastoma and Redefine the Risk Associated With PTCH1 Mutations. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.*
 - 15 • Stjernqvist, S., Ryden, T. y Greenman, C. D. (2011). *Model-integrated estimation of normal tissue contamination for cancer SNP allelic copy number data. Cancer informatics* 10, 159-173.
 - Stone, D. M., Murone, M., Luoh, S., Ye, W., Armanini, M. P., Gume, A., Phillips, H., Brush, J., Goddard, A., de Sauvage, F. J. y Rosenthal, A. (1999). *Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. Journal of cell science* 112 (Pt 23), 4437-4448.
 - 20 • Svard, J., Heby-Henricson, K., Persson-Lek, M., Rozell, B., Lauth, M., Bergstrom, A., Ericson, J., Toftgard, R. y Teglund, S. (2006). *Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. Developmental cell* 10, 187-197.
 - Sweeney, R. T., McClary, A. C., Myers, B. R., Biscocho, J., Neahring, L., Kwei, K. A., Qu, K., Gong, X., Ng, T., Jones, C. D., et al. (2014). *Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. Nature genetics*
 - 25 46, 722-725.
 - Tang, Y., Gholamin, S., Schubert, S., Willardson, M. I., Lee, A., Bandopadhyay, P., Bergthold, G., Masoud, S., Nguyen, B., Vue, N., et al. (2014). *Epigenetic targeting of Hedgehog pathway transcriptional output through BET bromodomain inhibition. Nature medicine* 20, 732-740.
 - Taylor, M. D., Liu, L., Raffel, C., Hui, C. C., Mainprize, T. G., Zhang, X., Agatep, R., Chiappa, S., Gao, L., Lowrance, A., et al. (2002). *Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. Nature genetics* 31, 306-310.
 - 30 • Wang, C., Wu, H., Katritch, V., Han, G. W., Huang, X. P., Liu, W., Siu, F. Y., Roth, B. L., Cherezov, V. y Stevens, R. C. (2013). *Structure of the human smoothed receptor bound to an antitumour agent Nature* 497, 338-343.
 - Wang, G. Y., So, P. L., Wang, L., Libove, E., Wang, J. y Epstein, E. H., Jr. (2011). *Establishment of murine basal cell carcinoma allografts: a potential model for preclinical drug testing and for molecular analysis. The Journal of investigative dermatology* 131, 2298-2305.
 - 35 • Wechsler-Reya, R. J. y Scott, M. P. (1999). *Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. Neuron* 22, 103-114.
 - Wong, H., Alicke, B., West, K. A., Pacheco, P., La, H., Januario, T., Yauch, R. L., de Sauvage, F. J. y Gould, S. E. (2011). *Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of vismodegib in preclinical models of mutational and liganddependent Hedgehog pathway activation. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 4682-4692.
 - 40 • Xie, J., Murone, M., Luoh, S. M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J. M., Lam, C. W., Hynes, M., Goddard, A., et al. (1998). *Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. Nature* 391, 90-92.
 - Yauch, R. L., Dijkgraaf, G. J., Alicke, B., Januario, T., Ahn, C. P., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Callahan, C. A., Tang, T., et al. (2009). *Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. Science* 326, 572-574.
 - 45 • Anders, S. y Huber, W. (2010). *Differential expression analysis for sequence count data. Genome biology* 11, R106.
 - DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., Philippakis, A. A., del Angel, G., Rivas, M. A., Hanna, M., et al. (2011). *A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. Nature genetics* 43, 491-498.
 - 50 • Diskin, S. J., Li, M., Hou, C., Yang, S., Glessner, J., Hakonarson, H., Bucan, M., Maris, J. M. y Wang, K. (2008). *Adjustment of genomic waves in signal intensities from whole-genome SNP genotyping platforms. Nucleic acids research* 36, e126.
 - Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., Morse, E. M., Keates, T., Hickman, T. T., Felletar, et al. (2010). *Selective Inhibition of BET bromodomains. Nature* 468, 1067-1073.
 - 55 • Forbes, S. A., Bindal, N., Bamford, S., Cole, C., Kok, C. Y., Beare, D., Jia, M., Shepherd, R., Leung, K., Menzies, A., et al. (2011). *COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. Nucleic acids research* 39, D945-950.
 - Forbes, S. A., Tang, G., Bindal, N., Bamford, S., Dawson, E., Cole, C., Kok, Y., Jia, M., Ewing, R., Menzies, A., et al. (2010). *COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer. Nucleic acids research* 38, D652-657.
 - 60 • Gonzalez-Perez, A. y Lopez-Bigas, N. (2011). *Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel. American journal of human genetics* 88, 440-449.
 - Harfe, B. D., Scherz, P. J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A. P. y Tabin, C. J. (2004). *Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. Cell* 118, 517-528.
 - 65 • Jonkers, J., Meuwissen, R., van der Gulden, H., Peterse, H., van der Valk, M. y Berns, A. (2001). *Synergistic tumor*

suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. Nature genetics 29, 418-425

- Kasper, M., Jaks, V., Are, A., Bergstrom, A., Schwager, A., Svard, J., Teglund S., Barker, N. y Toftgard, R. (2011). *Wounding enhances epidermal tumorigenesis by recruiting hair follicle keratinocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 4099-4104.
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H.A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R., *et al.* (2010). *Nature neuroscience* 13, 133-140.
- Morgan, M., *et al.* (2009). *Bioinformatics* 25, 2607-2608.
- Murone, M. *et al.* (1999). *Current biology: CB* 9, 76-84.
- Rudin, C *et al.*, (2012). *Nature genetics* 44, 1111-1116.
- Sherry, S *et al.*, (2001). *Nucleic acids research* 29, 308-311.
- Tibshirani, R. y Wang, P. (2008). *Biostatistics* 9, 18-29.
- Venkatraman, E. *et al.*, (2007). *Bioinformatics* 23, 657-663.
- Wu, T. *et al.*, (2010). *Bioinformatics* 26, 873-881.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 – Secuencia de aminoácidos de smoothed de tipo silvestre humana (N.º de acceso de GenBank N.º NP_005622.1)

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

ES 2 694 857 T3

Gly Pro Val Ala Gly Leu Ala Phe Asp Leu Asn Glu Pro Ser Ala Asp Val Ser Ser Ala
Trp Ala Gln His Val Thr Lys Met Val Ala Arg Arg Gly Ala Ile Leu Pro Gln Asp Ile
Ser Val Thr Pro Val Ala Thr Pro Val Pro Pro Glu Glu Gln Ala Asn Leu Trp Leu Val
Glu Ala Glu Ile Ser Pro Glu Leu Gln Lys Arg Leu Gly Arg Lys Lys Lys Arg Arg Lys
Arg Lys Lys Glu Val Cys Pro Leu Ala Pro Pro Pro Glu Leu His Pro Pro Ala Pro Ala
Pro Ser Thr Ile Pro Arg Leu Pro Gln Leu Pro Arg Gln Lys Cys Leu Val Ala Ala Gly
Ala Trp Gly Ala Gly Asp Ser Cys Arg Gln Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asn Pro Phe
Cys Pro Glu Pro Ser Pro Pro Gln Asp Pro Phe Leu Pro Ser Ala Pro Ala Pro Val Ala
Trp Ala His Gly Arg Arg Gln Gly Leu Gly Pro Ile His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp
Thr Glu Leu Met Asp Ala Asp Ser Asp Phe

SEQ ID NO: 2 – Secuencia de aminoácidos de smoothed humana que tiene mutación en la posición de aminoácido 281 de SMO

5

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

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

SEQ ID NO: 3 Secuencia de aminoácidos de smoothed humana que tiene mutación en la posición de aminoácido 459 de SMO

5

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

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

ES 2 694 857 T3

SEQ ID NO: 4 Secuencia de aminoácidos de smoothed humana que tiene mutación en la posición de aminoácido 535 de SMO

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

ES 2 694 857 T3

Glu Ala Glu Ile Ser Pro Glu Leu Gln Lys Arg Leu Gly Arg Lys Lys Lys Arg Arg Lys
Arg Lys Lys Glu Val Cys Pro Leu Ala Pro Pro Pro Glu Leu His Pro Pro Ala Pro Ala
Pro Ser Thr Ile Pro Arg Leu Pro Gln Leu Pro Arg Gln Lys Cys Leu Val Ala Ala Gly
Ala Trp Gly Ala Gly Asp Ser Cys Arg Gln Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asn Pro Phe
Cys Pro Glu Pro Ser Pro Pro Gln Asp Pro Phe Leu Pro Ser Ala Pro Ala Pro Val Ala
Trp Ala His Gly Arg Arg Gln Gly Leu Gly Pro Ile His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp
Thr Glu Leu Met Asp Ala Asp Ser Asp Phe

SEQ ID NO: 5 (WT SMO) atggcgcctg cccgccagc gggggggcgg gagctcccgc tctggggct
gctgctgctg ctgctgctgg gggaccggg cggggggcgg gccfcgagcg ggaacgcgac cgggcctggg
cctcggagcg cgggcgggag cgcgaggagg agcggggcgg tgactggccc tccgcgcgcg ctgagccact
ggggccgggc tgcacctgc gagccgctgc gctacaactg gtgccgggce tcggctgctgc cctacggggc
cacctccaca ctgctggcgg gagactcgga ctccaggag gaagcgcacg geaagctcgt gctctggctg
ggcctccgga atgcccccg ctgctgggca gtgatecagc cctgctgtg tgcctatac atgcccagt
gtgagaatga cggggtggag ctgccagcc gtacctctg ccaggccacc cgaggccct gtgccatct
ggagagggag cggggctggc ctgaactct gcctgcaet cctgaccct tccctgaagg ctgacgaat
gaggtgcaga acatcaagt caacagtca ggccagtgc aagtgcctt ggttcggaca gacaaccca
agagctggtg cgaggacgtg gagggtgcg gcatcagtg ccagaaccg ctctcacag aggctgagca
ccaggacatg cacagctaca tcgcggcctt cggggccgct acgggcctct gcaagctctt caccctggcc
acattcgtg ctgactggcg gaactcgaat cgtacctctg ctgtattct ctctacgct aatgcgtgct tctttggtg
cagcattggc tggtggccc agttcatgga tgggtcccgc cgagagatcg tctgccgtgc agatggcacc
atgagcctg gggagccac ctccaatgag actctgtct gctcatcat ctgtctac gtgtactacg
ccctgatggc tgggtgggt tggttgtgg tctcacta tgcctggcac acttcttca aagccctggg caccacctac
cagctctct cgggcaagac ctctactt cactctca cctggcact ccccttctc ctactgtg caactctg
tgtggcagc gttgatggg actctgtgag tggcattgt tttgtggct acaagaacta cggataccgt
ggggcctc tctggcccc aatggcctg gtgctcatg tgggaggcta ctctctac cgaggagta
tgactctgt ctccatcaag agcaaccacc cgggctgct gattgagaag gctgccagca agatcaacga
gaccatgctg cgcctgggca ttttggctt cctggcctt ggctttgtg ctactact cagctgccac tctacgact
tctcaacca ggctgagtgg gagcgcagct tccgggacta tgtctatgt caggccaatg tgaccatgg
gctgccacc aagcagccca tccctgactg tgagatcaag aatgcccca gccctctgtt ggagaagatc
aacctgtttg ccatgtttg aactggcact gccatgagca cctgggtctg gaccaaggcc acgctgctca
tctggaggcg tacttggctg aggtgactg ggcagagtga cgatgagcca aageggatca agaagagcaa
gatgattgcc aagcctct ctacgggca cgactcctg cagaaccag gccaggagct gtcctcagc

ES 2 694 857 T3

atgcacactg tgtcccacga cgggcccgtg gggggttgg ccttgacct caatgagccc tcagctgatg
tctctctgctg ctggcccag catgtacca agatgggtggc tggagagga gccatactgcccaggatata
ttctgtacc cctgtggcaa ctccagtgc cccagaggaa caagccaacc tgtggctggt tgaggcagag
atctcccag agctgcagaa gcgctgggc eggaagaaga agaggaggaa gaggaagaag gaggtgtgcc
cgtgggcc gcccccctgag ctccacccc ctgcccctgc ccccagtacc attctctgac tgcctcaget
gccccggcag aaatgcctgg tggctgcagg tgcctgggga gctggggact ctgcccaca gggagcgtgg
accctggtct ccaaccatt ctgcccagag cccagcccc ctccagatcc attctgccc agtgcaccgg
ccccctggc atgggctcat ggccgcccag agggcctggg gcctattcac tcccaccca acctgatgga
cacagaactc atggatgcag actcggactt ctga

SEQ ID NO: 6 - Secuencia de aminoácidos de smoothed humana que tiene mutación en la posición de aminoácido 408 de SMO

5

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

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

SEQ ID NO: 7 - Secuencia de aminoácidos de smoothed humana que tiene mutación en la posición de aminoácido 533 de SMO

5

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

ES 2 694 857 T3

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

SEQ ID NO: 8 – Secuencia de aminoácidos de Supresor de Fusiónado (SuFu) humano (N.º de Acceso de GenBank NM_016169.2)

MAELRPSGAPGPTAPPAPGPTAPPAFASLFPPGLHAIYGECCRRLYPDQP
NPLQVTAIVKYWLGGPDPDYVSMYRNVGSPSANIPEHWHYISFGLSDLYGD
NRVHEFTGTDGPSGFGFELTFRLKRETGESAPPTWPAELMQGLARYVFQSEN
TFCSGDHVSWHSPLDNSESRIQHMLLTEDPQMOPVQTPFGVVTFLQIVGVCTE
ELHSAQQWNGQGILELLRTVPIAGGPWLITDMRRGETIFEIDPHLQERVDKGIE
TDGSNLSGVSAKCAWDDLSRPPEDDEDSRSICIGTQPRRLSGKDTEQIRETLRR
GLEINSKPVLPPINPQRQNGLAHDRAPSRKDSLESSTAIHPHELIRTRQLESV
HLKFNQESGALIPLCLRGRLLHGRHFTYKSITGDMAITFVSTGVEGAFATEEHP
YAAHGFWLQILLTEEFVEKMLEDLTSPPEFKLPKEYSWPEKCLKVSILPD
VVFDSPLH

SEQ ID NO: 9 – Secuencia de ADNc de Supresor de Fusionado (SuFu) humano (N.º de Acceso de GenBank NM_016169.2)

5

CGCCGTGCGCAGGCGCGGAGCTAGACCTCGCTGCAGCCCCCATCGC
CTCGGGGAGTCTCACCCACCGAGTCCGCCCGCTGGCCCGTCAGTGCTCTCC
CCGTGCTTTGCCCTCTCCAGTTCCCCCAGTGCCTGCCCTACGCACCCCGAT
GGCGGAGCTGCGGCCTAGCGGCGCCCCCGGCCCCACCGCGCCCCCGGCC
CTGGCCCGACTGCCCCCGGCCTTCGCTTCGCTCTTTCCCCGGGACTGC
ACGCCATCTACGGAGAGTGCCGCGCCTTTACCCTGACCAGCCGAACCCG
CTCCAGGTTACCGCTATCGTCAAGTACTGGTTGGGTGGCCAGACCCCTTG
GACTATGTTAGCATGTACAGGAATGTGGGGAGCCCTTCTGCTAACATCCC
CGAGCACTGGCACTACATCAGCTTCGGCCTGAGTGATCTCTATGGTGACA
ACAGAGTCCATGAGTTTACAGGAACAGATGGACCTAGTGGTTTTGGCTTT
GAGTTGACCTTTTCGTCTGAAGAGAGAACTGGGGAGTCTGCCCCACCAAC
ATGGCCCGCAGAGTTAATGCAGGGCTTGGCACGATACGTGTTCCAGTCAG
AGAACACCTTCTGCAGTGGGGACCATGTGTCCTGGCACAGCCCTTTGGAT
AACAGTGAGTCAAGAATTCAGCACATGCTGCTGACAGAGGACCCACAGAT
GCAGCCCGTGCAGACACCCTTTGGGGTAGTTACCTTCCTCCAGATCGTTGG
TGTCTGCACTGAAGAGCTACACTCAGCCCAGCAGTGGAACGGGCAGGGCA
TCCTGGAGCTGCTGCGGACAGTGCCTATTGCTGGCGGCCCTGGCTGATA
ACTGACATGCGGAGGGGAGAGACCATAATTTGAGATCGATCCACACCTGCA
AGAGAGAGTTGACAAAGGCATCGAGACAGATGGCTCCAACCTGAGTGGT
GTCAGTGCCAAGTGTGCCTGGGATGACCTGAGCCGGCCCCCGAGGATGA

CGAGGACAGCCGGAGCATCTGCATCGGCACACAGCCCCGGCGACTCTCTG
 GCAAAGACACAGAGCAGATCCGGGAGACCCTGAGGAGAGGACTCGAGAT
 CAACAGCAAACCTGTCCTTCCACCAATCAACCCTCAGCGGCAGAATGGCC
 TCGCCCACGACCGGGCCCCGAGCCGCAAAGACAGCCTGGAAAGTGACAG
 CTCCACGGCCATCATTCCCCATGAGCTGATTTCGCACGCGGCAGCTTGAGA
 GCGTACATCTGAAATTCAACCAGGAGTCCGGAGCCCTCATTCTCTCTGCC
 TAAGGGGCAGGCTCCTGCATGGACGGCACTTTACATATAAAAGTATCACA
 GGTGACATGGCCATCACGTTTGTCTCCACGGGAGTGGAAGGCGCCTTTGC
 CACTGAGGAGCATCCTTACGCGGCTCATGGACCCTGGTTACAAATTCTGTT
 GACCGAAGAGTTTGTAGAGAAAATGTTGGAGGATTTAGAAGATTTGACTT
 CTCCAGAGGAATTCAAACTTCCCAAAGAGTACAGCTGGCCTGAAAAGAAG
 CTGAAGGTCTCCATCCTGCCTGACGTGGTGTTCGACAGTCCGCTACACTAG
 CCTGGGCTGGGCCCTGCAGGGGCCAGCAGGGAGCCCAGCTGCTCCCCAGT
 GACTTCCAGTGTAACAGTTGTGTCAACGAGATCTCCACAAATAAAAGGAC
 AAGTGTGAGGAAGACTGCGCAGTGCCACCCCGCAGCCCAGTGGGGTGCCA
 TGCACAGGCCACAGGCCCTCCACCTCACCTCCAGCTCAGGGGCCGCACCC
 CGCCGCTGGCTAAGCCTTGTGACCCATCAGGCCAGTGAGTGGGCAAATGC
 GGACCCTCCCTGCCTGCAGCCTGCACAGATTCTGGTTTGAGGTTTGACTCT
 GGACCCTGGCTGTGCCCTAGGTGGAGACAGCCCTCTTTCTCACCTACCCC
 CTGCCGCACAGCCCAGCAGGAGGGAGGCGGACAGCCAGATGCAGAGCGA
 GTGGATGCACTTCCCAGCTCATCTCTGGAAGCCTTTGCTACTCAAGCTCCT
 CTGGCCGCGGAACAATTCTCTGATCATGTTTGGTTTTCTTCTTCTTATTT
 TATTTTGTAGAAACCGGGTGGTATTTTATTGCTCTGCAAAGATGTCCAGAA
 GCCATGTATATAATGTTTTTAAACAGAACTTCATTCCCCGTTGAACTTTC
 GCATTCTCTGACAGAGGCCTAGGGCTGTATCTCTCCCTGGGCTGCCACCAG
 AGAAGGTGCTTGGTGTTCGCCTGCCAGCCCAGAGCCCTGGAGGAGCCGGC
 TGCACAGAGAGGCTTTTCTTCCCAGCTGGGCCTGATGGAGCCCGGGGCAG
 GGGGAGAGTAGAGACACTCCCTTGTGCAGCTTTGAGCCTAGTTTAGCTGG
 GGCCAGGGAGGGGTGCTACTGTTTTCCAAGTGAATGGGTCTCAAAGACTT
 GGTGACCCCAGCCTCATCTTCTAGGCCTTTTCCATCCAACCAGGCCTACCT
 GGGAGAGGGTGAGGTTTCAGCACATCACACACCATCCCCACTGTCATTCAG
 GGCTGGGTCTCCAGCTCTGTAACCAGTCCTGTCCCATTTCTCAGTCCCT
 GGGCCTCCCAGCCTTCAGGCTGTAGGGCTGCCTTACTAAAATTGAAAAAT

CCACCTCTTAACATCTCTTTTCACTTTGGTTTTGCTAACACTGCTCTCTGCTG
 CCCTCCCATCCTCCCTGTATCCATTCATGCCCTATCTTTTCACTTCTCCACTCC
 TAATCCCTCTCCTTTTCTGGCATCCTGGCCTCTCGTGGTCCTCAGCCCCCTCAC
 CCCCAGTACTGCAGATCTCACAGTTTGCCTTCCAGAAGCCAGCCTATCTCT
 AGCCCATGGTTTTTGGAGTTCCTCTCGGGTTATCTCCCACGCCTGACCTGGA
 ACCAGCAAGCCCCTTTTCTGCCTTCTTACCCCCAACTCTAGGGATGGGACT
 GTTACAATACTTCAAGATCACTCTTTACACCTCTTCAAAGCAAAGTCATGA
 CAATGCAGGGGCTCCTCATTGCTCCCATCTGCCTCTGCTGCACACACAGGCA
 CCAGCAGGGATGCCACAGGAGTGCCCACAGGGTGCAGGACTCCACTGATG
 AGAGATCCAGCCAAAGAGCTGCCCCCAGGGGTATGAGGGCACCAGCTGG
 GTTCTCCAGGGAGCAGGAGTTGGACCTCCATGGAGCCACTAGGCCTGGCC
 TCCTCTACACATCCCCAGGGCTATCTGGTTAATTCCATCAAGCTCAGAGTT
 AAAAGGCATATCAGCCTGGAGTATTTGGGAGAGACTGGCTGCAGATCCCC
 GCCAGCCAAGATGCAAGCCACTCGGGACCTGATGTCCGGCAGCTGTGCCTC
 TACTGCCCTGAGGACTTACCAGAGGGAGCCCTACTGGCCTTCCCCCACCA
 CAGCAGCCCTGCCTGTGAAGCTCTTGTTTTCTGACATTTACAGGCAGAGAG
 GTGCCATCAGTTCGCCTCCATTCCTTGCCACCATGACCAGCCTCTCCCTGA
 ACTCTCTCTTGCTCGGGACCTGCCTGAGGGCTCCCTGCTGCAGTTTCGCCGT
 ACTTCCATCTGCTGGGTGCCTCCATCGTTGGTTGGGTGGGGATGGGGCATT
 TTCTGAGCTAAGCTTTGTCATTAGTTTTGTGAAGCACCTGGTCAGCAACCTG
 CCCCAGACCTGGAGGGTCTTTGTGGACTGAAGGTAGACACCAGCCAGCAT
 GGTGGCCCTGTTCTGGGGGAGCAGGGTAAGGCAGGAGGAAGTGGGTGAG
 CTCCGAGATGATGAGCACATGAAGCCTGTGGCCCCCTTCGTACCTGCAATA
 TGTCAGGAGCCTCACGCTCACCCAAGATCCTGCAGGGGCCAGGCTCCATC
 TCACTGGCTCTGAGGGCAGGACAGGGTATCACACATTTCTCACCAGGCCT
 CCTTTCCTATGGGCATTGGTGCCTCCCAGAGGTTTCTTGGGCTGCTGGCTG
 GTGAGAGAGGACCCTTAAAGAAGATCAAGCCAAGCTGACCTTGGACCCTG
 TCCAGCACAGCTTCTGGCACAGGATGCTTGGTGAATGTACCCTTTCTTTCC
 CTCCCTGCAGCTCTGAGGGAGCCCCTGACCTTGTAGTGGGTGGAGGAGGT
 AAGGGGCCTCCCTCCCTAAATCTGCCTCTTCTGCAAGCTACTTGGAGACTT
 GCCTAGTTGTACCCACCCCTCCAGGTCCCTGGTGCTAGAGCTTCTGAGAAG
 GGCTTTCCCTTTCTCTTTGCCTGCTATATAAGGCAGGCTCCTGTGGCTCT
 GCTGGCTCAGTGTGGGCTGCAGGAGGACTGCAGACTCAGCTGCAATTCTG

ES 2 694 857 T3

AGGGGGGTTTGGGAGGCTTGTGCGAGGTCTCAGGCCTGTGTGGGGAGCTG
GTGCCTCTTCCTGCCCCGTATCTTTCTCTTCCAAGGGCAGTGCTCCAAGGCA
GGGACTGGAGAAGCCAAGGGGAGAGTCTAAAAGGGCTAGAGCATTTTTA
AAAATAGACACAGGGTCTTGGGACTGGGGTTTCGGATTGAGTTGCAAGCA
GGGAGAAAACCTGAAGGTCGGTGCCCCTATGGGGCTGACCAGTAGAGAA
TTTCCTTTACTGTATTTTGTGTCTGGTCTTCCCTTTCTGGCTTCTAGGACAT
CCATGCCAGGTGAGGTGCCTGGGTCCCTGTTACAAGTCAGGAGCCCTGTA
GGGAGACCCCTCCTTTTGTACAAGTACCTGAATGCTGCGACAAGCAGATT
TTTGTA AAAATTTTATATTAGTTTTTAATGTCAGTGGCGACTCGGTTCTGG
GGCTGCAGCCAGCCTGGGACTTTTGTAGAATTTTGGGTGACTCACTTAG
ATGTCGTTTCCTTCTTGCCCCCTTTCCTCTCTGTAATCTAAGTGCATAAA
CATCTTTGCAG

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína SMO mutante que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 95 % a la SEQ ID NO: 1 en donde la secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido distinto del triptófano en la posición de aminoácido que corresponde a la posición 281 de la SEQ ID NO: 1.
2. Una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con el ácido nucleico que codifica una proteína SMO mutada o un fragmento de la misma que incorpora una mutación en la secuencia que codifica la posición de aminoácido que corresponde a la 281 de la SEQ ID NO: 1, en donde la sonda comprende adicionalmente un marcador detectable.
3. Una proteína SMO mutante aislada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95 % a la SEQ ID NO: 1 en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido distinto del triptófano en la posición de aminoácido que corresponde a la posición 281 de la SEQ ID NO: 1.
4. La proteína SMO mutante aislada de la reivindicación 3 en la que dicha secuencia de aminoácidos comprende cisteína (C) en la posición de aminoácido que corresponde a la posición 281 de la SEQ ID NO: 1.
5. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína SMO mutante de las reivindicaciones 3 o 4, en donde dicho anticuerpo no se une a SMO de tipo silvestre que tiene un triptófano en la posición de aminoácido que corresponde a la 281 de la SEQ ID NO: 1.
6. Un método de identificación de al menos una mutación de SMO en una muestra que comprende poner en contacto el ácido nucleico de dicha muestra con una sonda de ácido nucleico que sea capaz de hibridarse específicamente con el ácido nucleico que codifica una proteína SMO mutada o un fragmento de la misma que incorpora una mutación que altera la secuencia que codifica la posición de aminoácido que corresponde a la 281 de la SEQ ID NO: 1 a un aminoácido distinto del triptófano y detectando dicha hibridación.
7. Una composición para su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto, en donde se ha determinado que dicho sujeto tiene un tumor que es resistente al tratamiento con GDC-0449, que comprende determinar la presencia de un gen de SMO mutado o proteína SMO mutada en una muestra de dicho tumor, en donde dicho gen de SMO mutado codifica una proteína SMO que comprende una mutación en la posición de aminoácido que corresponde a la posición 281 de la SEQ ID NO: 1, y en donde dicha proteína SMO comprende una mutación en la posición de aminoácido que corresponde a la posición 281 de la SEQ ID NO: 1, por lo que la presencia de dicho gen de SMO mutado o dicha proteína SMO mutada indica que dicho tumor es resistente al tratamiento con un GDC-0449; en donde la composición se une a dicha SMO mutada.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 en donde la presencia o la ausencia de dicha mutación se determina examinando una muestra de ácido nucleico.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 en donde la presencia o la ausencia de dicha mutación se determina examinando una muestra de proteína.
10. Un método de cribado de compuestos que inhiben la señalización de una proteína SMO mutante que incorpora una mutación en la posición de aminoácido que corresponde a la posición de aminoácido 281 de la SEQ ID NO: 1, en donde el método comprende poner en contacto dicha SMO mutante con un compuesto de ensayo y detectar la unión de dicho compuesto a dicha SMO mutante, por lo que la unión de dicho compuesto de ensayo a SMO mutante indica que dicho compuesto de ensayo es un inhibidor de SMO mutante.
11. Un método de cribado de compuestos que inhiben la señalización de una proteína SMO mutante que incorpora una mutación en la posición de aminoácido que corresponde a la posición de aminoácido 281 de la SEQ ID NO: 1; en donde el método comprende poner en contacto una célula que expresa dicha SMO mutante con un compuesto de ensayo y detectar la actividad de Gli en dicha célula, por lo que la presencia de actividad de Gli indica que dicho compuesto de ensayo no es un inhibidor de SMO mutante.
12. Una composición para su uso en la inhibición en un sujeto de la proliferación o el crecimiento de una célula que tiene una señalización de hedgehog aberrante, en donde la composición es un inhibidor de bromodominio, en donde dicha célula expresa una proteína smoothed que tiene una mutación en la posición de aminoácido que corresponde a la posición de aminoácido 281 de la SEQ ID NO: 1.
13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la célula comprende adicionalmente una mutación *SUFU*.
14. Un método de identificación de un inhibidor de la vía de hedgehog, en donde el método comprende: poner en contacto una célula con una cantidad de un agente de ensayo, en donde la célula responde a la proteína hedgehog o

5 tiene un aumento en la señalización de hedgehog y/o la activación de la vía de señalización de hedgehog, y en donde la célula expresa la proteína SMO mutante de la reivindicación 3, y b) determinar, en comparación con un control, si el agente de ensayo inhibe la señalización de hedgehog en la célula, en donde si el agente de ensayo inhibe la señalización de hedgehog en la célula con respecto al control, entonces el agente de ensayo se identifica como un inhibidor de la vía de hedgehog.

10 15. Un método de identificación de un inhibidor de la vía de hedgehog, en donde el método comprende: poner en contacto una célula con una cantidad de un agente de ensayo, en donde la célula responde a la proteína hedgehog o tiene un aumento en la señalización de hedgehog y/o la activación de la vía de señalización de hedgehog, y en donde la célula expresa la proteína SMO mutante de la reivindicación 3, y b) determinar, en comparación con un control, si el agente de ensayo inhibe el crecimiento y/o la proliferación de la célula, en donde si el agente de ensayo inhibe el crecimiento y/o la proliferación de la célula con respecto al control, entonces el agente de ensayo se identifica como un inhibidor de la vía de hedgehog.

FIG. 1A

SEQ ID NO: 1 (WT SMO)

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

FIG. 1B

SEQ ID NO: 2 (mutación en la posición de aa 281 de SMO)

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

FIG. 1C

SEQ ID NO: 3 (mutación en la posición de aa 459 de SMO)

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

FIG. 1D

SEQ ID NO: 4 (mutación en la posición de aa 535)

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

FIG. 1E

SEQ ID NO: 5 (WT 3MO)

```

atggccgctg cccgccagc gggggggcgg gagctccgc tccctggggt 50
gctgctgctg ctgctgctgg gggaccggg ccgggggggg gcctcgagcg 100
ggaacgcgac cgggocctgg cctcgggagc cgggcgggag cgcgaggagg 150
agcgcggcgg tgactggccc tcggccgccc ctgagccact ggggcggggc 200
tgccccctgc gagccgctgc gctacaaogr gngcctgggc tgggtgctgc 250
cctaocggggc cacctccaca ctgctggcgg gagactogga ctcccaggag 300
gaagcgcacg gcaagctcqi gctctggtcg ggccctccga atgcccccg 350
ctgctgggca gtyatccagc cctgctgtg tgccgtatac atgcccaggt 400
gtgagaatga cgggtgyag ctgcccagcc gtaccctctg ccaggccacc 450
cgaggccccc gtgccatcgt ggagaggag cggggtctgc ctgacttcc 500
ggctgcact cctgaccgct tccctgaagg ctgcaogaat gagggtgcga 550
acatcaagtt caacagttca ggcagtgcg aagtgccttt ggttcggaca 600
gacaaccccc agagctggtc cgaggacqhg gagggtctgg gcatccagtg 650
ccagaacccc ctcttcacag aggtgagca ccaggacatg cacagctaca 700
tcggggcctt cggggccgic acgggcccct gcacgctctt caccctggcc 750
acattcgtgg ctgactggcg gaaactgaat cgtaccctg ctgttattct 800
ctctacgic aatgctgct tctttgtgg cagcattggc tggctggccc 850
agttcatgga tggtgcccgc cgagagatcg tetgcccgc agatggcacc 900
atgaggttgy gggagcccac ctccaatgag actctgtcct gcgtcctcat 950
ctttgtcacc gttactacg cctgatggc tgggtggtt tggtttggg 1000
tcctaccta tgctygcac acttccctca aagccctggg caccacctac 1050
cagcctctct cgggcaagac ctctacttc caccctgctc cctggctact 1100
cccctttgtc ctcaactgtg caatccttgc tgtggcycag gttgatggg 1150
actctgtgag tggcatttgt tttgtgggt acaagaacta ccgataccgt 1200
gggggcttcg tgctggcccc aatgggctg gtgctcctcg tgggagcta 1250
ctctctcctc cgaggagtaa tgactctgtt ctccatcaag agcaaccacc 1300
ccgggctgct gagtgagaag gctgccagca agatcaacga gaccatgctg 1350
cgcctgggca ttttggctt cctggccttt ggctttgtgc tcattacct 1400
cagctgccac ttctacgac tctcaacca ggctgagtg gagegcagct 1450
tcgggacta tgtgctatgt cagggcaaty tgaccatcg gctggcccac 1500
aagcagcccc tccctgactg tgagatcaag aatcgcccga gccttctggt 1550
ggagaagatc aacctgtttg ccatgtttgg aactggcacc gccatgagca 1600
cctgggtctg gaccaaggcc acgtgctca tctggaggcg taccgggtgc 1650
aggttgactg ggcagagtga cgtgagcca aagoggatca agaagagca 1700
gatgatggc aaggccttct ctaagcggca cgagctctg cagaaccag 1750
gccaggagct gtcctcagc atgcacactg tgtcccacga cgggcccgtg 1800
ggggccttgg cctttgacct caatgagccc tcagctgatg tctccctgc 1850
ctgggcccag catgbcacca agatggtggc tcggagagga gccatactgc 1900
cccaggatat ttctgtcacc cctgtggcaa ctccagtycc cccagaggaa 1950
caagccaacc tgtgctggt tgaggcagag atctcccag agctgcagaa 2000
ggcctgggc cggagaagya agaggaggaa gaggaagaag gagggtgtycc 2050
cgtgggccc gcccctgag cttaaccccc ctgcccctgc cccagttacc 2100
atctctcgac tgcctcagct gccccggcag aatgcccgg tggctgcag 2150
tgccctggga gctgggact cttgccgaca gggagcgtgg accctggct 2200
ccaaccatt ctgcccagag cccagtcccc ctcaggatcc atttctgccc 2250
agtgaacggg ccccgtggc atgggctcat ggcgcggac agggcctgg 2300
gcctattcac tcccgsacca acctgatgga cacagaactc atggatycag 2350
actcggactt ctga 2364

```

FIG. 1F

SEQ ID NO: 6 – (mutación en la posición de aa 408 de SMO)

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

FIG. 1G

SEQ ID NO: 7 – (mutación en la posición de aa 533 de SMO)

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

Expresión de GLI1

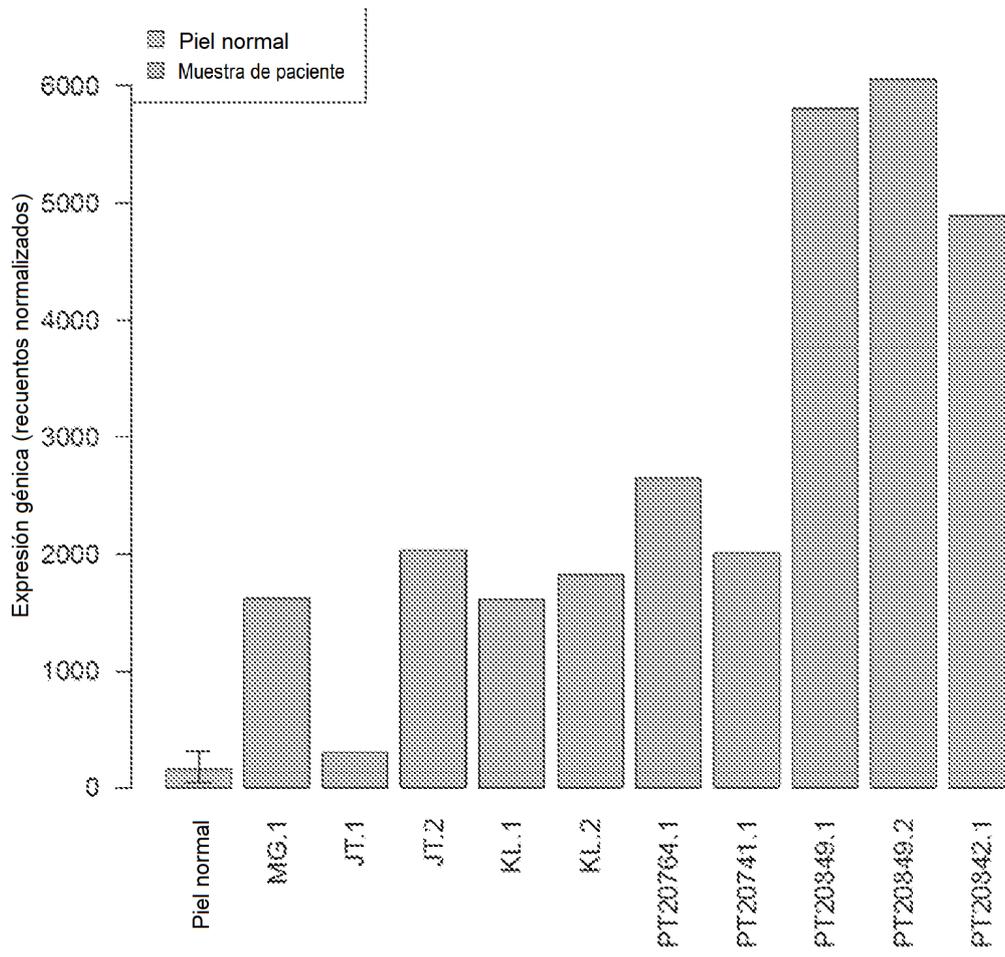
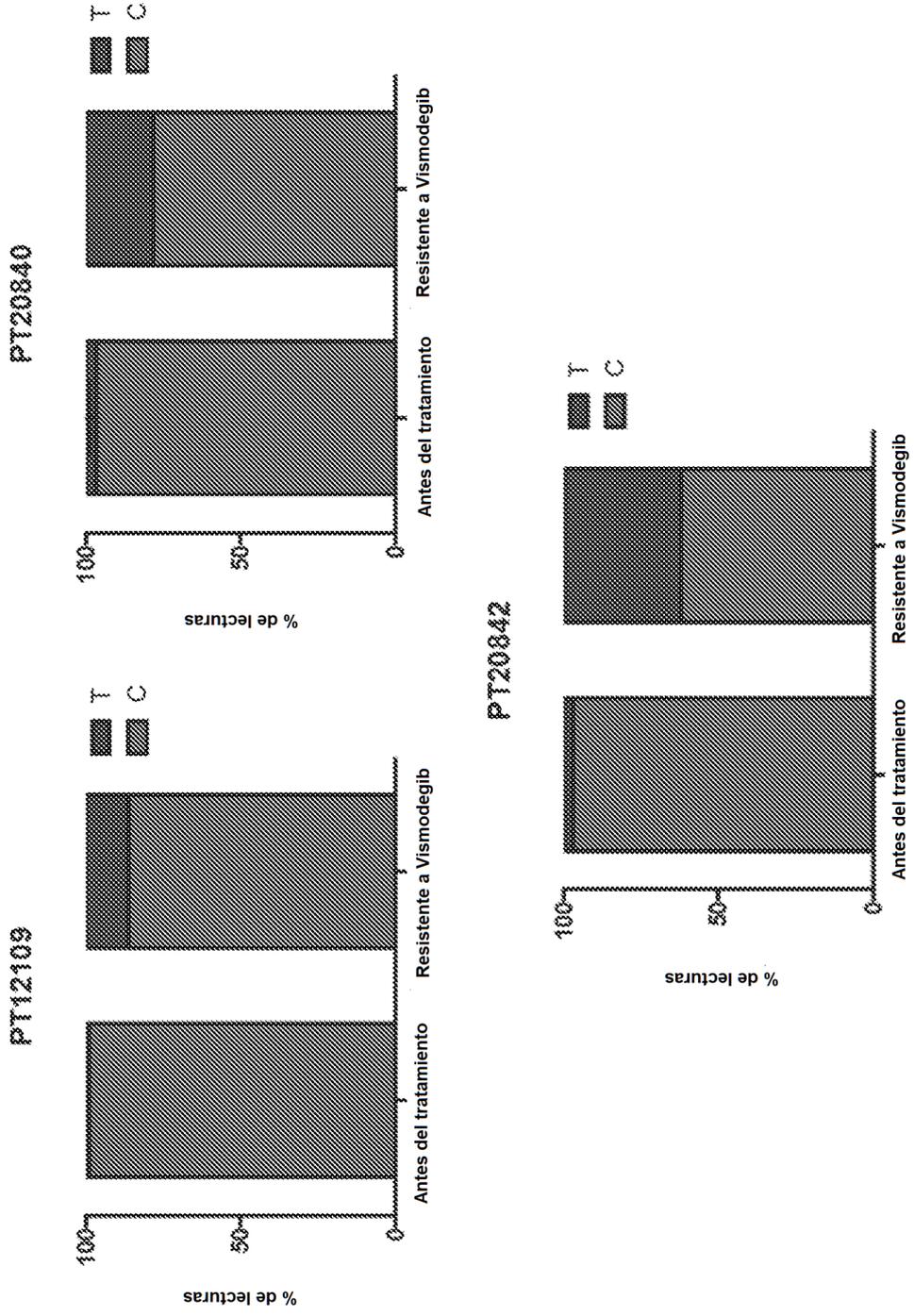


FIG. 2

FIG. 3



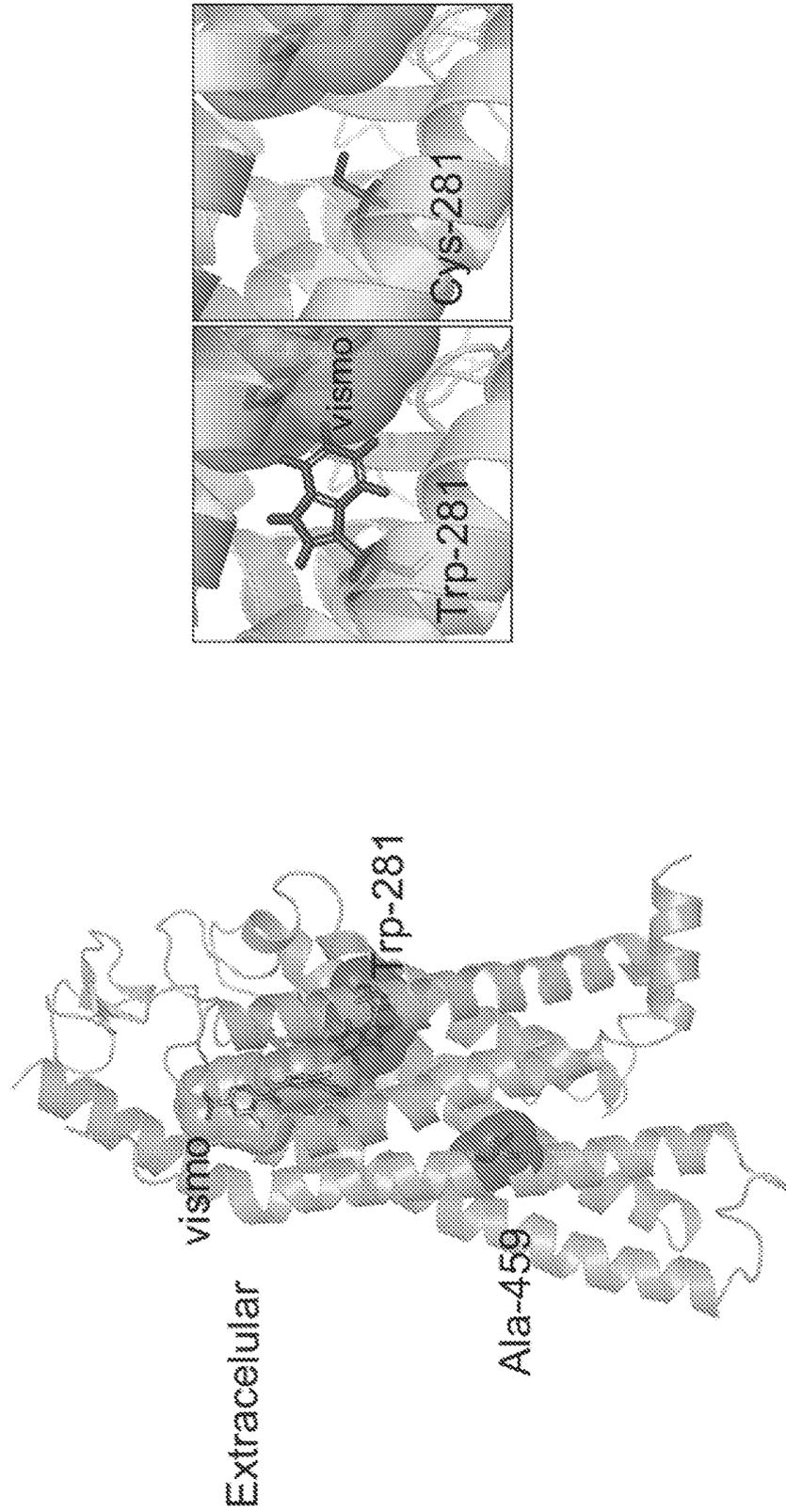
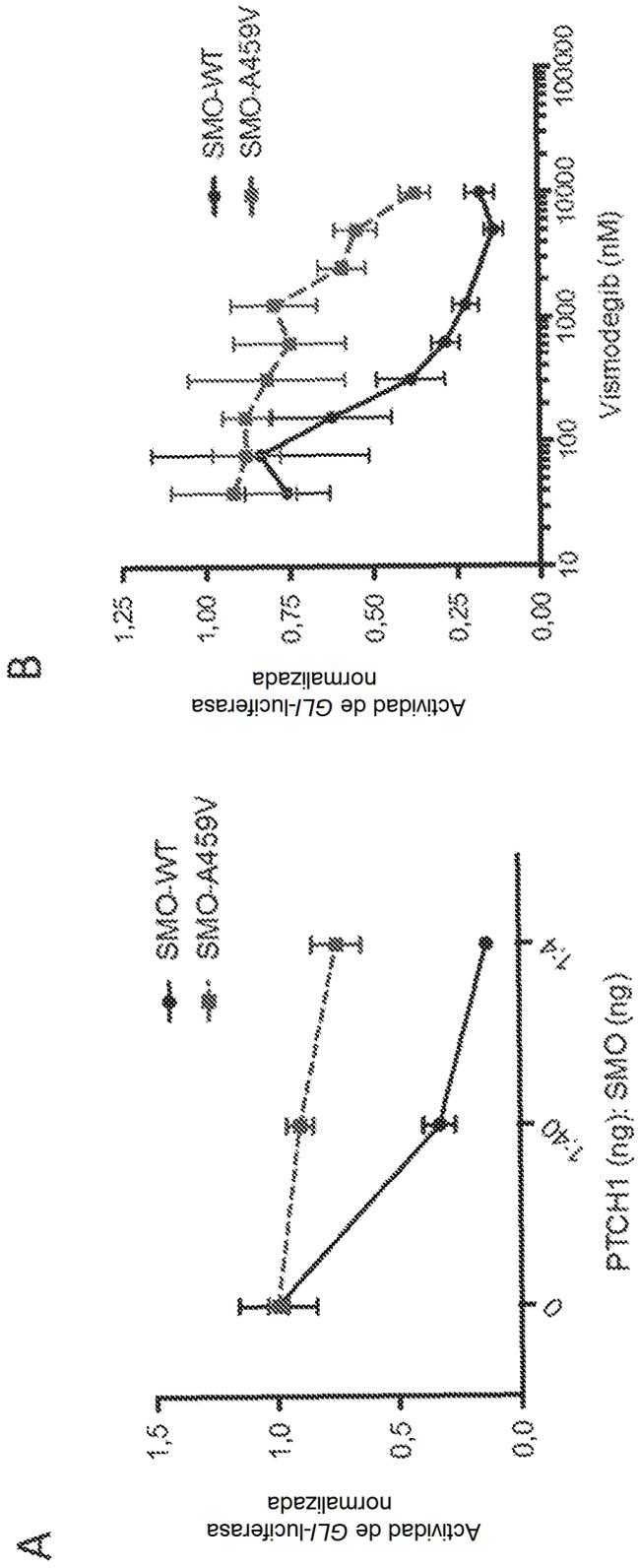


FIG. 4

FIG. 5



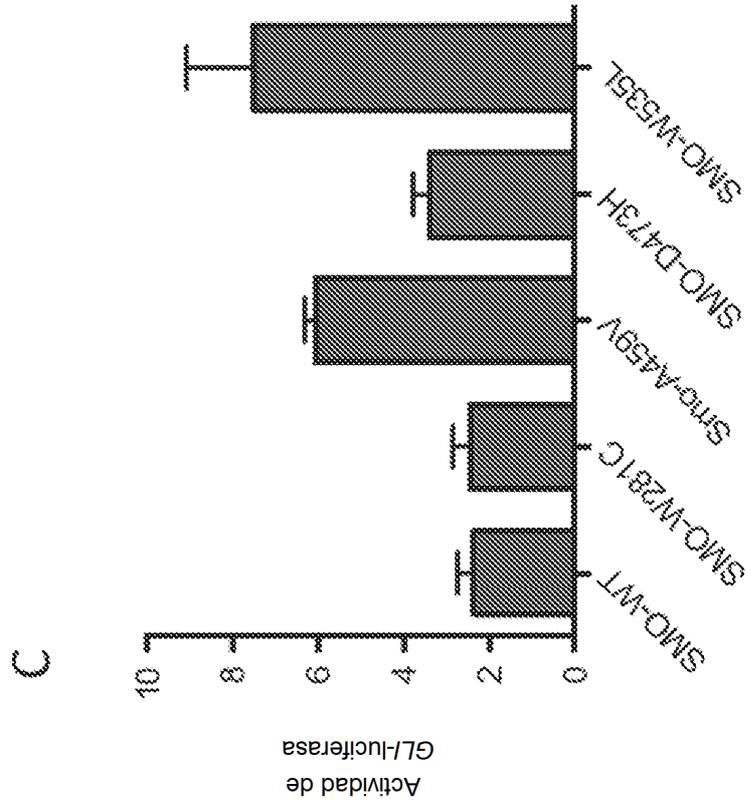
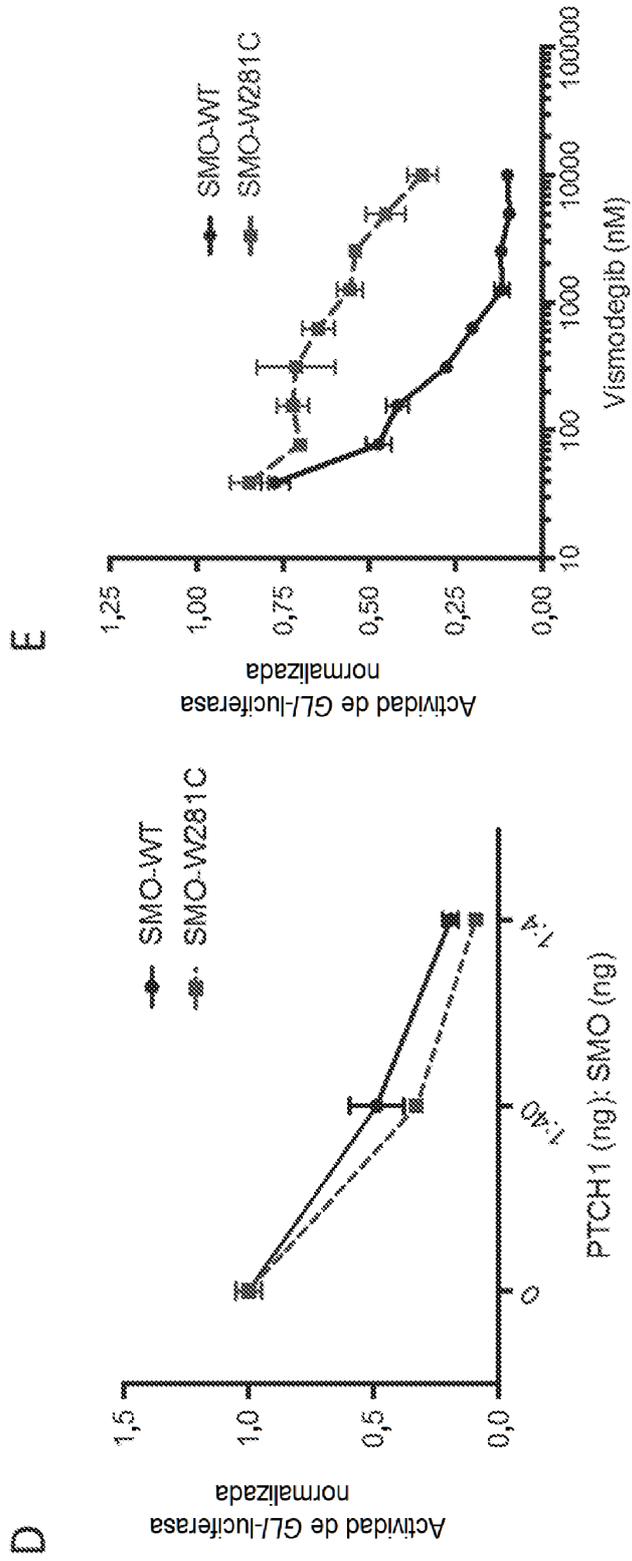


FIG. 5

FIG. 5



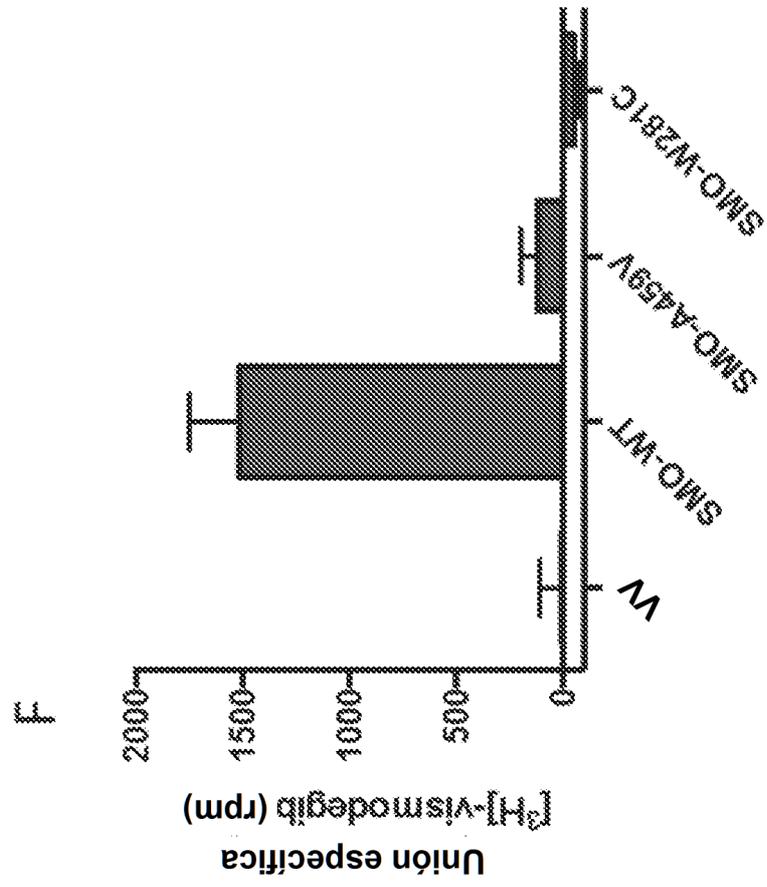


FIG. 5

FIG. 6

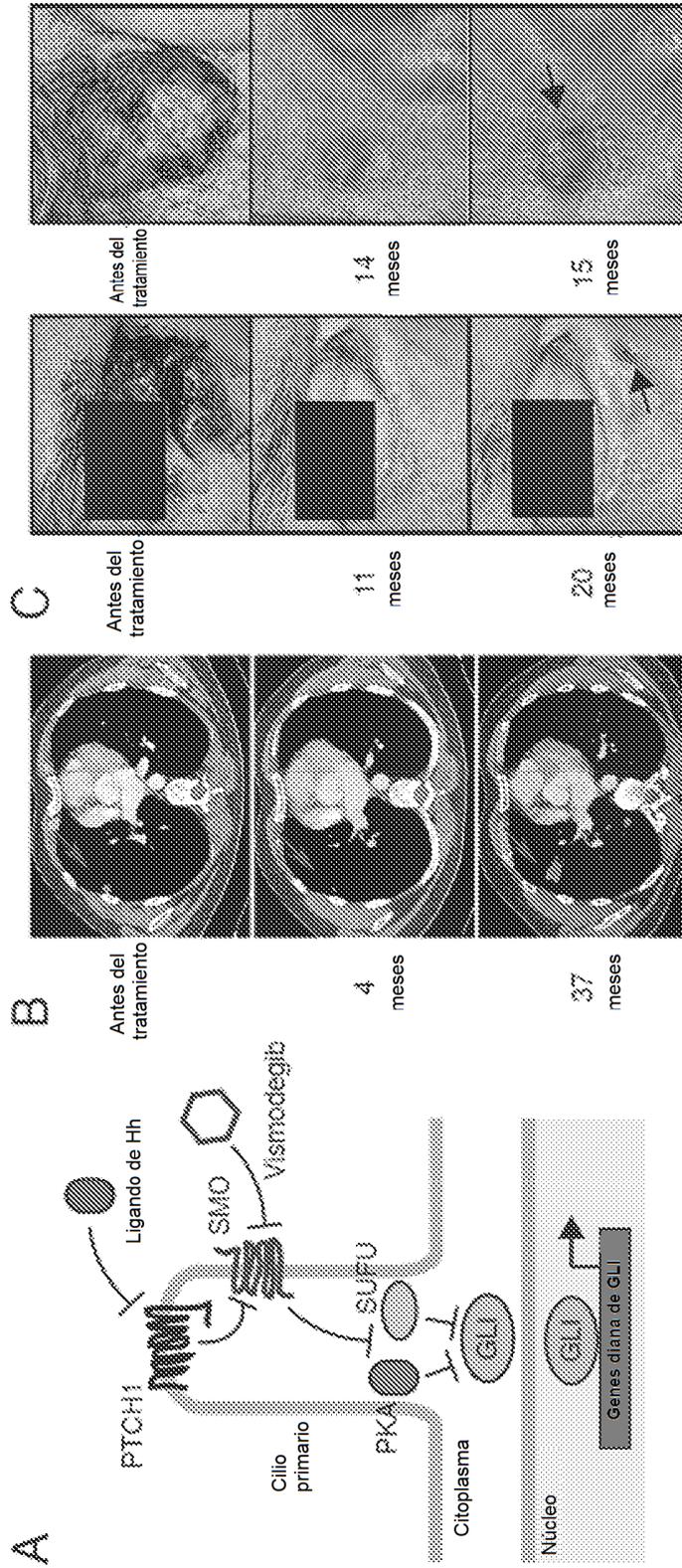
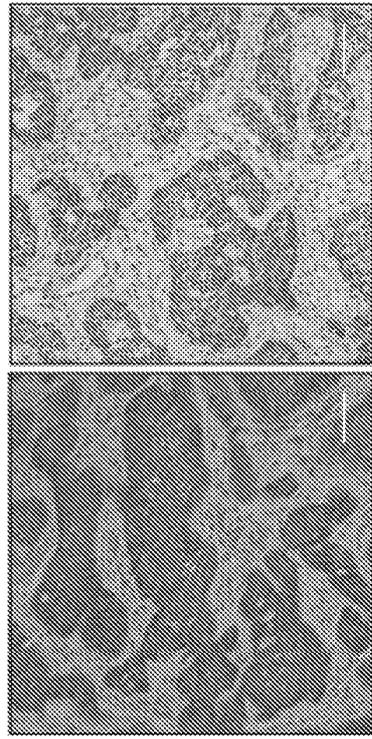
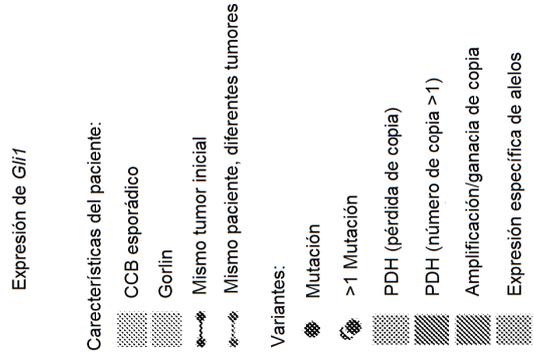
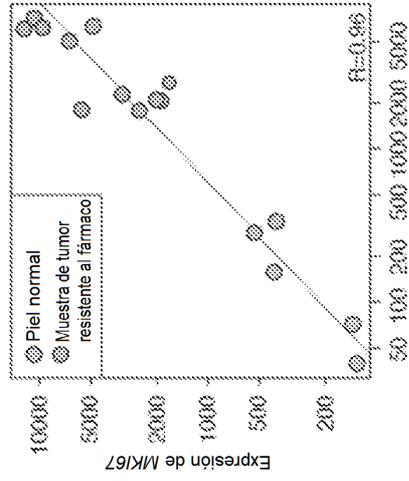


FIG. 6 D



E



F

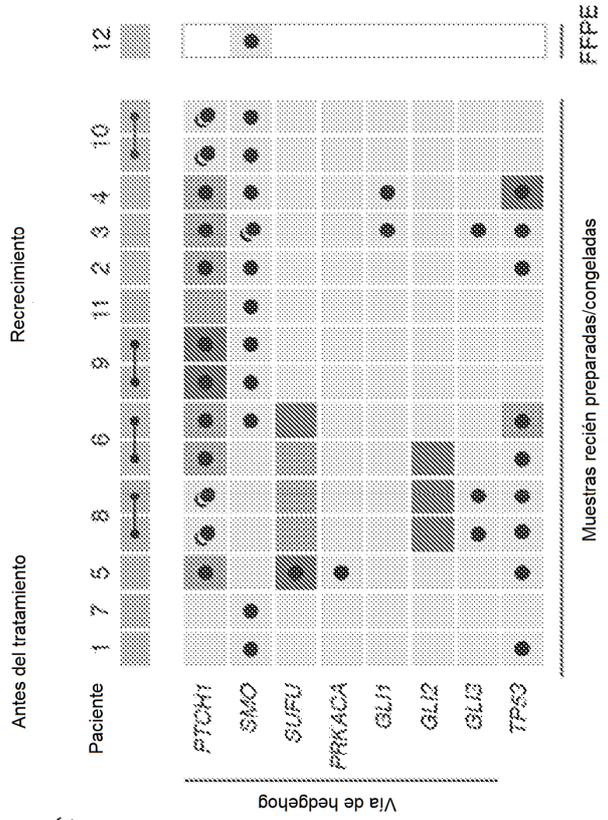


FIG. 7

Paciente:	29	33	38	47	Referencias:
SMO-A239V	●				Este estudio
SMO-S278I			●		(Kool et al, 2014)
SMO-L412F		●			(Braslanos et al, 2013, Sweeney et al, 2014)
SMO-W535L				●	(Xie et al, 1998)

FIG. 8

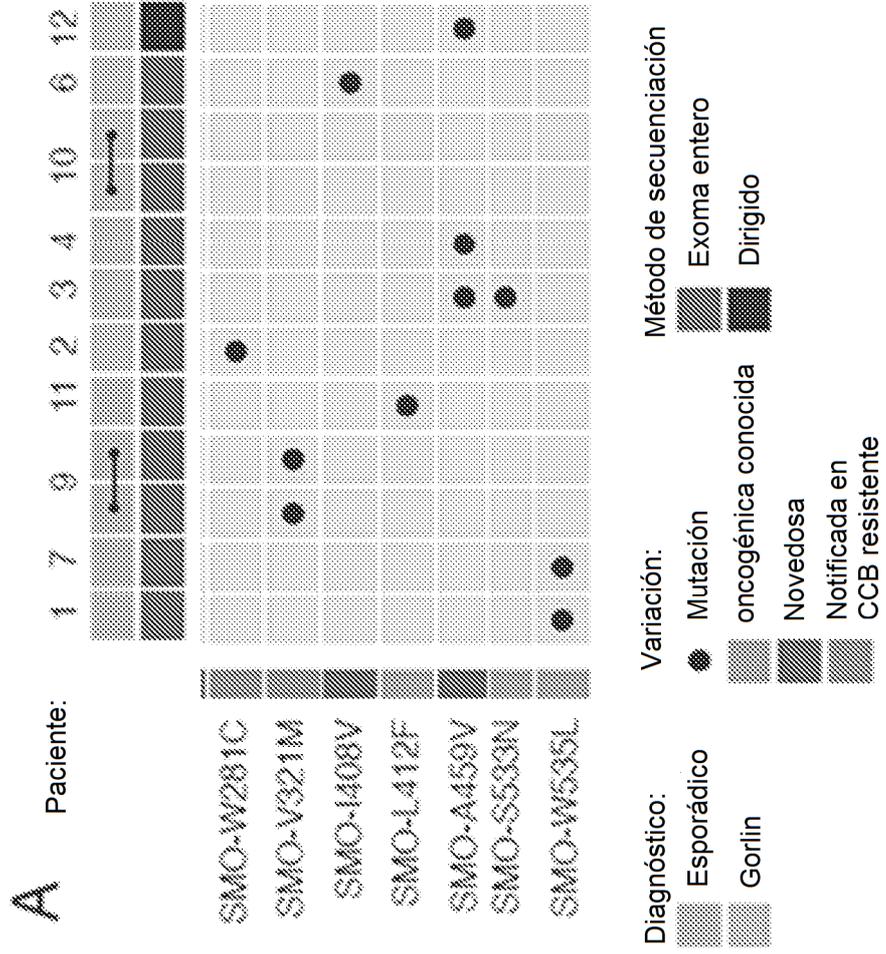


FIG. 8

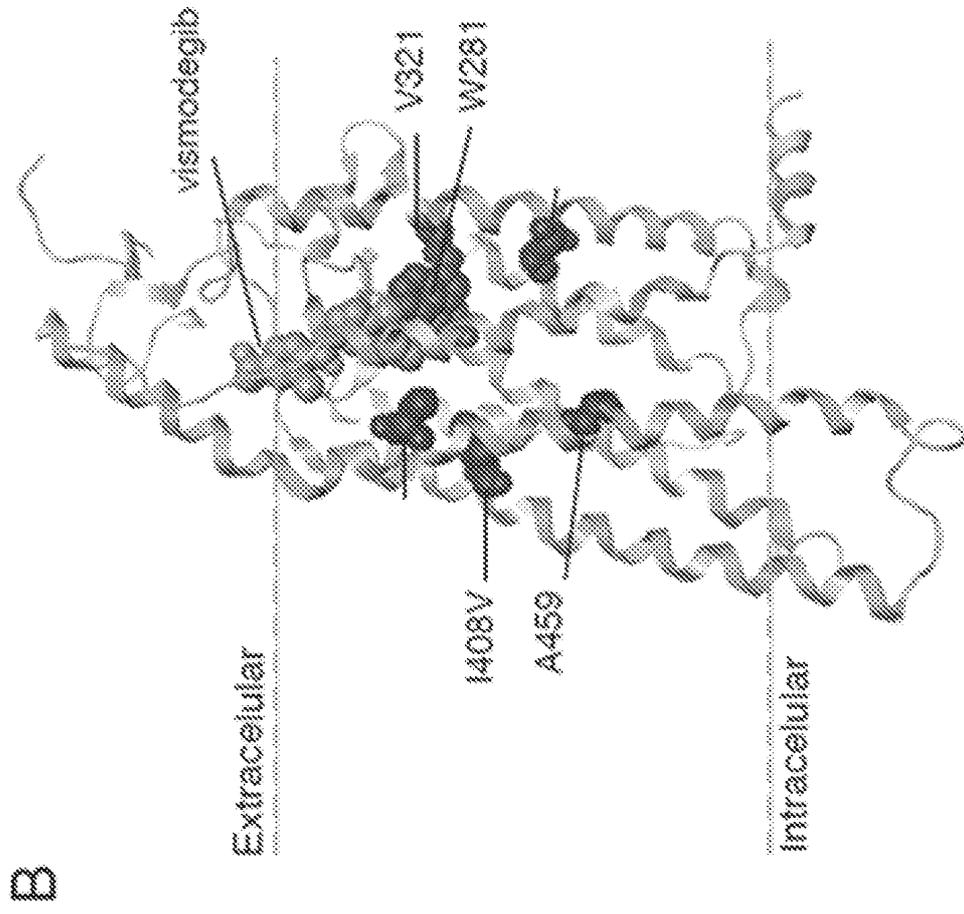


FIG. 8

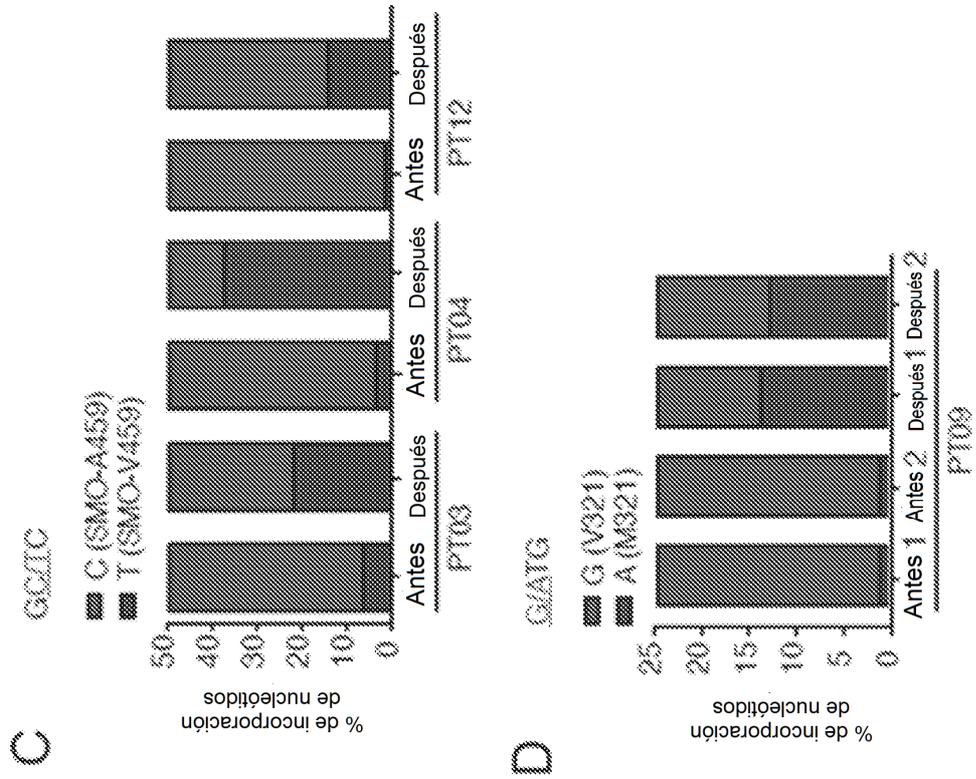


FIG. 8

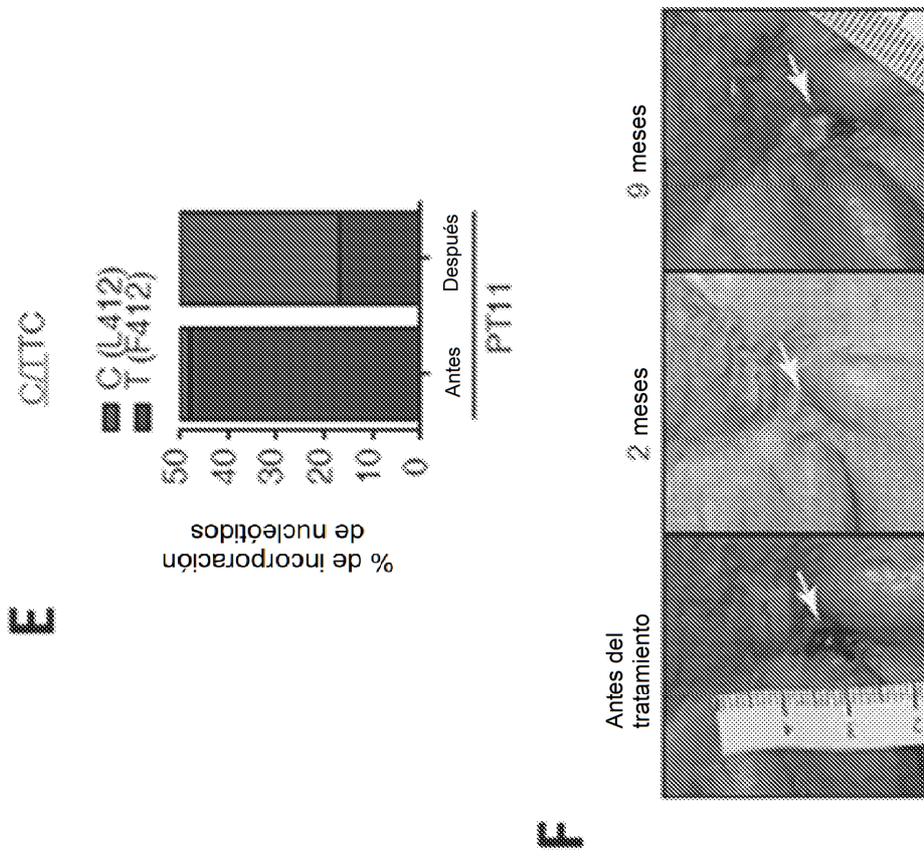


FIG. 9

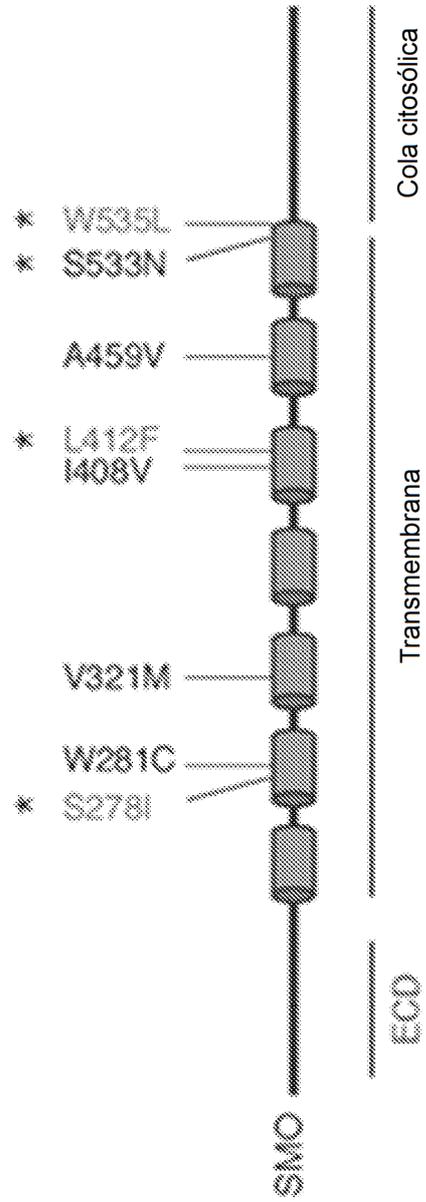


FIG. 10

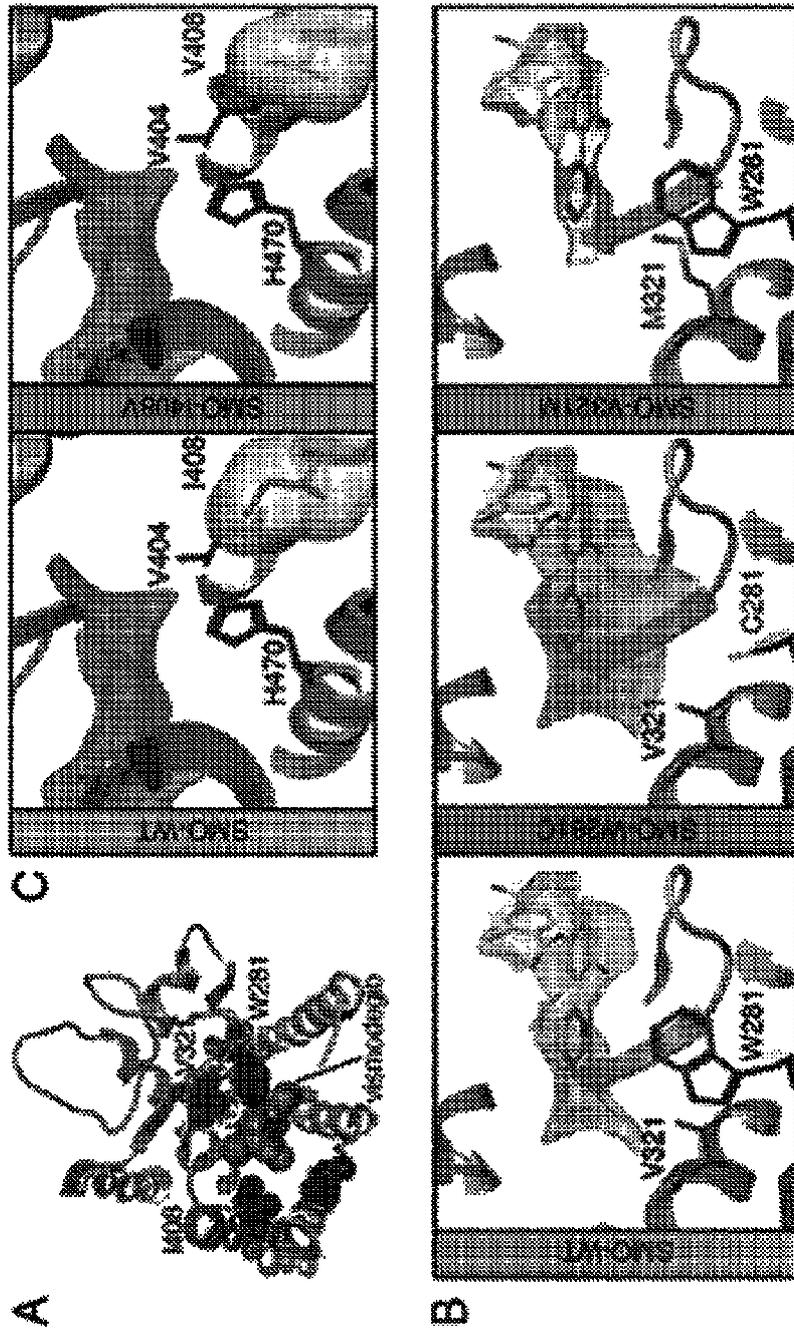


FIG. 11

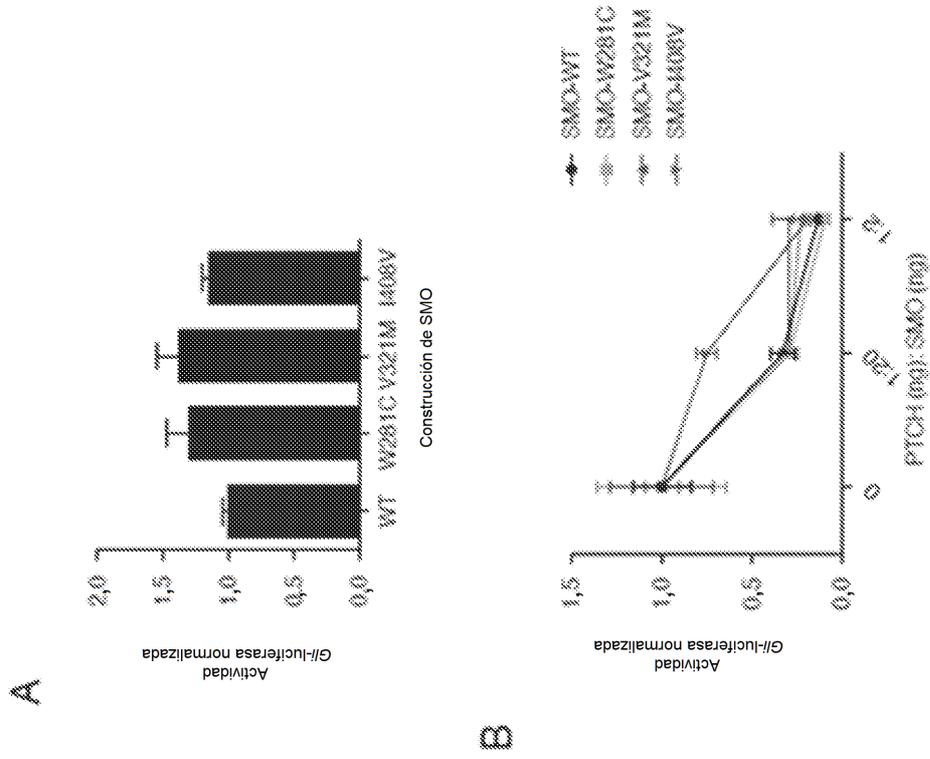
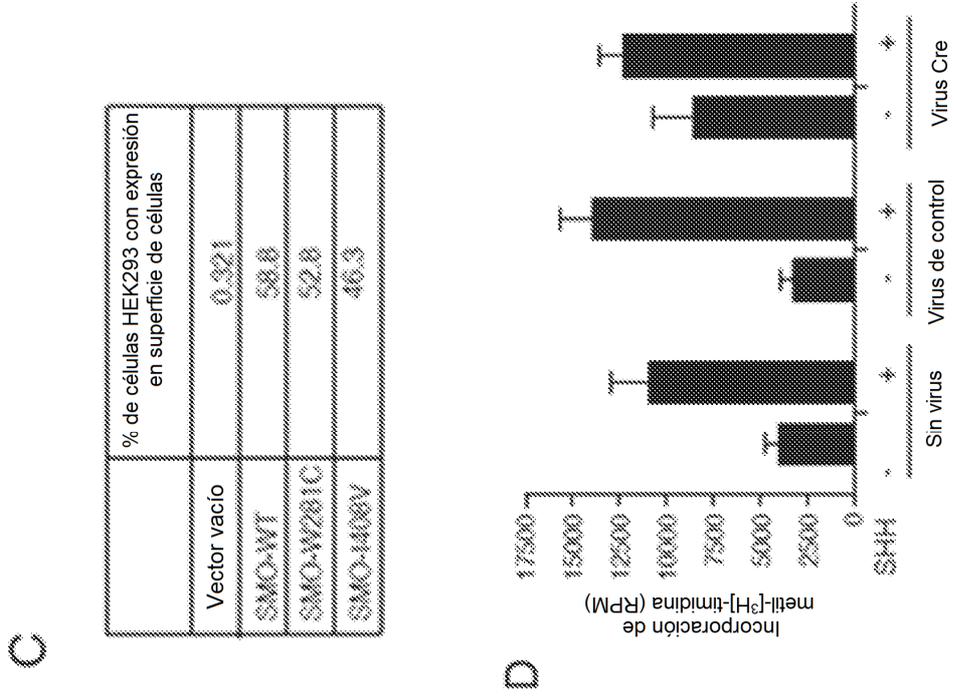


FIG. 11



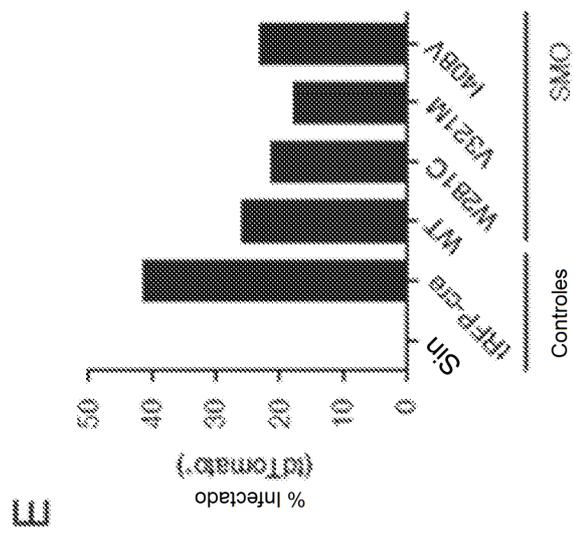
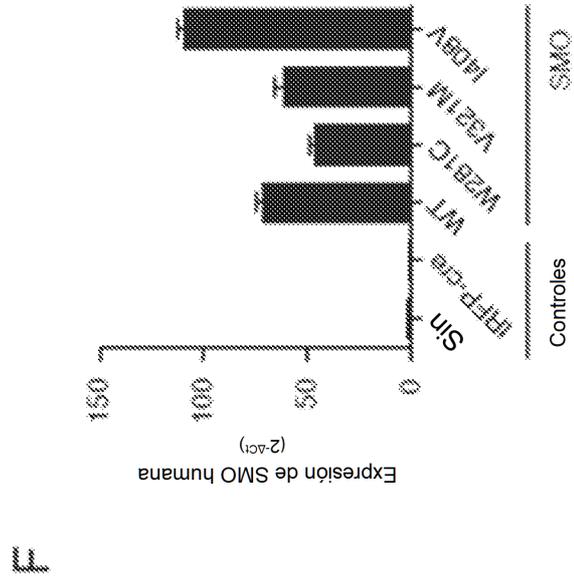


FIG. 11

FIG. 12

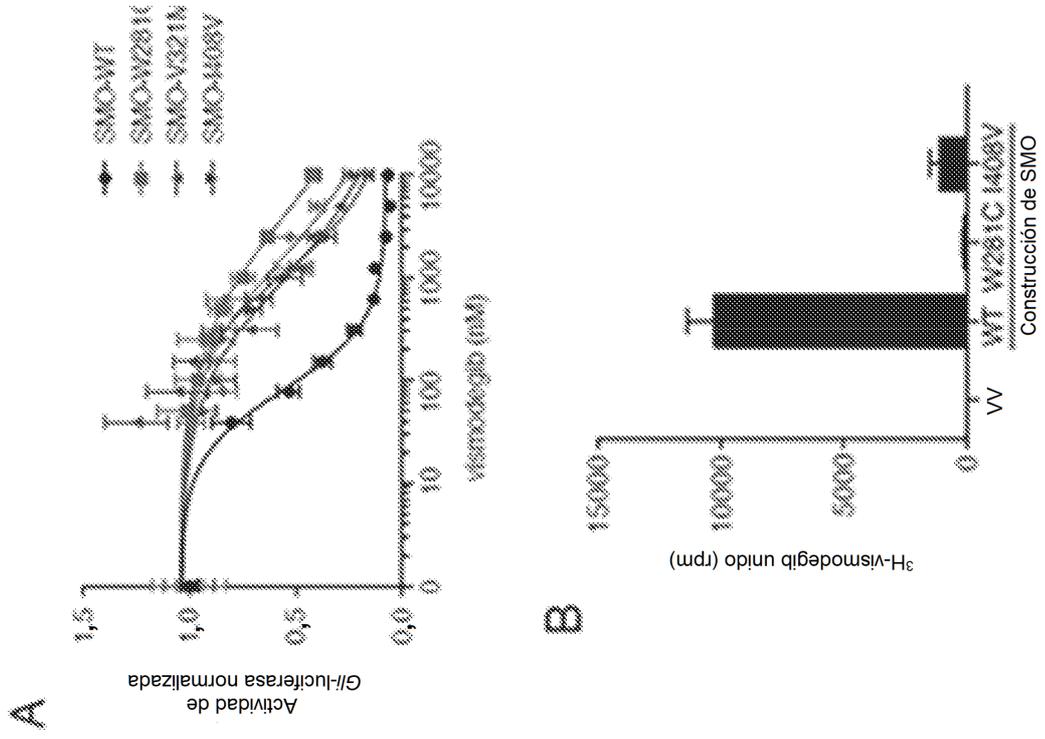


FIG. 12

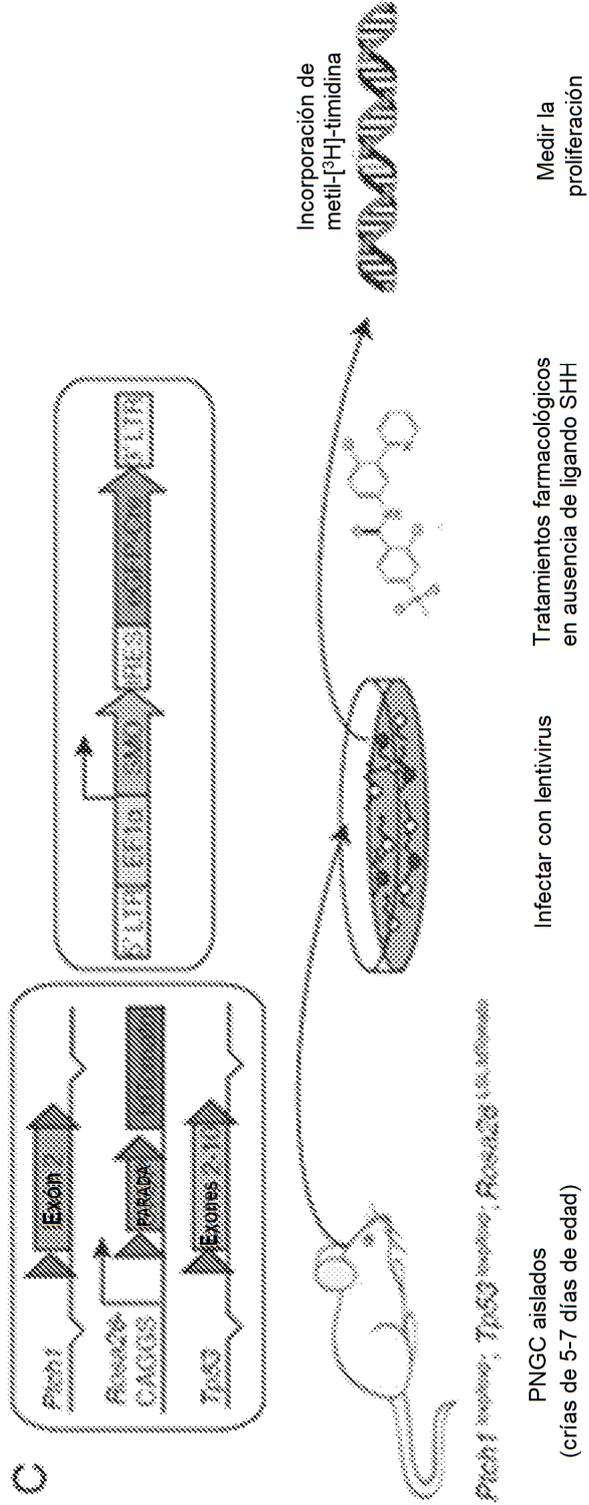


FIG. 12

D

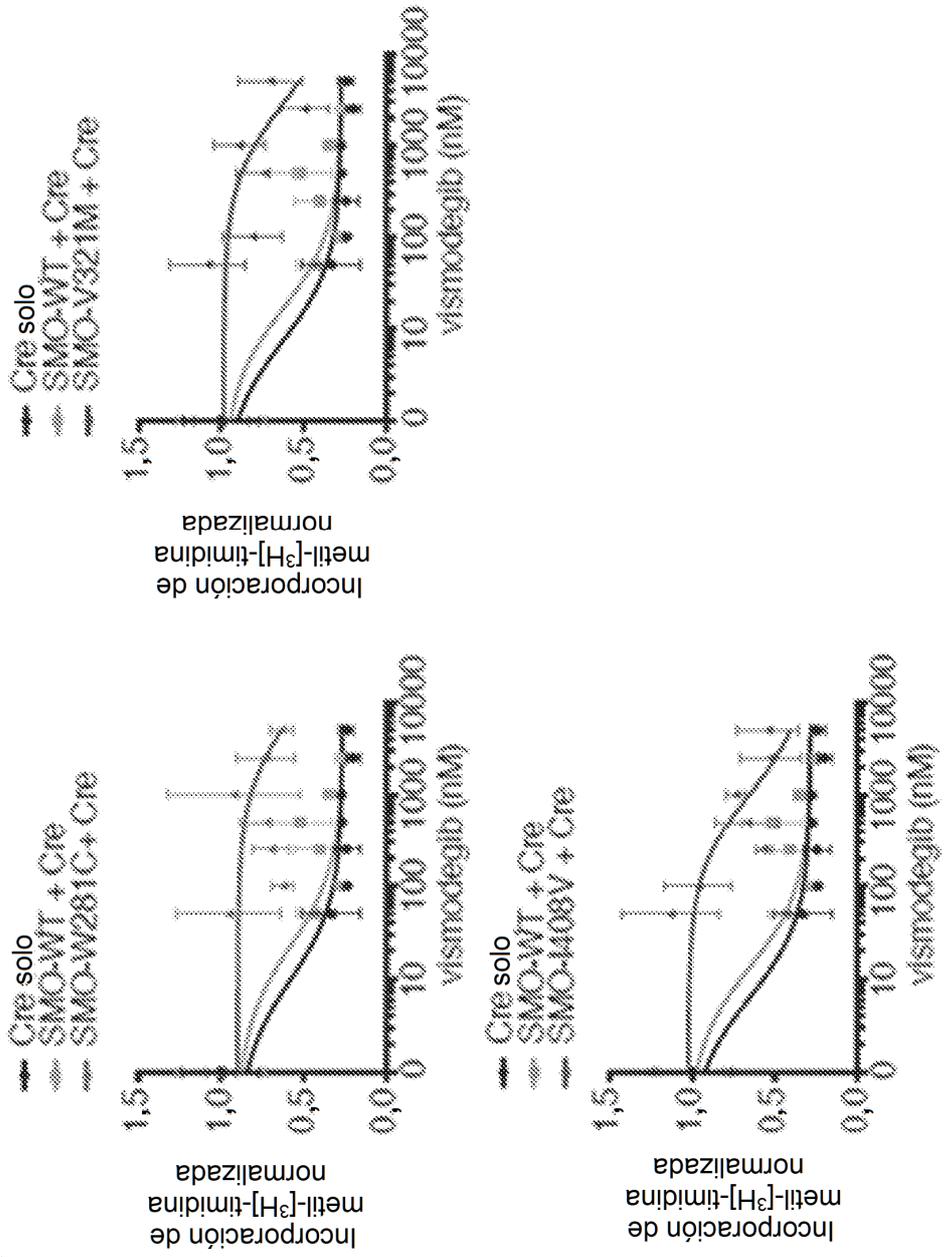


FIG. 13

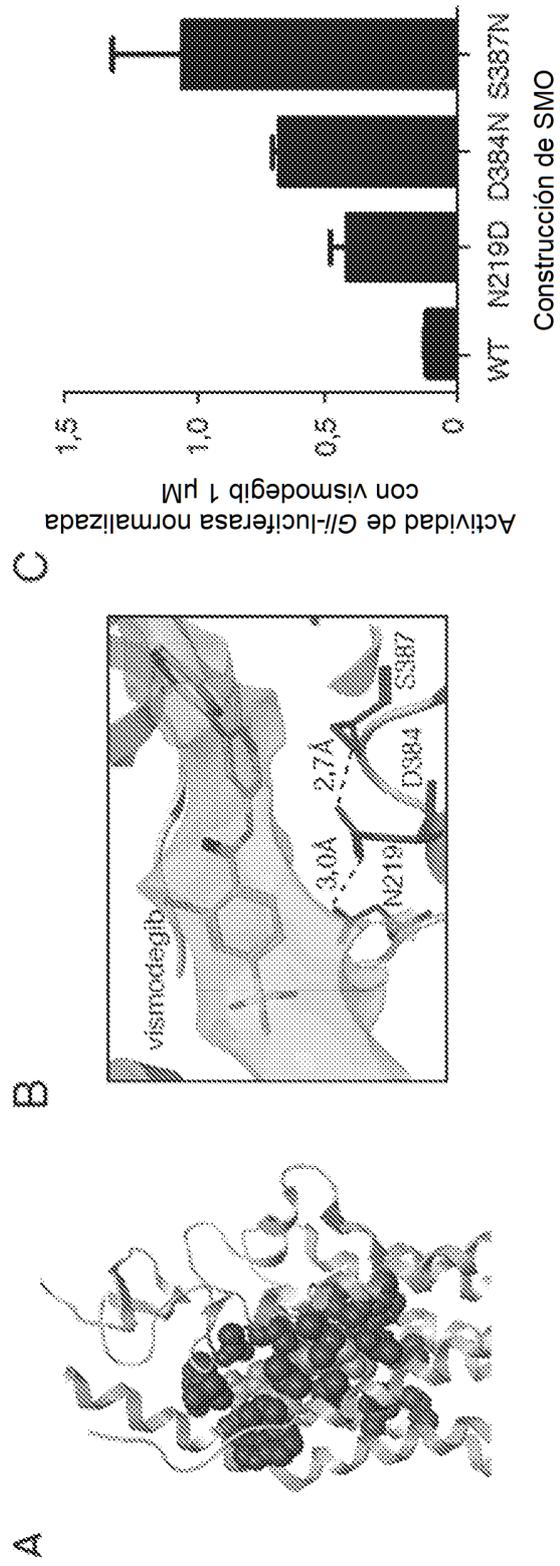


FIG. 14

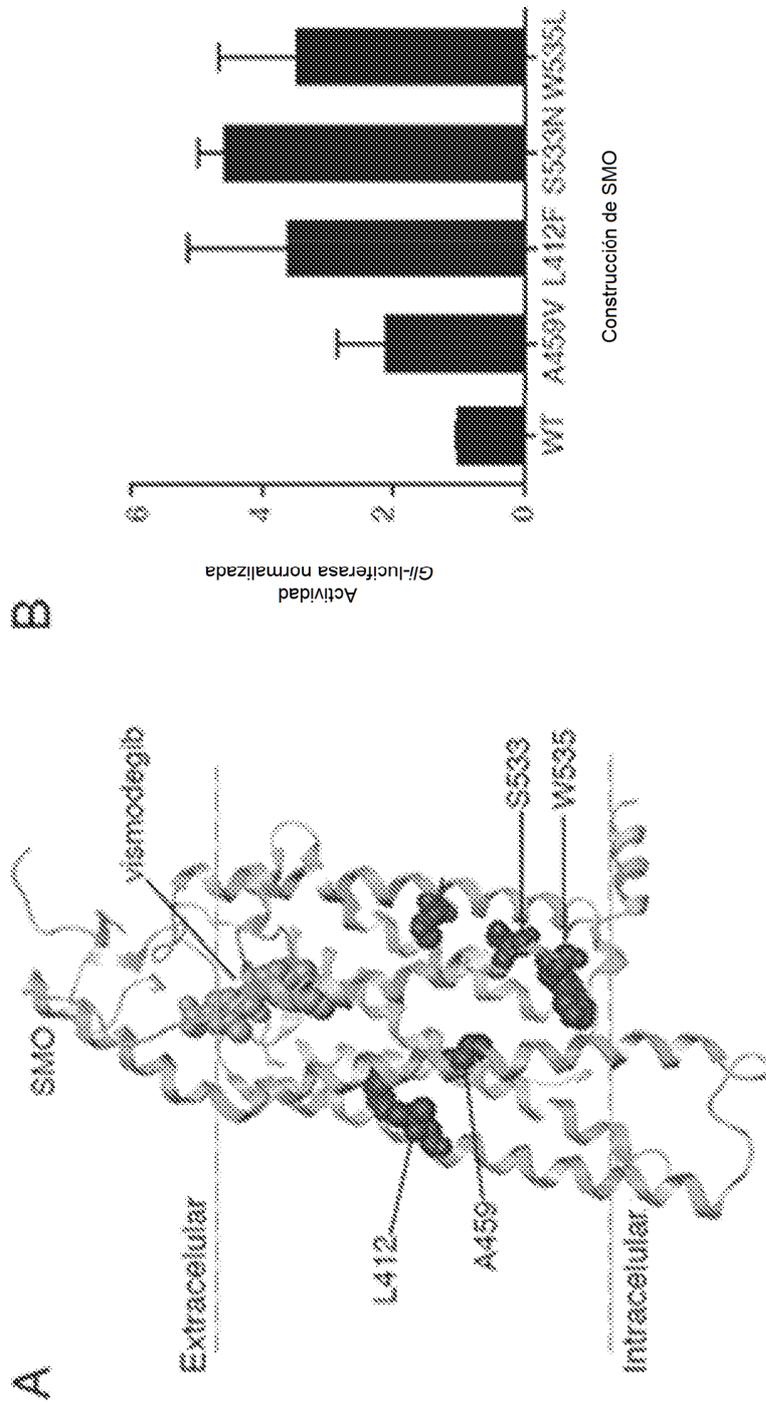


FIG. 15

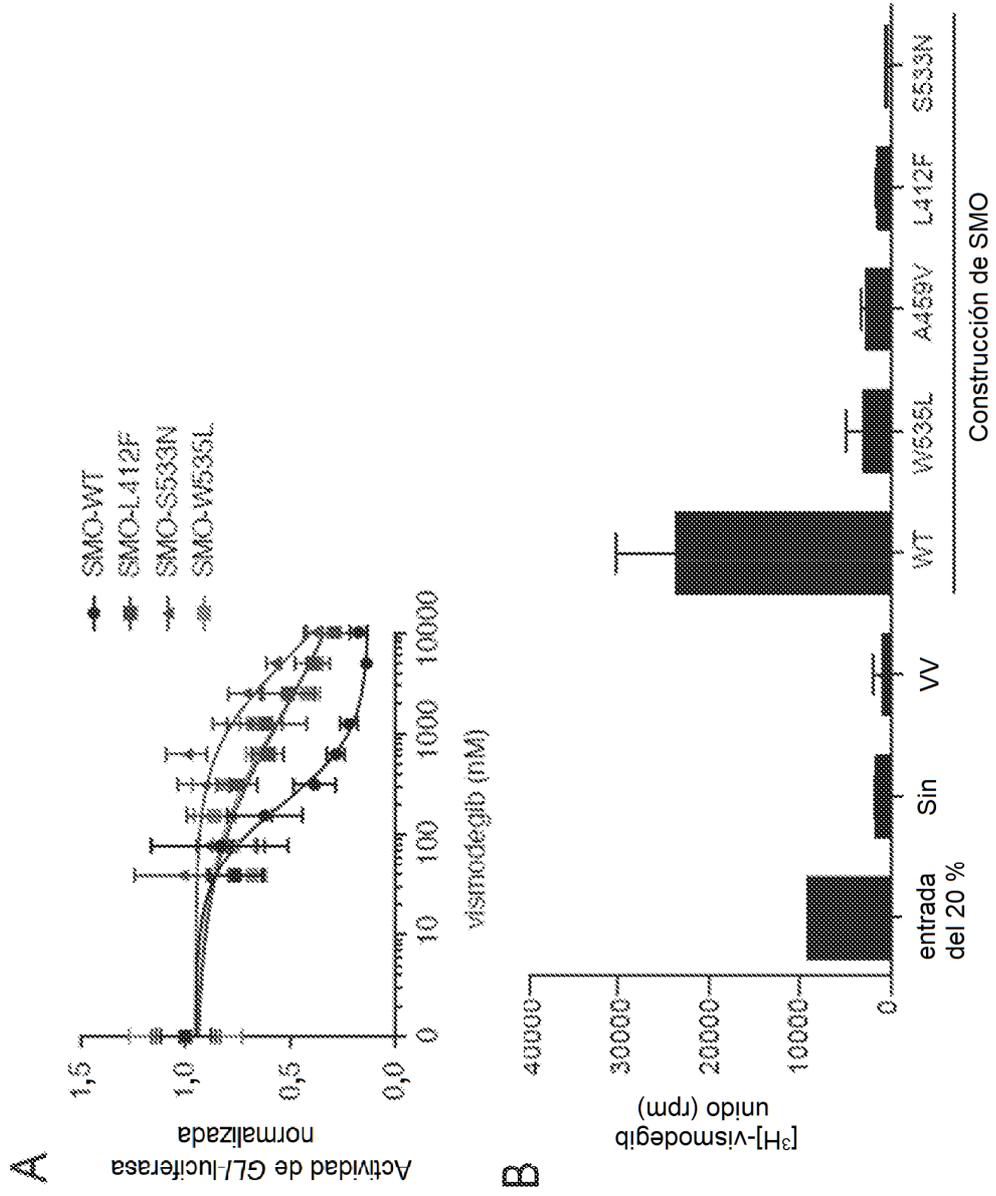


FIG. 15

C

	% de células HEK293 con expresión en superficie celular
Vector vacío	0,321
SMO-WT	58,8
SMO-A459V	60,8
SMO-S539N	61,7
SMO-W535L	54,1

FIG. 15

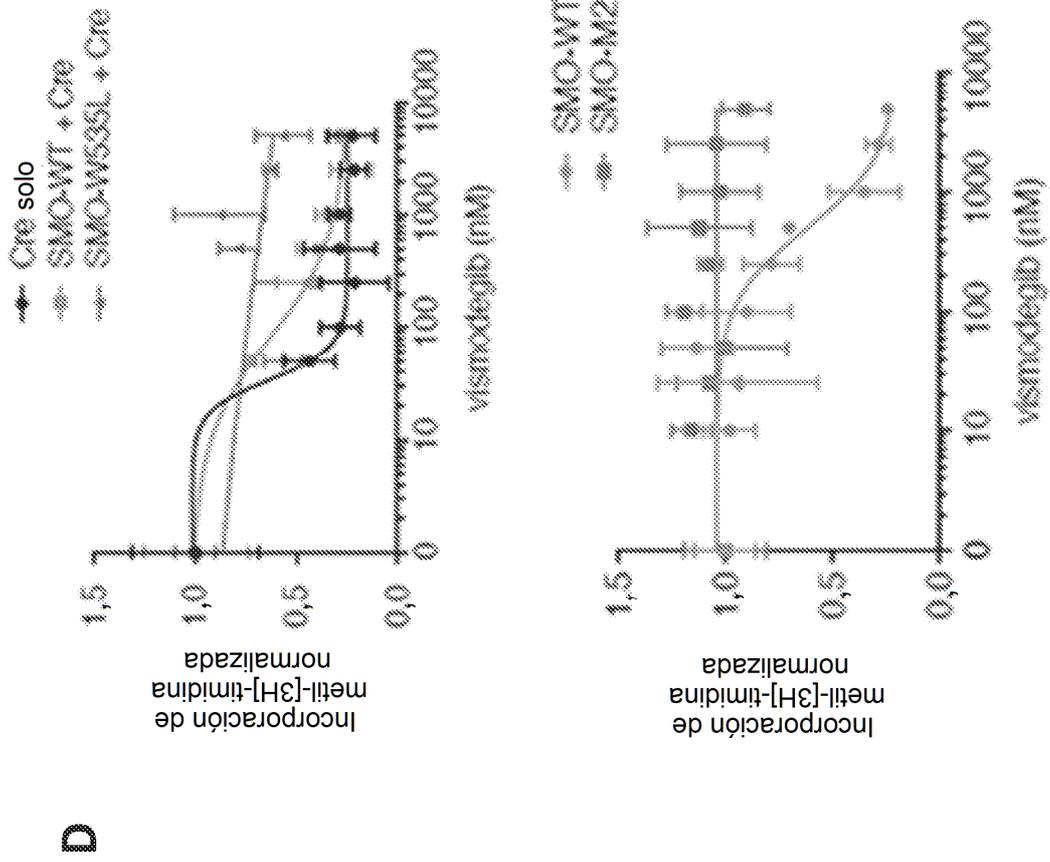


FIG. 16

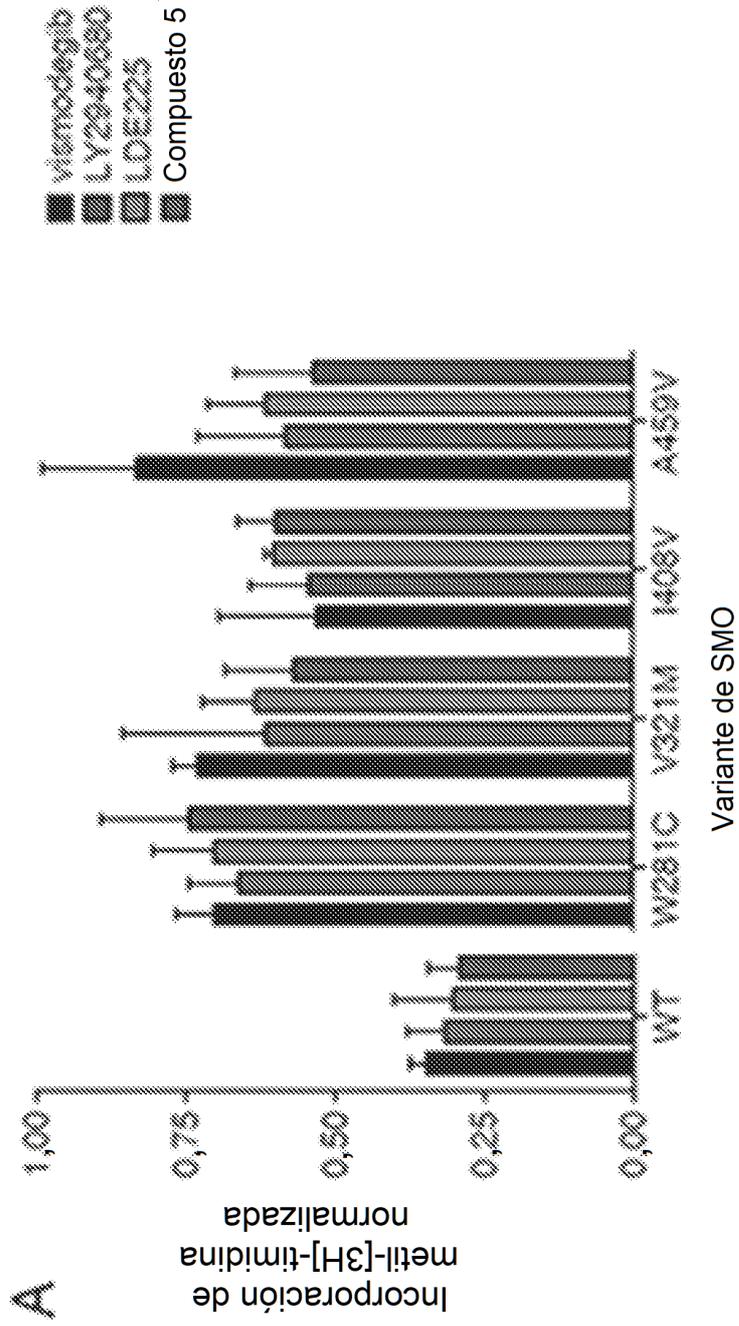


FIG. 16

