

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 885**

51 Int. Cl.:
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06850419 .0**
96 Fecha de presentación: **13.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1978973**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.10.2008**

54 Título: **Uso de antagonistas de hedgehog cinasa para inhibir la señalización de hedgehog y para tratar cáncer**

30 Prioridad:
27.12.2005 US 754514 P
27.12.2005 US 754464 P
27.12.2005 US 754516 P
27.12.2005 US 754557 P
21.02.2006 US 775525 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.04.2012

73 Titular/es:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US y
CURIS, INC.

72 Inventor/es:
DE SAUVAGE, Frederic J. y
EVANGELISTA, Marie

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 377 885 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

Uso de antagonistas de hedgehog cinasa para inhibir la señalización de hedgehog y para tratar cáncer

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al nuevo uso de las cinasas hedgehog CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK y antagonistas contra ellas para regular la señalización de hedgehog, y a su uso terapéutico en diversas patologías o trastornos fisiológicos que están mediados, en parte, por o que resultan de ellas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Los miembros de la familia *hedgehog* de moléculas señalizadoras median muchos procesos de formación del patrón de corto y largo alcance durante el desarrollo embrionario, fetal y de adulto de los invertebrados y de los vertebrados. En *Drosophila melanogaster*, un único gen hedgehog regula la formación del patrón de los discos segmentales e imaginales. Por el contrario, en vertebrados, una familia de genes hedgehog está implicada en el control de la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia de células y tejidos derivados de las tres capas germinales, incluyendo, *por ejemplo*, asimetría izquierda-derecha, desarrollo del SNC, formación del patrón de somitos y extremidades, condrogénesis, esqueletogénesis y espermogénesis.

15 La familia de genes hedgehog de vertebrados incluye al menos cuatro miembros o parálogos del único gen hedgehog de *Drosophila* (documentos WO 95/18856 y WO 96/17924). Tres de estos miembros, conocidos como Desert hedgehog (*Dhh*), Sonic hedgehog (*Shh*) e Indian hedgehog (*Ihh*), existen aparentemente en todos los vertebrados, incluyendo peces, pájaros y mamíferos. *Dhh* se expresa principalmente en los testículos, tanto en el desarrollo embrionario del ratón como en el roedor y ser humano adultos; *Ihh* está implicado en el desarrollo óseo durante la embriogénesis, y en la formación ósea en el adulto; y *Shh* está implicado en múltiples tipos celulares embrionarios y adultos derivados de los tres linajes. *Shh* se expresa en niveles elevados en el notocordio y placa ventral mesencefálica de embriones de vertebrados en desarrollo, y dirige el destino celular en la extremidad en desarrollo, somitos y tubo neural. Los ensayos con explantes *in vitro*, así como la expresión ectópica de *Shh* en animales transgénicos, muestran que *Shh* desempeña un papel clave en la formación del patrón del tubo neural, Echelard et al., (1993), Cell 75: 1417-30 (1993); Ericson et al., Cell 81: 747-56 (1995); Marti et al., Nature 375: 322-25 (1995); Hynes et al., Neuron 19: 15-26 (1997).

20 La señalización de hedgehog también desempeña un papel en el desarrollo de extremidades (Krauss et al., Cell 75: 1431-44 (1993); Laufer et al., Cell 79: 1165-73 (1994); somitos (Fan y Tessier-Lavigne, Cell 79: 1175-86 (1994); Johnson et al., Cell 79: 1165-73 (1994), pulmones (Bellusci et al., Devel. 124: 53-63 (1997) y piel (Oro et al., Science 276: 817-21 (1997). Igualmente *Ihh* y *Dhh* están implicados en el desarrollo de hueso, intestino y células germinales (Apelqvist et al., Curr. Biol. 7: 801-804 (1997); Bellusci et al., Dev. Supl. 124: 53-63 (1997); Bitgood et al., Curr. Biol. 6: 298-304 (1996); Roberts et al., Development 121: 3163-74 (1995). Específicamente, *Ihh* se ha visto implicado en el desarrollo de condrocitos (Vortkamp et al., Science 273: 613-22 (1996)), mientras que *Dhh* desempeña un papel clave en el desarrollo de los testículos.

25 La señalización de hedgehog se produce a través de la interacción de la proteína hedgehog (*por ejemplo*, en mamíferos, *Shh*, *Dhh*, *Ihh*, colectivamente "*Hh*") con el receptor de hedgehog, Patched (*Ptch*), y el correceptor Smoothened (*Smo*). Hay dos homólogos de mamíferos de *Ptch*, *Ptch-1* y *Ptch-2* (colectivamente "*Ptch*"), los cuales son proteínas transmembránicas que cruzan 12 veces un dominio detector de esterol (Motoyama et al., Nature Genetics 18: 104-106 (1998), Carpenter et al., P.N.A.S. (U.S.A.) 95 (23): 13630-40 (1998). La interacción de *Hh* con *Ptch* dispara una cascada de señalización que da como resultado la regulación de la transcripción por factores de transcripción de dedos de cinc de la familia Gli.

30 La unión de *Hh* a *Ptch* libera Smoothened (*Smo*), una proteína transmembránica que cruza 7 veces la membrana, acoplada a proteínas G, para activar entonces una ruta de transducción de señales intracelular intrincada. La activación de *Smo* conduce entonces a la señalización a través de un complejo multimolecular, incluyendo Costal2 (*Cos2*), Fused (*Fu*) y supresor de Fused (*Su(Fu)*), dando como resultado un transporte nuclear del factor de transcripción Gli. Ho et al., Curr. Opin. Neurobiol. 12: 57-63 (2002); Nybakken et al., Curr. Opin. Genet. Dev. 12: 503-511 (2002); i Altaba et al., Nat. Rev. Neurosci. 3: 24-33 (2002). En vertebrados hay tres factores de transcripción *Gli* conocidos: *Gli1*, *Gli2* y *Gli3*. Mientras que *Gli1* es un activador transcripcional que es inducido universalmente en células sensibles a *Hh*, *Gli2* y *Gli3* pueden actuar como activadores o represores de la transcripción, dependiendo del contexto celular. En ausencia de señalización de *Hh*, *Gli3* es procesada a un represor transcripcional nuclear más pequeño, que carece del dominio carboxi-terminal de *Gli* de longitud completa. Con la activación de *Smo*, se evita la escisión de la proteína *Gli3*, y se genera la forma de longitud completa con función de activación de la transcripción. *Gli2* también codifica una función represora en su forma carboxi-terminalmente truncada, pero su formación no parece estar regulada por la señalización de *Hh*. Stecca et al., J. Biol. 1(2):9 (2002).

35 Los tumores malignos (cánceres) son la segunda causa importante de muerte en los Estados Unidos de América,

tras la cardiopatía (Boring et al., CA Cancel J. Clin. 43:7 (1993)). El cáncer se caracteriza por el incremento en el número de células anormales, o neoplásicas, derivadas de un tejido normal, que proliferan para formar una masa tumoral, la invasión de tejidos adyacentes por estas células tumorales neoplásicas, y la generación de células malignas que eventualmente se extienden vía la sangre o el sistema linfático a ganglios linfáticos regionales y a sitios distantes vía un proceso denominado metástasis. En un estado canceroso, una célula prolifera en condiciones en las que no crecerían las células normales. El cáncer se manifiesta por sí mismo en una amplia variedad de formas, caracterizadas por diferentes grados de invasividad y agresividad.

Se ha implicado a la señalización de hedgehog en una amplia variedad de cánceres y carcinogénesis. Un ejemplo del proceso carcinogénico es la vascularización. La angiogénesis, el proceso de hacer brotar nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente, y la arteriogénesis, la remodelación de pequeños vasos en vasos de conductos más grandes, son ambos aspectos fisiológicamente importantes del crecimiento vascular en tejidos adultos (Klagsbrun y D'Amore, Annu. Rev. Physiol. 53: 217-39 (1991); Folkman y Shing, J. Biol. Chem. 267(16): 10931-4 (1992); Beck y D'Amore, FASEB J. 11(5): 365-73 (1997); Yancopoulos et al., Cell 93(5): 661-4 (1998); Buschman y Scaper, J. Pathol. 190(3): 338-42 (2000)). Estos procesos de crecimiento vascular también son necesarios para procesos beneficiosos tales como reparación tisular, curación de heridas, recuperación de isquemia tisular y ciclo menstrual. Sin embargo, también son necesarios para el desarrollo de afecciones patológicas tales como el crecimiento de neoplasias, retinopatía diabética, artritis reumatoide, psoriasis, ciertas formas de degeneración macular, y ciertas patologías inflamatorias (Cherrington et al., Adv. Cancer Res. 79:1-38 (2000)). De este modo, la inhibición del crecimiento vascular puede inhibir la proliferación, crecimiento, diferenciación y/o supervivencia celular. Puesto que se ha demostrado que Hh promueve la angiogénesis, sería de esperar que los antagonistas de Hh poseyeran propiedades antiangiogénicas.

Las cinasas son componentes importantes de la mayoría de las rutas de señalización biológicas, y la ruta de señalización de hedgehog no es una excepción. Se han identificado aquí ciertas cinasas necesarias para la señalización de hedgehog efectiva. Como resultado, sería de esperar que las moléculas que modulan estas cinasas modulen la señalización de hedgehog, así como traten diversas afecciones y/o trastornos en los que la señalización de hedgehog es un factor determinante.

El documento WO 2004/054657 describe oligonucleótidos antisentido que están dirigidos contra PLK1.

El documento WO 03/000873 se refiere a enfoques antisentido contra la serina/treonina proteína cinasa humana NEK1.

Sumario de la invención

La presente invención se define mediante el conjunto anejo de reivindicaciones.

En particular, la presente invención se refiere a las hedgehog cinasas CSNK1A1, GYK y PRKRA.

Todas las otras cinasas se presentan sólo con fines ilustrativos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1 A-I muestran la secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido de hedgehog cinasa de secuencia nativa CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK murino, SEC ID NOS: 1-8, respectivamente.

Las Figuras 2 A-I muestran la secuencia nucleotídica de un ADNc que codifica una hedgehog cinasa de secuencia nativa CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK murina, respectivamente. Las secuencias nucleotídicas SEC ID NOS: 9-18, respectivamente, son clones designados aquí DNA188786, DNA188624, DNA189856, DNA245262, DNA238060, DNA245338, DNA390234, DNA395917, DNA243238, respectivamente, bajo el número de identificación de gen único UNQ7109, UNQ3289, UNQ7640, UNQ10553, UNQ3368, UNQ1101, UNQ14535, UNQ29308, UNQ13762, respectivamente.

Las Figuras 3 A-I muestran la secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido de hedgehog cinasa de secuencia nativa CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK humano, SEC ID NOS: 19-27, respectivamente.

Las Figuras 4 A-I muestra la secuencia nucleotídica de un ADNc que codifica una hedgehog cinasa de secuencia nativa CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK humana, respectivamente. Las secuencias nucleotídicas SEC ID NO: 28-36, respectivamente, son clones designados aquí DNA363066, DNA254256, DNA370652, DNA364981, DNA227497, DNA357103, DNA354038, DNA380434, DNA269878, bajo el número de identificación de gen único UNQ7109, UNQ3289, UNQ7640, UNQ10553, UNQ3368, UNQ1101, UNQ14535, UNQ29308, UNQ13762, respectivamente.

La Figura 5A muestra un esquema de activación de la ruta de señalización de hedgehog en el ensayo de informador de luciferasa. En células sin estimular, Patched (Ptch1) inhibe Smoothed (Smo). Con la unión a hedgehog (Hh), se alivia la inhibición y Smo activado induce una ruta de transducción de señales, conduciendo a la activación de los factores de transcripción Gli1 y Gli2, y la activación de genes diana de hedgehog. En el ensayo de luciferasa, se fusionaron nueve sitios de unión a Gli1/2 al informador de luciferasa (9XGliBS-luciferasa) y se integraron en fibroblastos C3H10T1/2 murinos. De este modo, el informador 9XGliBS-luciferasa actúa como una medida fiable de la inducción de la ruta de hedgehog.

La Figura 5B muestra células S12 (fibroblastos C3H10T1/2 murinos que expresan de forma estable el informador 9XGliBS-luciferasa); la transfección de un ARNip de control no seleccionador de diana no afecta a la capacidad de las células para responder a hedgehog, como se mide mediante inducción de luciferasa. Por el contrario, las células transfectadas con los ARNip frente a Smo evitan la capacidad de las células para responder al estímulo de hedgehog. Las células S12 se transfectaron con ARNs y se trataron con 200 ng/ml de Sonic Hedgehog modificado con octilo (O-Shh) recombinante, sesenta y seis horas después de la transfección. Los niveles de proteína Smo (panel interno) se monitorizaron usando un anticuerpo (14A5) que detecta la cola de COOH de Smo.

La Figura 5C muestra un diseño de presentación de la identificación del cinoma de ARNip de hedgehog. 3248 ARNip seleccionan como diana 812 genes (4 ARNip/diana) que consisten en todas las cinasas y proteínas reguladoras de cinasas murinas. Se añadió reactivo de transfección a las placas y se dejó incubar durante 20 minutos. Entonces se sembraron células S12 a 11.000 células/pocillo. Sesenta y seis horas después de la transfección, se añadieron 200 ng/ml de O-Shh para inducir la ruta de hedgehog. La producción de luciferasa se midió después de 24 horas.

La Figura 5D es un análisis gráfico de la identificación sistemática de ARNip del cinoma. Los coeficientes de correlación (valor r) entre réplicas indican que la identificación sistemática de ARNip fue reproducible. Las puntuaciones de placas individuales se representaron gráficamente frente a placas replicadas para células tanto no tratadas como tratadas con Hh.

La Figura 5E es una gráfica de dispersión para una identificación individual. Los valores brutos de luciferasa se convirtieron en logaritmo natural (LN). Para comparar entre diferentes placas, los valores de LN se normalizaron al ARNip no seleccionador de diana promediado en cada placa. Los valores normalizados se promediaron entonces entre réplicas de placas, y se calculó una puntuación de tratamiento "Hh" menos "no Hh" para cada ARNip individual. Se muestra una gráfica de dispersión en la que las puntuaciones del tratamiento "Hh" menos "no Hh" se representan gráficamente en el eje Y, y los 3248 ARNip correspondientes se representan gráficamente en el eje X. Los ARNip que puntuaron fuera de 1,5 desviaciones estándar de la media de todos los ARNip en la librería se consideraron aciertos potenciales.

La Figura 6A es una validación de estos aciertos mediante correlación de luciferasa para Hh con la desactivación de ARNm. Para validar el potencial hit, se volvieron a ensayar los cuatro ARNip para cada gen correspondiente en el ensayo de luciferasa para Hh. Como control negativo se usó un ARNip no seleccionador de diana. Las líneas con punto de diamante representan valores de luciferasa para Hh (como un porcentaje de células tratadas con ARNip no seleccionador de diana) tras la estimulación con Shh. Las líneas con puntos cuadrados representan la desactivación de ARNm correspondiente (como un porcentaje de células tratadas con ARNip no seleccionador de dianas) según se mide mediante qRT-PCR usando cebadores específicos de los genes y Rp119 como referencia. El panel superior es la categoría de "2 aciertos", en la que se encontró que 2 de 4 ARNip afectan a la señalización de Hh, mientras que el panel inferior es la categoría de " ≥ 3 aciertos", en la que se encontraron al menos 3 ARNip que afectan a la señalización de Hh. Los cuadrados señalados en gris claro son genes en los que los 4 ARNip correspondientes mostraron correlación entre luciferasa para Hh y la desactivación de ARNm.

La Figura 6B es una gráfica de barras que demuestran que los aciertos candidatos son específicos de la señalización de Hh. La transfección de células S12 usando ARNip reunidos indica que la mayoría de los genes candidatos (con la excepción de Pak6 y Scyl1) reducen Hh-luciferasa, a la vez que mantienen el nivel de desactivación de ARNm.

La Figura 6C es una gráfica de barras que muestra que los ARNip reunidos no afectan a SV40-luciferasa, sugiriendo que los genes candidatos son específicos de la señalización de Hh.

La Figura 6D es una gráfica de barras que muestra que los genes candidatos afectan a la activación de los genes diana de Hh endógenos Gli1 y Ptch1 mediante análisis de qRT-PCR.

La Figura 7A es un experimento de epistasia de células tratadas con ARNip reunidos que seleccionan como diana los 9 genes candidatos, junto con la expresión de SMOM2 (mutante de Smo constitutivamente activo), que indica que 4 de los genes actúan en dirección 5' de Smo, mientras que 5 actúan en dirección 3' de Smo.

Se muestra la media y la desviación estándar (SD) para tres experimentos independientes.

La Figura 7B es un análisis de epistasia de células tratadas con ARNi reunidos que seleccionan como diana los 9 genes candidatos junto con la expresión de Gli1, que indica que todos los aciertos actúan en dirección 5' de Gli1. Se muestra la media y la desviación estándar (SD) para tres experimentos independientes.

5 La Figura 7C es un análisis de epistasia que usa experimentos de ARNi doble con genes candidatos y Gli3, que indica que los 9 candidatos actúan en dirección 5' de Gli3. Se muestra la media y desviación estándar (SD) para tres experimentos independientes.

10 La Figura 7D es un modelo gráfico que resume dónde actúa probablemente cada una de las 9 cinasas candidatas en la ruta de Hh de mamíferos. CSNK1A1, GYK, NEK1 y TTK actúan probablemente en dirección 5', mientras que CDC2L1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA y TTBK2 actúan probablemente en dirección 3' de Smo. Todos los candidatos actúan en dirección 5' de los factores de transcripción Gli.

15 La Figura 7E son fotografías de un conjunto de células IMCD3 murinas transfectadas establemente que expresan ARNhC de control (panel inferior) o ARNhC de NEK1 (panel superior) teñidas con anticuerpo anti-tubulina acetilada para visualizar cilios (rojo), o con DAPI para visualizar los núcleos (azul). Se aplanaron 2 a 4 μm de secciones ópticas obtenidas de la superficie apical de las células, y se inclinaron para la presentación.

20 La Figura 8A es una representación de un cálculo del factor Z de 0,61, que indica que el ensayo de ARNi fue robusto. Para calcular el factor Z para la identificación, se calculó una media y la desviación estándar para las células transfectadas con ARNi no seleccionador de dianas o ARNi de Smo. El cálculo del factor Z se midió usando la fórmula: factor Z = $1 - [3 (\sigma_p + \sigma_n) / |\mu_p - \mu_n|]$.

25 La Figura 8B demuestra que NEK1 tiene un papel en la formación de cilios. Células IMCD3 murinas transfectadas de forma estable, que expresan ARNhC de control o ARNhC de NEK1, se teñieron con anticuerpo anti-tubulina acetilada para visualizar los cilios. La gráfica representa el porcentaje de células con un cilio primario en células de control o tratadas con ARNhC de NEK1. Las barras de error representan el promedio de tres recuentos independientes, que fueron n = 300.

La Figura 8C muestra la coexpresión del constructo de expresión de NEK1 marcado con V5 junto con pSuper o pSuper-NEK1 en células HEK293. pSuper-NEK1 es capaz de inhibir la expresión de la proteína NEK1-V5 en comparación con pSuper solo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 I. Sumario

La presente invención se refiere al descubrimiento de que las rutas de transducción de señales reguladas por la señalización de hedgehog (*por ejemplo*, hedgehog, patched, smoothened, fused, supresor de fused, etc.) pueden ser inhibidas, al menos en parte, antagonizando la actividad de ciertas cinasas que son activas en la ruta de señalización de hedgehog.

35 De este modo, se contempla específicamente que los antagonistas de hedgehog cinasas identificados aquí interferirán con la actividad de transducción de señales de hedgehog, e igualmente serán capaces de cambiar el destino de una célula o tejido que se ve afectada por la señalización de hedgehog, tal como células que sufren el desarrollo normal o estados enfermos y se caracterizan por la señalización aberrante de hedgehog. Más específicamente, tal señalización de hedgehog puede ocurrir (i) como señalización de hedgehog de tipo salvaje, o (ii) resultado de la hiperactivación de la ruta de hedgehog. Los trastornos que resultan de la hiperactivación de la ruta de hedgehog se pueden atribuir a mutaciones que surgen en componentes de la señalización de hedgehog, o a la activación o estimulación inapropiada que no resulta de una mutación o lesión en un componente de señalización de hedgehog. Por lo tanto, es deseable tener un método para identificar aquellas células en las que la ruta de hedgehog es hiperactiva, de forma que el tratamiento con antagonistas de hedgehog cinasas se puede seleccionar eficientemente como diana. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que los antagonistas de hedgehog cinasas son adecuados para el tratamiento de afecciones o trastornos caracterizados por señalización hiperactiva de hedgehog, así como para modificar el destino celular durante el desarrollo mediante supresión de la concentración de hedgehog.

II. Definiciones

50 Una hedgehog cinasa de la invención se selecciona de CSNK1A1, GYK y PPKRA. Todas las otras cinasas son con fines ilustrativos solamente.

Un "polipéptido de hedgehog cinasa CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK", o

“polipéptido de CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK”, incluye tanto “polipéptidos de hedgehog cinasa de secuencia nativa CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK” y “variantes polipeptídicas de hedgehog cinasas CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK”, como se describe más abajo.

5 Un “polipéptido de hedgehog cinasa CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK de secuencia nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido de hedgehog cinasa CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK correspondiente derivado de la naturaleza. Tales secuencias de hedgehog cinasas de secuencia nativa se pueden aislar de la naturaleza, o se pueden producir mediante medios recombinantes o sintéticos. La expresión “polipéptido de hedgehog cinasas CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK de secuencia nativa” engloba específicamente formas truncadas de origen natural, formas variantes de origen natural (*por ejemplo*, formas empalmadas alternativamente) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido. En un aspecto específico, los polipéptidos de hedgehog cinasas de secuencia nativa descritos aquí son polipéptidos de secuencia nativa madura o de longitud completa que corresponden a la secuencia citada en las Figuras 1 y 3. Esta secuencia se denomina aquí específicamente con el nombre común CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK, con la secuencia murina denominada como DNA189856, DNA245262, DNA243238, DNA395917, y la secuencia humana como DNA370652, DNA364981, DNA269878, DNA380434.

“Variante polipeptídica de hedgehog cinasas CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK” significa un polipéptido de hedgehog cinasas CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK, preferiblemente sus formas activas, como se define aquí, que tienen al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de polipéptido de hedgehog cinasas de secuencia nativa de longitud completa, como se describe aquí, y sus formas variantes que carecen del péptido señal, un fragmento que comparte la actividad de hedgehog cinasa de la secuencia nativa de longitud completa, o cualquier otro fragmento de un polipéptido de hedgehog cinasas de secuencia nativa de longitud completa, tales como los citados aquí. Tales polipéptidos variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que se añaden, o se suprimen, uno o más restos de aminoácidos en los términos N o C de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. En un aspecto específico, tales polipéptidos variantes tendrán al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos alrededor de 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos, con un polipéptido de secuencia polipeptídica de hedgehog cinasas de secuencia nativa de longitud completa, como se describe aquí, y sus formas variantes que carecen del péptido señal, un fragmento que comparte la actividad de hedgehog cinasa de la secuencia nativa de longitud completa, o cualquier otro fragmento de un polipéptido de hedgehog cinasas de secuencia nativa de longitud completa tal como los descritos aquí. En un aspecto específico, tales polipéptidos variantes variarán al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 200, 250, 300 o más restos de aminoácidos en longitud con respecto al polipéptido de secuencia nativa correspondiente. Como alternativa, tales polipéptidos variantes no tendrán más de una sustitución de aminoácidos conservativa en comparación con la secuencia polipeptídica nativa correspondiente, como alternativa no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10 sustituciones conservativas de aminoácidos en comparación con la secuencia polipeptídica nativa.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias polipeptídicas de hedgehog cinasas CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK identificadas aquí se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de hedgehog cinasas CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK específica, después de alinear las secuencias e introducir los saltos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de diversas maneras que están dentro de la pericia en la técnica, por ejemplo usando software de ordenador disponible públicamente tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualesquiera algoritmos necesarios para lograr el alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los fines aquí, sin embargo, los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que se proporciona el código de fuente completa para el programa ALIGN-2 autorizado por Genentech, Inc. y que se presentó con documentación de usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, en la que está registrado con el número de registro de la U.S. Copyright TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 se debería compilar para uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se ajustan mediante el programa ALIGN-2, y no varían.

“Polinucleótido variante de hedgehog cinasas CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK” o “secuencia de ácido nucleico variante de hedgehog cinasas CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK” significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de hedgehog

cinasas, preferiblemente formas activas del mismo, como se define aquí, y que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica de hedgehog cinasas de secuencia nativa de longitud completa identificada aquí, o cualquier otro fragmento de la secuencia polipeptídica de hedgehog cinasas de longitud completa respectiva como se identifica aquí (tales como aquellas codificadas por un ácido nucleico que representa sólo una porción de la secuencia codificante completa para un polipéptido de hedgehog cinasas de longitud completa). De forma normal, tales polinucleótidos variantes tendrán al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos alrededor de 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia de ácido nucleico, codificando una secuencia de ácido nucleico la secuencia polipeptídica de hedgehog cinasas de secuencia nativa de longitud completa respectiva o cualquier otro fragmento de la secuencia polipeptídica de hedgehog cinasas de longitud completa respectiva identificada aquí. Tales polinucleótidos variantes no engloban la secuencia nucleotídica nativa.

Normalmente, tales polinucleótidos variantes varían al menos alrededor de 50 nucleótidos en longitud con respecto al polipéptido de secuencia nativa; como alternativa, la variación puede ser al menos alrededor de 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 en longitud, en la que en este contexto la expresión "alrededor de" significa la longitud de la secuencia nucleotídica citada más o menos 10% de aquella longitud citada.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido de hedgehog cinasas CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK identificadas aquí se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de ácido nucleico de hedgehog cinasas de interés, respectivamente, después de alinear las secuencias e introducir los saltos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. El alineamiento, para los fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico, se puede lograr de diversas maneras que están dentro de la pericia en la técnica, por ejemplo usando software de ordenador disponible públicamente, tales como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Para los fines aquí, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de ácido nucleico se generan usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2 que fue autorizado por Genentech, Inc. y que se presentó con la documentación de usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, en la que está registrado con el número de registro de la U.S. Copyright TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 se debería compilar para uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se ajustan mediante el programa ALIGN-2, y no varían.

En las situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico dada C para, con, o frente a una secuencia de ácido nucleico dada D (que se puede definir alternativamente como una secuencia de ácido nucleico C dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de ácido nucleico para, con, o frente a una secuencia de ácido nucleico D dada) se calcula según lo siguiente:

$$100 \text{ veces la fracción } W/Z$$

en la que W es el número de nucleótidos puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en ese alineamiento del programa de C y D, y en la que Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de la secuencia de ácido nucleico D, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D a C. Como ejemplos de cálculos del % de identidad de secuencia de ácido nucleico, las Tablas 3 y 4 demuestran cómo calcular el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico designada "ADN de comparación" con la secuencia de ácido nucleico designada "REF-DNA", en la que "REF-DNA" representa una secuencia de ácido nucleico hipotética de interés que codifica hedgehog cinasas, "ADN de comparación" representa la secuencia nucleotídica de una molécula de ácido nucleico frente a la cual se está comparando la molécula de ácido nucleico "REF-DNA" de interés, y "N", "L" y "V" representan cada uno diferentes nucleótidos hipotéticos. Excepto que se señale específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de ácido nucleico usados aquí se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior, usando el programa de ordenador ALIGN-2.

En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes de hedgehog cinasas son moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de hedgehog cinasas, y que son capaces de hibridarse, preferiblemente en condiciones restrictivas de hibridación y de lavado, a secuencias nucleotídicas que codifican un polipéptido de hedgehog cinasas de longitud completa, como se describe aquí. Tales polipéptidos variantes pueden ser aquellos que son codificados

por tales polinucleótidos variantes.

“Aislado”, cuando se usa para describir los diversos polipéptidos de hedgehog cinasas descritos aquí, significa polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían típicamente con usos de diagnóstico o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, tales polipéptidos se purificarán (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante uso de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta una homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente tinción con plata. Tales polipéptidos aislados incluyen los polipéptidos correspondientes *in situ* en células recombinantes, puesto que no estará presente un componente del polipéptido de hedgehog cinasas de su entorno natural. De forma normal, sin embargo, tales polipéptidos aislados se prepararán mediante al menos una etapa de purificación.

El término “hedgehog” o “polipéptido de hedgehog” (Hh) se usa aquí para referirse genéricamente a cualquiera de los homólogos de mamífero del hedgehog de *Drosophila*, es decir, Sonic hedgehog (Shh), Desert hedgehog (Dhh) o Indian hedgehog (Ihh). El término se puede usar para describir proteína o ácido nucleico.

Las expresiones “ruta de señalización de hedgehog”, “ruta de hedgehog” y “ruta de transducción de señales de hedgehog”, como se usan aquí, se refieren de forma intercambiable a la cascada de señalización mediada por hedgehog y sus receptores (*por ejemplo, patched, patched-2*) y que da como resultado cambios de expresión génica y otros cambios fenotípicos típicos de la actividad de hedgehog. La ruta de hedgehog se puede activar en ausencia de hedgehog mediante activación de un componente aguas abajo (*por ejemplo, sobreexpresión de Smoothened* o transfecciones con mutantes *Smoothened* o *Patched* para dar como resultado la activación constitutiva de la señalización de hedgehog en ausencia de hedgehog). Los factores de transcripción de la familia *Gli* se usan a menudo como marcadores o indicadores de la activación de la ruta de hedgehog.

La expresión “componente de señalización de Hh” se refiere a productos génicos que participan en la ruta de señalización de Hh. Un componente de señalización de Hh frecuentemente afecta de manera material o sustancial la transmisión de la señal de Hh en células o tejidos, afectando de ese modo los niveles de expresión génica aguas abajo y/u otros cambios fenotípicos asociados con la activación de la ruta de hedgehog.

Cada componente de señalización de Hh, que depende de su función biológica y afecta al resultado final de la activación o expresión génica aguas abajo, se pueden clasificar como reguladores positivos o negativos. Un regulador positivo es un componente de señalización de Hh que afecta positivamente a la transmisión de la señal de Hh, es decir, estimula sucesos biológicos aguas abajo cuando está presente Hh. Un regulador negativo es un componente de señalización de Hh que afecta negativamente la transmisión de la señal de Hh, es decir, inhibe sucesos biológicos aguas abajo cuando está presente Hh.

La expresión “ganancia de función de hedgehog” se refiere a una modificación o mutación aberrante de un componente de señalización de hedgehog (*por ejemplo, ptch, Smo, Fused, Su(fu), Cos-2, etc.*) o una disminución (o pérdida) en el nivel de expresión para tal gen, que da como resultado un fenotipo que se asemeja a poner en contacto una célula con una proteína hedgehog, *por ejemplo, activación aberrante de una ruta de hedgehog*. La ganancia de función puede incluir una pérdida de la capacidad del producto génico *ptch* para regular el nivel de expresión de los factores de activación de la transcripción *Gli1, Gli2* y/o *Gli3*. La expresión “ganancia de función de hedgehog” también se usa aquí para referirse a cualquier fenotipo celular similar (*por ejemplo, que muestra proliferación excesiva*) que se produce debido a una alteración en cualquier parte en la ruta de transducción de señales de hedgehog, incluyendo, pero sin limitarse a, una modificación o mutación de la propia hedgehog. Por ejemplo, una célula tumoral con una tasa anormalmente elevada de proliferación para la activación de la ruta de señalización de hedgehog tendría un fenotipo de “ganancia de función de hedgehog”, incluso si hedgehog no está mutada en esa célula.

Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de hedgehog cinasas “aislado” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está normalmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Cualquiera de la tal molécula de ácido nucleico aislada anterior es distinta en la forma o escenario en la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, cualquiera de tales moléculas de ácido nucleico se distinguen de la molécula de ácido nucleico específica que codifica el polipéptido como existe en células naturales.

La expresión “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operablemente enlazada en un organismo hospedante particular. Las secuencias de control son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión de ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

El ácido nucleico está “enlazado operablemente” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de

ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para un líder secretor o presecuencia está enlazado operablemente a ADN para un polipéptido si es expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está enlazado operablemente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión del ribosoma está enlazado operablemente a una secuencia codificante si está situado de manera para facilitar la traducción. Generalmente, “operablemente enlazado” significa que las secuencias de ADN que se enlazan son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlazamiento se logra mediante ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se usan los adaptadores o ligadores oligonucleotídicos sintéticos según la práctica convencional.

La “restricción” de reacciones de hibridación es fácilmente determinable por un experto en la técnica, y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, temperatura de lavado, y concentración salina. En general, las sondas más largas requieren mayores temperaturas para el apareamiento apropiado, mientras que sondas más cortas necesitan menores temperaturas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturizado para volverse a aparear cuando están presentes hebras complementarias en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor es la temperatura relativa que se puede usar. Como resultado, se concluye que mayores temperaturas relativas tenderían a hacer a las condiciones de reacción más restrictivas, mientras que temperaturas más bajas las hacen menos. Para detalles adicionales y una explicación de la restricción de reacciones de hibridación, véase Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

“Condiciones restrictivas” o “condiciones muy restrictivas”, como se define aquí, se pueden identificar por aquellas que: (1) emplean una baja fuerza iónica y temperatura elevada para el lavado, por ejemplo 0,015 M de cloruro de sodio/0,0015 M de citrato de sodio/0,1% de dodecilsulfato de sodio a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo 50% (v/v) de formamida con 0,1% de seroalbúmina bovina/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/50 mM de tampón de fosfato de sodio a pH 6,5 con 750 mM de cloruro de sodio, 75 mM de citrato de sodio a 42°C; o (3) hibridación toda la noche en una disolución que emplea 50% de formamida, 5 x SSC (0,75 M de NaCl, 0,075 M de citrato de sodio), 50 mM de fosfato de sodio (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sodio, 5 x de disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón tratado con ultrasonidos (50 µg/ml), 0,1% de SDS, y 10% de sulfato de dextrano a 42°C; cada uno seguido de un lavado inicial durante 10 minutos a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) seguido de un lavado muy restrictivo durante 10 minutos que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

Las “condiciones moderadamente restrictivas” se pueden identificar como se describe por Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluye el uso de disolución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos restrictivas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente restrictivas es la incubación durante toda la noche a 37°C en una disolución que comprende: 20% de formamida, 5 x SSC (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato trisódico), 50 mM de fosfato de sodio (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturizado, seguido del lavado de los filtros en 1 x SSC a alrededor de 37-50°C. El experto normal reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., según sea necesario para adecuar factores tales como longitud de la sonda y similares.

La expresión “epítipo etiquetado”, cuando se usa aquí, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido de hedgehog cinasas o un agente de unión a hedgehog cinasas fusionado a un “polipéptido de etiqueta”. El polipéptido de etiqueta tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo frente al cual se puede obtener un anticuerpo, aunque es suficientemente corto de manera que no interfiere con la actividad del polipéptido con el que se funde. El polipéptido de etiqueta preferiblemente también es suficientemente único, de manera que tal anticuerpo no reacciona sustancialmente de forma cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos de etiqueta adecuados tienen generalmente al menos seis restos de aminoácidos, y habitualmente entre alrededor de 8 y 50 restos de aminoácidos (preferiblemente, entre alrededor de 10 y 20 restos de aminoácidos).

“Activo” o “actividad”, para los fines aquí, se refiere a la forma o formas de polipéptidos de hedgehog cinasas que retienen una actividad biológica y/o inmunológica del polipéptido de hedgehog cinasa nativo o de origen natural, en el que la actividad “biológica” se refiere a una función biológica (ya sea inhibidora o estimulante) provocada por una hedgehog cinasa nativa o de origen natural distinta de la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un polipéptido de hedgehog cinasa nativo o de origen natural, y una actividad “inmunológica” se refiere a la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un polipéptido de hedgehog cinasa nativo o de origen natural. Un polipéptido de hedgehog cinasa activo, como se usa aquí, es un antígeno que es expresado diferencialmente, ya sea desde una perspectiva cualitativa o cuantitativa, en un tumor de glioma, con relación a su expresión en tejido similar que no está afectado con el glioma.

“Tratar” o “tratamiento” o “alivio” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en los que el objeto es evitar o ralentizar (reducir) la progresión de una enfermedad. “Diagnosticar” se

refiere al proceso de identificar o determinar las características distintivas de una enfermedad o tumor. El proceso de diagnóstico también se expresa algunas veces como estadificación o clasificación tumoral basado en la gravedad o progresión de la enfermedad.

5 Los sujetos que necesiten tratamiento o diagnóstico incluyen aquellos que ya tienen señalización de hedgehog aberrante, así como aquellos propensos a tener o aquellos en los que se va a evitar la señalización de hedgehog aberrante. Un sujeto o mamífero se “trata” con éxito para la señalización de hedgehog aberrante si, según el método de la presente invención, después de recibir una cantidad terapéutica de un antagonista de hedgehog cinasa, el paciente muestra una reducción observable y/o medible en, o ausencia de, uno o más de los siguientes: reducción en el número de células tumorales o ausencia de tales células; reducción en el tamaño tumoral; inhibición (*es decir*,
10 ralentización en cierto grado, y preferiblemente detención) de la infiltración de células tumorales en órganos periféricos, incluyendo la extensión del cáncer en tejido blando y hueso; la inhibición (*es decir*, ralentización en cierto grado, y preferiblemente detención) de la metástasis tumoral; inhibición, hasta cierto grado, del crecimiento tumoral; y/o alivio hasta cierto grado de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; morbimortalidad reducida, y mejora en la calidad de aspectos vitales. Hasta el grado en que tales antagonistas de hedgehog cinasas pueden evitar el crecimiento y/o exterminar células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La
15 reducción de estos signos o síntomas puede ser también sentida por el paciente.

Los parámetros anteriores para evaluar el tratamiento con éxito y la mejora en la enfermedad son fácilmente medibles por procedimientos habituales familiares para un médico. Para la terapia contra el cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR). La metástasis se puede determinar mediante ensayos de estadificación y ensayos para el nivel de calcio y otras enzimas para determinar el grado de metástasis. También se pueden realizar barridos de CT, para
20 buscar la diseminación a regiones fuera del tumor o cáncer. La invención descrita aquí que se refiere al proceso de pronosticar, diagnosticar y/o tratar, implica la determinación y evaluación de hedgehog cinasa y la amplificación y expresión de hedgehog.

25 “Mamífero”, para los fines de tratamiento, aliviar los síntomas, o diagnosticar un cáncer, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, hurones, *etc.* Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.
30

“Vehículos”, como se usa aquí, incluye vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes, o estabilizantes, que son no tóxicos para la célula o mamífero expuesto a ellos a las dosis y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución de pH tamponado acuosa. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes
35 que incluyen ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menor que alrededor de 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono, incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN®, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS®.
40

Por “fase sólida” o “soporte sólido” se quiere decir una matriz no acuosa a la que se puede adherir o unir un polipéptido de hedgehog cinasa y polipéptido de hedgehog cinasa de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas englobadas aquí incluyen aquellas formadas parcial o completamente de vidrio (*por ejemplo*, vidrio de poro controlado), polisacáridos (*por ejemplo*, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, polialcohol vinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (*por ejemplo*, una columna de cromatografía de afinidad). Esta expresión también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la patente U.S. nº 4.275.149.
45

Un “liposoma” es una pequeña vesícula compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo, que es útil para el suministro de un fármaco (tal como un antagonista de hedgehog cinasa) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición lipídica de membranas biológicas.
50

Una “pequeña molécula” o “pequeña molécula orgánica” se define aquí que tiene un peso molecular por debajo de alrededor de 500 Daltons.

55 Una “cantidad efectiva” de un agente antagonista de hedgehog cinasa es una cantidad suficiente para inhibir, parcial o completamente, la señalización de hedgehog en una célula en la que la señalización de hedgehog es activa. Como alternativa, una cantidad efectiva de un antagonista de hedgehog cinasa es una cantidad suficiente para reducir la

tasa de proliferación en la célula y/o tasa de supervivencia de una célula que expresa o sobreexpresa hedgehog. Una "cantidad efectiva" se puede determinar empíricamente y de manera rutinaria, en relación con este fin.

5 La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a un antagonista de hedgehogcinasa u otro fármaco efectivo para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de señalización de hedgehog, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco reducirá o restaurará la señalización aberrante de hedgehog a los niveles fisiológicos normales; reducirá el tamaño tumoral; inhibirá (*es decir*, ralentizará en cierto grado, y preferiblemente detendrá) la infiltración de células tumorales en tejido u órganos periféricos; inhibirá (*es decir*, ralentizará en cierto grado, y preferiblemente detendrá) la metástasis tumoral; inhibirá, al menos en cierto grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviará en cierto grado uno o más de los síntomas asociados con el tumor o cáncer. Véase la definición aquí de "tratar". Hasta el grado en el que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o exterminar células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico.

15 Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un antagonista de hedgehog cinasa es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente célula tumoral, *por ejemplo* célula cancerosa, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Para los fines de inhibir el crecimiento celular neoplásico, tal cantidad se puede determinar empíricamente y de manera rutinaria.

Una "cantidad citotóxica" de un antagonista de hedgehog cinasa es una cantidad capaz de provocar la destrucción de una célula, especialmente una célula tumoral, *por ejemplo* célula cancerosa, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Para los fines de inhibir el crecimiento celular neoplásico, se puede determinar empíricamente y de manera rutinaria.

20 El término "anticuerpo", se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-polipéptido de hedgehog cinasa (incluyendo anticuerpos antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpos anti-polipéptido de hedgehog cinasa con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos anti-hedgehog cinasa monocatenarios, anticuerpos multiespecíficos (*por ejemplo*, biespecíficos) y fragmentos de unión a antígeno (véase más abajo) de todos los anticuerpos enumerados anteriormente en tanto que muestren la actividad biológica o inmunológica deseada. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa aquí de forma intercambiable con anticuerpo.

30 Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de 95% en peso de anticuerpo según se determina mediante el método de Lowry, y muy preferiblemente más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferiblemente, con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* con células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

40 El término "anticuerpo monoclonal", como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *es decir*, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo o epítipos, excepto por posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando generalmente tales variantes presentes en cantidades minoritarias. Tal anticuerpo monoclonal incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica que se une a una diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica que se une a una diana a partir de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular.

50 Los anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" tienen una porción de la cadena pesada y/o ligera idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, en tanto que muestren la actividad biológica deseada (patente U.S. n° 4.816.657; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Anticuerpo humanizado, como se usa aquí, es un subconjunto de anticuerpos quiméricos.

55 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor o aceptor) en las que los restos de la región hipervariable del receptor se sustituyen por restos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo

- donante) tal como un ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región del armazón Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo, tal como la afinidad de unión. Generalmente, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la afinidad de unión. El número de estas sustituciones de aminoácidos en la FR es típicamente no mayor de 6 en la cadena H, y en la cadena L es no mayor de 3. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante inmunoglobulínica (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).
- “Fragmentos de anticuerpo” comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión al antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; dianticuerpos; anticuerpos lineales (véase la patente U.S. n° 5.641.870; Ejemplo 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.
- La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos “Fab”, y un fragmento residual “Fc”, una designación que refleja la capacidad para cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (VH), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión al antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión al antígeno. El tratamiento de un anticuerpo con pepsina produce un único fragmento F(ab')₂ grande, que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab enlazados por disulfuro que tiene actividad divalente de unión al antígeno, y todavía es capaz de reticular el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener pocos restos adicionales en el término carboxi del dominio C_{H1}, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación aquí para Fab' en el que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes poseen un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen entre ellos cisteínas bisagra. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.
- “Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y de unión a antígeno. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y un dominio de región variable de cadena ligera en asociación fuerte no covalente. “Fv de cadena sencilla”, también abreviado como “sFv” o “scFv”, son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpos V_H y V_L conectados en una cadena polipeptídica sencilla. Preferiblemente, el polipéptido de sFv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para un repaso de sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, p. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, *más abajo*.
- La expresión “antagonista de hedgehog cinasa” incluye cualquier molécula que bloquee, inhiba o neutralice parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido de hedgehog cinasa CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK descrito aquí, incluyendo la atenuación de la señalización de hedgehog. Los ejemplos incluyen bloquear la capacidad de un ligando de hedgehog (por ejemplo, Shh, Dhh, Ihh) para inducir la señalización de hedgehog con la unión a un receptor de hedgehog (por ejemplo, *ptch-1*, *ptch-2*, *Smo*), o que *Smo* transmite una señal a un factor de transcripción *Gli* u otros componentes aguas abajo en la ruta de señalización de hedgehog. Moléculas antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpo antagonistas, fragmentos o variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos de hedgehog cinasa nativo, péptidos, oligonucleótidos antisentido, pequeñas moléculas orgánicas, moléculas de ARNi, constructo de ARNi, etc. El “antagonista de hedgehog cinasa” puede dirigirse contra hedgehog cinasa CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK (por ejemplo, anticuerpo anti- CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK, un oligopéptido que se une a CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK, un oligonucleótido antisentido de CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK, una molécula de ARNi de CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK y una pequeña molécula de CDC2L1, CSNK1A1, GYK, NEK1, PLK1, PRKAR1A, PRKRA, TTBK2, TTK”). Según la invención, “antagonista de hedgehog cinasa” es una molécula de ARNi de CSNK1A1, GYK o PRKRA. Los métodos para identificar antagonistas de hedgehog cinasa pueden comprender poner en contacto tal péptido, incluyendo una célula que lo expresa, con una molécula agonista o antagonista candidata, y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con tal péptido.
- Un “ARN de interferencia” o ARNi es ARN de 10 a 50 nucleótidos de longitud que reduce la expresión de un gen diana, en el que porciones de la hebra son suficientemente complementarias (por ejemplo, que tienen al menos 80%

de identidad con el gen diana). El método de interferencia por ARN se refiere a la supresión de la expresión génica (es decir, “silenciamiento génico”) específica de la diana, que se produce a un nivel post-transcripcional (por ejemplo, traducción), e incluye todos los mecanismos post-transcripcionales y transcripcionales de la inhibición de la expresión génica mediada por ARN, tales como aquellos descritos en P.D. Zamore, *Science* 296: 1265 (2002) y Hannan y Rossi, *Nature* 431: 371-378 (2004). Como se usa aquí, ARNi puede estar en forma de ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN de horquilla corto (ARNhc), y/o microARN (miARN).

Tales moléculas de ARNi son a menudo complejos de ARN bicatenario que se pueden expresar en forma de hebras de ARN complementarias o parcialmente complementarias separadas. Los métodos son bien conocidos en la técnica para diseñar complejos de ARN bicatenario. Por ejemplo, el diseño y la síntesis de ARNhc y ARNip adecuados se pueden encontrar en Sandy et al., *BioTechniques* 39: 215-224 (2005).

Una “región codificante de ARN” es un ácido nucleico que puede servir como un molde para la síntesis de una molécula de ARN, tal como un complejo de ARN bicatenario. Preferiblemente, la región codificante de ARN es una secuencia de ADN.

Un “ARN de interferencia pequeño” o ARNip es un dúplex de ARN bicatenario (ARNpc) de 10 a 50 nucleótidos de longitud que reduce la expresión de un gen diana, en el que porciones de la primera hebra son suficientemente complementarias (por ejemplo, teniendo al menos 80% de identidad con el gen diana). Los ARNip se diseñan específicamente para evitar la respuesta antivírica caracterizada por síntesis elevada de interferones, inhibición de la síntesis proteica no específica y degradación del ARN que a menudo dan como resultado el suicidio o la muerte de la célula asociado con el uso de ARNi en células de mamíferos. Paddison et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 99(3):1443-8. (2002).

El término “horquilla” se refiere a una estructura de ARN de bucle de 7-20 nucleótidos.

Un “ARN de horquilla corto” o ARNhc es un ARN monocatenario de 10 a 50 nucleótidos de longitud caracterizado por una vuelta de horquilla que reduce la expresión de un gen diana, en el que las porciones de la hebra de ARN son suficientemente complementarias (por ejemplo, teniendo al menos 80% de identidad con el gen diana).

La expresión “tallo-bucle” se refiere a un emparejamiento entre dos regiones del par de bases de la misma molécula para formar una hélice doble que termina en un bucle sin emparejar corto, dando una estructura con forma de piruleta.

Un “microARN” (previamente conocido como ARNtc) es un ARN monocatenario de alrededor de 10 a 70 nucleótidos de longitud que se transcribe inicialmente como pre-miARN caracterizado por una estructura de “tallo-bucle”, que se procesa subsiguientemente a miARN maduro después del procesamiento posterior a través del complejo silenciador inducido por ARN (RISC).

Un “oligopéptido de unión a hedgehog cinasa” es un oligopéptido que se une, preferiblemente de forma específica, a un péptido de hedgehog cinasa, incluyendo un receptor, un ligando o componente de señalización, respectivamente, como se describe aquí. Tales oligopéptidos se pueden sintetizar químicamente usando metodología de síntesis de oligopéptidos conocida, o se pueden preparar y purificar usando tecnología recombinante. Tales oligopéptidos tienen habitualmente al menos alrededor de 5 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos alrededor de 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ó 100 aminoácidos de longitud o más. Tales oligopéptidos se pueden identificar sin experimentación excesiva usando técnicas bien conocidas. A este respecto, se señala que las técnicas para identificar librerías de oligopéptidos para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a una diana polipeptídica son bien conocidas en la técnica (véanse, *por ejemplo*, las patentes U.S. n^{os} 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; las publicaciones PCT n^{os} WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:3998-4002 (1984); Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:178-182 (1985); Geysen et al., en *Synthetic Peptides as Antigens*, 130-149 (1986); Geysen et al., *J. Immunol. Meth.*, 102:259-274 (1987); Schoofs et al., *J. Immunol.*, 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378 (1990); Lowman, H.B. et al. *Biochemistry*, 30:10832 (1991); Clackson, T. et al. *Nature*, 352: 624 (1991); Marks, J. D. et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991); Kang, A.S. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8363 (1991), y Smith, G. P., *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668 (1991).

Un antagonista de hedgehog cinasa (*por ejemplo*, oligopéptido, molécula de ARNi, o pequeña molécula) “que se une” a un antígeno diana de interés, *por ejemplo* una hedgehog cinasa, es aquel que se une a la diana con suficiente afinidad para que sea un agente de diagnóstico, de pronóstico y/o terapéutico útil a la hora de seleccionar como diana una célula o tejido que expresa el antígeno, y no reacciona significativamente de forma cruzada con otras proteínas. El grado de unión a un polipéptido marcador no deseado será menor que alrededor de 10% de la unión a la diana deseada particular, según se puede determinar mediante técnicas habituales tales como análisis por

clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA).

Además, la expresión “unión específica” o “se une específicamente a” o es “específico para” un polipéptido de hedgehog cinasa particular o un epítipo en una diana polipeptídica de hedgehog cinasa particular significa la unión que es diferente, desde el punto de vista medible, de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante competición con una molécula de control que es similar a la diana, por ejemplo un exceso de diana no marcada. En este caso, la unión específica se indica si la unión de la diana marcada a una sonda es inhibida competitivamente por la diana sin marcar en exceso. En una realización, tales expresiones se refieren a la unión cuando una molécula se une a un polipéptido particular o epítipo en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo polipeptídico. Como alternativa, tales términos se pueden describir mediante una molécula que tiene una Kd para la diana de al menos alrededor de 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, o mayor.

Un antagonista de hedgehog cinasa que “inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan un polipéptido de hedgehog cinasa”, o una cantidad “inhibidora del crecimiento” de cualquiera de tales moléculas, es aquel que da como resultado una inhibición medible del crecimiento de células cancerosas que expresan un polipéptido de hedgehog cinasa. Las composiciones preferidas para uso en el tratamiento comprenden cantidades inhibidoras del crecimiento de al menos un tipo de antagonista de hedgehog cinasa, para inhibir el crecimiento de células tumorales en más de 20%, preferiblemente de alrededor de 20% a alrededor de 50%, e incluso más preferiblemente en más de 50% (por ejemplo, de alrededor de 50% a alrededor de 100%), en comparación con el control apropiado. En una realización, la inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de moléculas de alrededor de 0,1 a 30 $\mu\text{g/ml}$ o alrededor de 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, en el que la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de células tumorales de glioma in vivo se puede determinar de varias maneras, tales como se describe en la sección de Ejemplos Experimentales más abajo. Una cantidad de cualquiera de las moléculas anteriores de este párrafo es inhibidora del crecimiento *in vivo* si la administración de tal molécula a alrededor de 1 $\mu\text{g/kg}$ a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal da como resultado la reducción del tamaño tumoral o proliferación de las células tumorales en alrededor de 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferiblemente en alrededor de 5 a 30 días.

Un antagonista de hedgehog cinasa que “induce apoptosis” es aquel que induce la muerte celular programada de una célula tumoral según se determina mediante la unión de anexina V, fragmentación de ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular, y/o formación de vesículas en la membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). La célula es habitualmente aquella que sobreexpresa un polipéptido de hedgehog. Existen diversos métodos para evaluar los sucesos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de fosfatidil serina (PS) se puede medir mediante unión a anexina; la fragmentación del ADN se puede evaluar mediante escalamiento del ADN; y la condensación nuclear/cromatínica junto con la fragmentación del ADN se puede evaluar mediante cualquier incremento en células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que induce apoptosis es aquella que da como resultado una inducción de alrededor de 2 a 50 veces, preferiblemente alrededor de 5 a 50 veces, y lo más preferible alrededor de 10 a 50 veces, de la unión a anexina, con relación a células no tratadas, en un ensayo de unión a anexina.

Un antagonista de hedgehog cinasa que “induce la muerte celular” es aquel que provoca que una célula tumoral o cancerosa viable se haga no viable. Tal célula es aquella que expresa una ruta de señalización de hedgehog, preferiblemente la sobreexpresa, en comparación con una célula no enferma. La muerte celular *in vitro* se puede determinar en ausencia de células del complemento y células efectoras inmunitarias, para distinguir la muerte celular inducida por citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). De este modo, el ensayo para la muerte celular se puede llevar a cabo usando suero inactivado por calor (*es decir*, en ausencia de complemento) y en ausencia de células efectoras inmunitarias. La capacidad para inducir la muerte celular se puede evaluar con relación a células no tratadas mediante técnicas adecuadas, tales como pérdida de la integridad de la membrana según se evalúa mediante captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripán (véase Moore et al. Cytotechnology 17:1-11 (1995)) o 7AAD. En un aspecto específico, los antagonistas de hedgehog cinasa inductores de la muerte celular son aquellos que inducen la captación de PI en el ensayo de captación de PI en células BT474.

Las expresiones “trastorno proliferativo celular” y “trastorno proliferativo” se refieren a trastornos que están asociados con cierto grado de proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

“Tumor”, como se usa aquí, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásica, tanto maligno como benigno, y todas las células y tejidos cancerosos y precancerosos.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza

típicamente por el crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o cánceres linfoides.

Un tumor que “sobreexpresa” hedgehog, o en el que la señalización de hedgehog es “hiperactiva”, es aquel que tiene niveles significativamente más elevados de hedgehog en la superficie celular, o aquel en el que la señalización de hedgehog está activada en mayor medida, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo tisular. Tal sobreexpresión puede resultar de la amplificación génica o mediante aumento de la transcripción o traducción. Diversos ensayos de diagnóstico o de pronóstico miden la expresión potenciada de hedgehog, dando como resultado niveles incrementados en la superficie celular, o aquella que se segrega, tal como el ensayo inmunohistoquímico que usa el ligando anti-hedgehog o anticuerpos anti-receptor de hedgehog, análisis FACS, etc. Como alternativa, los niveles del ácido nucleico o ARNm que codifica hedgehog se pueden medir en la célula, *por ejemplo*, vía hibridación *in situ* fluorescente usando una sonda a base de ácido nucleico que corresponde a un ácido nucleico que codifica hedgehog o el complemento del mismo; (FISFH; véase el documento WO98/45479, publicado en octubre de 1998), transferencia Southern, transferencia Northern, o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). Como alternativa, la sobreexpresión de hedgehog se puede determinar midiendo el antígeno propagado en un fluido biológico, tal como suero, *por ejemplo*, usando ensayos a base de anticuerpos (véanse también, *por ejemplo*, la patente U.S. n° 4.933.294 expedida el 12 de junio de 1990; el documento WO 91/05264 publicado el 18 de abril de 1991; la patente U.S. 5.401.638 expedida el 28 de mayo de 1995; y Sias et al., J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)). Como alternativa, la actividad de hedgehog es determinable midiendo la expresión de ciertos informadores aguas abajo, por ejemplo el factor de transcripción Gli. Además de los ensayos anteriores, existen diversos ensayos *in vivo* para la persona experta. Por ejemplo, las células se pueden exponer dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está marcado opcionalmente con un marcador detectable, *por ejemplo*, un isótopo radioactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a las células en el paciente, *por ejemplo*, mediante barrido externo para determinar la radioactividad, o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al agente terapéutico.

Como se usa aquí, el término “inmuno adhesina” designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulinas. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del reconocimiento del antígeno y el sitio de unión de un anticuerpo (*es decir*, es “heteróloga”), y una secuencia del dominio constante inmunoglobulínico. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina es típicamente una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina se puede obtener de cualquier inmunoglobulina, tales como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD o IgM.

La palabra “marcador”, cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición detectable que está conjugado directa o indirectamente al anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica, para generar un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica “marcado”. El marcador puede ser detectable por sí mismo (*por ejemplo* marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes), o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar una alteración química de un compuesto o composición sustrato, que es detectable.

La expresión “agente citotóxico”, como se usa aquí, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. La expresión pretende incluir isótopos radiactivos (*por ejemplo*, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, enzimas y sus fragmentos, tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas tales como toxinas de pequeñas moléculas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o sus variantes, y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos descritos más abajo. A continuación se describen otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida provoca la destrucción de células tumorales.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen hidroxiurea taxanos (tales como paclitaxel y doxetaxel) y/o antibióticos antraciclínicos; agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinaona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictiina; espongiestatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreuro de óxido de clorometamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como antibióticos endiínicos (por

ejemplo caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma II y caliqueamicina omega II (véase, *por ejemplo*, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinamicina, incluyendo dinamicina A; una esperamicina; así como cromóforo neocarzinostatina y cromóforos antibióticos endiánicos cromoproteicos relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelotimida, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores de ácido fólico tales como ácido frolinico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; desfosfamina; demecolcina; diaziacuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una eptilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; Ionidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziacuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANETM libre de Cremofor, formulación de nanopartículas manipulada con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Anthony, Francia); cloranbucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatraxato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidores de topoisomerasas RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para el régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinado con 5-FU y leucovovina.

También se incluye en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear, o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer, y a menudo en forma de tratamiento sistémico o de todo el cuerpo. Pueden ser propiamente hormonas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores del receptor de estrógeno selectivos (SERMs), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno FARESTON®; anti-progesteronas; reductores del receptor de estrógenos (ERDs); agentes que funcionan para suprimir o apagar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) tales como LUPRON® y acetato de leuprolida ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y triptelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromataza que inhiben la enzima aromataza, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestanie, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, y anastrozol ARIMIDEX®. Además, tal definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos 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®; así como troxacitabina (un análogo citosínico de 1,3-dioxolán nucleósido); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo la vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®, ABARELIX® mrRH; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina cinasa dual de ErbB-2 y EGFR, también conocido como GW572016); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula con ruta hiperactiva de hedgehog, ya sea *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento puede ser aquel que reduzca significativamente el porcentaje de células que expresan hedgehog en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión de un ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la

5 detención de C y la detención de la fase M. Los bloqueantes clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también actuarán en la detención de la fase S, por ejemplo agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Se puede encontrar información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Regulación del ciclo celular, oncogenes, y fármacos antineoplásicos" por Murakami et al. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente p. 13. Los taxanos o hidroxiureataxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerosos derivados ambos del árbol del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Estas moléculas 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.

10 "Doxorubicina" es un antibiótico antraciclínico. El nombre químico completo de doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacendiona.

15 La expresión "inserto del envase" se usa para referirse a instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias referidas al uso de tales productos terapéuticos.

"Adenocarcinoma" se refiere a un tumor maligno originalmente del epitelio glandular.

20 "Células mesenquimatosas" son células de origen mesenquimatoso, incluyendo fibroblastos, células estrómicas, células del músculo liso, células del músculo esquelético, células de origen osteogénico tales como condrocitos, células de origen hematopoyético tales como monocitos, macrófagos, linfocitos, granulocitos, y células de origen adiposo, tales como adipocitos.

25 "Angiogénesis" es la formación de vasos sanguíneos, incluyendo tanto la formación de una nueva vasculatura o la alteración de un sistema vascular existente, que beneficia la perfusión tisular. Esto incluye tanto la formación de nuevos vasos mediante brote de células endoteliales a partir de vasos sanguíneos existentes, o la remodelación de vasos existentes para alterar el tamaño, madurez, las propiedades de dirección del flujo para mejorar la perfusión sanguínea del tejido. Aunque este último proceso se denomina algunas veces más específicamente como "arterogénesis", ambos procesos están envueltos por la definición ideada aquí. La angiogénesis es un proceso de múltiples etapas en el que las células endoteliales se degradan focalmente e invaden a través de su propia membrana de basamento, migran a través del estroma intersticial hacia un estímulo angiogénico, proliferan próximas a la punta migratoria, se organizan en vasos sanguíneos, y se vuelven a unir a membrana de basamento recientemente sintetizada. Folkman et al., *Cancer Res.* 43: 175-203 (1985).

30 "Carcinoma de célula basal" se refiere a una variedad de formas clínicas e histológicas de cánceres de tejidos de piel tales como nodular-ulcerativo, superficial, pigmentado, similar a morfea, fibroepitelioma y síndrome congénito.

35 "Heridas de quemadura" son lesiones en la piel que resultan de la exposición a calor o a agentes químicos.

40 "Carcinoma" se refiere a crecimiento maligno derivado de células epiteliales que tienden a metastatizarse a otras áreas del cuerpo. Los ejemplos incluyen "carcinoma de célula basal" – un tumor epitelial de la piel que, aunque rara vez metastatizante, puede dar como resultado invasión local y destrucción; "carcinoma de células escamosas" – tumores que surgen del epitelio escamoso y que tienen células cuboides; "carcinosarcoma" – tumores malignos que comprenden tejidos tanto carcinomatosos como sarcomatosos; "carcinoma adenocístico" – tumores caracterizados por grandes masas epiteliales que contienen espacios o quistes similares a glándulas redondas, que contienen frecuentemente moco, que están limitados en el borde por capas de células endoteliales; "carcinoma epidermoide" – véase carcinoma de células escamosas; "carcinoma nasofaríngeo" – tumor maligno que surge en el forro epitelial del espacio detrás de la nariz; "carcinoma de célula renal" – tumor en el parénquima renal compuesto de células tubulares en colocaciones variables. Crecimiento epitelial carcinomatoso adicional incluye "papilomas", que son tumores benignos derivados del epitelio y que tienen papilomavirus como agente etiológico; y "epidermoidomas", que son tumores cerebrales o meníngeos formados por inclusión de elementos ectodérmicos en el momento del cierre de la ranura neural.

50 "Corio" o "dermis" se refiere a la capa de la piel que está más profunda que la epidermis, que consiste en un lecho denso de tejido conjuntivo vascular, y que contiene los nervios y órganos terminales de las sensaciones. Las raíces de los pelos y las glándulas sebáceas y sudoríparas son estructuras de la epidermis que están profundamente embebidas en la dermis.

55 "Úlceras dérmicas de la piel" se refiere a lesiones en la piel provocadas por pérdida superficial de tejido, habitualmente con inflamación. Las úlceras dérmicas de la piel que se pueden tratar mediante el método de la presente invención incluyen úlceras de decúbito, úlceras diabéticas, úlceras de insuficiencia venosa y úlceras arteriales. Las heridas de decúbito son úlceras crónicas que resultan de la aplicación de presión a la piel durante

períodos prolongados de tiempo. Estos tipos de heridas también se denominan como úlceras de cama o úlceras por presión. Las úlceras de insuficiencia venosa resultan del estancamiento de la sangre u otros fluidos de venas defectuosas. Las úlceras arteriales se refieren a piel necrótica en el área alrededor de arterias que tienen un mal flujo sanguíneo.

5 “Epitelios”, “epitelial” y “epitelio” se refieren al recubrimiento celular de superficies corporales internas y externas (cutánea, mucosa o serosa), incluyendo las glándulas y otras estructuras derivadas de ellas, *por ejemplo*, células córneas, esofágicas, epidérmicas, y células epiteliales del folículo piloso. Otro tejido epitelial ejemplar incluye: epitelio olfativo – el epitelio pseudoestratificado que forra la región olfativa de la cavidad nasal, y que contiene los receptores para el sentido del olfato; epitelio glandular – el epitelio compuesto de epitelio escamoso de células secretoras; epitelio escamoso – el epitelio que comprende una o más capas celulares, la más superficial de las cuales está compuesta de células planas, similares a escamas o similares a placas. Epitelio también se puede referir a epitelio de transición, como aquel que se encuentra característicamente forrando organismos huecos que están sujetos a gran cambio mecánico debido a contracción y distensión, *por ejemplo*, tejido que representa una transición entre epitelio escamoso estratificado y columnar.

15 “Glándula epidérmica” se refiere a una agregación de células asociadas con la epidermis y especializadas para segregar o excretar materiales no relacionados con sus necesidades metabólicas normales. Por ejemplo, las “glándulas sebáceas” son glándulas holocrinas en el corio que segregan una sustancia oleosa y sebo. La expresión “glándulas sudoríparas” se refiere a glándulas que segregan sudor, y que están situadas en el corio o tejido subcutáneo.

20 “Epidermis” se refiere a la capa más externa protectora y no vascular de la piel.

“Heridas de corte” incluyen rasgaduras, abrasiones, cortes, punciones o laceraciones en la capa epitelial de la piel, y se pueden extender a la capa dérmica y más profundamente, y resultan de procedimientos quirúrgicos o penetración accidental de la piel.

25 El “estado de crecimiento” de una célula se refiere a la tasa de proliferación de la célula y/o el estado de diferenciación de la célula. Un “estado de crecimiento alterado” es un estado de crecimiento caracterizado por una tasa anormal de proliferación, *por ejemplo*, una célula que presenta una tasa incrementada o disminuida de proliferación con relación a una célula normal.

30 El término “hedgehog” o “polipéptido de hedgehog” (Hh) se usa aquí para referirse genéricamente a cualquiera de los homólogos mamíferos del hedgehog de *Drosophila*, es decir, Sonic hedgehog (Shh), Desert hedgehog (Dhh) o Indian hedgehog (Ihh). El término se puede usar para describir proteína o ácido nucleico.

35 Las expresiones “ruta de señalización de hedgehog”, “ruta de hedgehog” y “ruta de transducción de señales de hedgehog”, como se usan aquí, se refieren de forma intercambiable a la cascada de señalización mediada por hedgehog y sus receptores (*por ejemplo*, *patched*, *patched-2*) y que da como resultado cambios de expresión génica y otros cambios fenotípicos típicos de la actividad de hedgehog. La ruta de hedgehog se puede activar en ausencia de hedgehog mediante activación de un componente aguas abajo (*por ejemplo*, sobreexpresión de *Smoothed* o transfecciones con mutantes *Smoothed* o *Patched* para dar como resultado la activación constitutiva de la señalización de hedgehog en ausencia de hedgehog). Los factores de transcripción de la familia *Gli* se usan a menudo como marcadores o indicadores de la activación de la ruta de hedgehog.

40 La expresión “componente de señalización de hedgehog (Hh)” se refiere a productos génicos que participan en la ruta de señalización de Hh. Un componente de señalización de Hh frecuentemente afecta de manera material o sustancial la transmisión de la señal de Hh en células o tejidos, afectando de ese modo los niveles de expresión génica aguas abajo y/u otros cambios fenotípicos asociados con la activación de la ruta de hedgehog. Cada componente de señalización de Hh, que depende de su función biológica y afecta al resultado final de la activación o expresión génica aguas abajo, se pueden clasificar como reguladores positivos o negativos. Un regulador positivo es un componente de señalización de Hh que afecta positivamente a la transmisión de la señal de Hh, es decir, estimula sucesos biológicos aguas abajo cuando está presente Hh. Un regulador negativo es un componente de señalización de Hh que afecta negativamente la transmisión de la señal de Hh, es decir, inhibe sucesos biológicos aguas abajo cuando está presente Hh.

50 La expresión “ganancia de función de hedgehog” se refiere a una modificación o mutación aberrante de un componente de señalización de hedgehog (*por ejemplo*, *ptch*, *Smo*, *Fused*, *Su(fu)*, etc.) o una disminución (o pérdida) en el nivel de expresión para tal gen, que da como resultado un fenotipo que se asemeja a poner en contacto una célula con una proteína hedgehog, *por ejemplo*, activación aberrante de una ruta de hedgehog. La ganancia de función puede incluir una pérdida de la capacidad del producto génico *ptch* para regular el nivel de expresión de los factores de activación de la transcripción *Gli1*, *Gli2* y/o *Gli3*. La expresión “ganancia de función de hedgehog” también se usa aquí para referirse a cualquier fenotipo celular similar (*por ejemplo*, que muestra proliferación excesiva) que se produce debido a una alteración en cualquier parte en la ruta de transducción de señales de hedgehog, incluyendo, pero sin limitarse a, una modificación o mutación de la propia hedgehog. Por

ejemplo, una célula tumoral con una tasa anormalmente elevada de proliferación para la activación de la ruta de señalización de hedgehog tendría un fenotipo de “ganancia de función de hedgehog”, incluso si hedgehog no está mutada en esa célula.

5 “Tejido epitelial interno” se refiere a tejido dentro del cuerpo que tiene características similares a la capa epidérmica de la piel (*por ejemplo*, el forro del intestino).

“Queratosis” se refiere a un trastorno proliferativo de la piel caracterizado por hiperplasia de la capa córnea de la epidermis. Los ejemplos de trastornos queratósicos incluyen: queratosis folicular, queratosis palmar y plantar, queratosis faríngea, queratosis pilosa, y queratosis actínica.

10 “Cuerpos laminados” se refiere a una estructura subcelular encontrada en células pulmonares que producen tensioactivos. Se cree que los cuerpos laminados son la fuente de la biosíntesis de tensioactivos pulmonares.

El término “sobrexpresión”, como se usa aquí, se refiere a niveles celulares de expresión génica de un tejido que son mayores que los niveles de expresión normal para ese tejido.

15 La expresión “pérdida de función de patched” se refiere a una modificación o mutación aberrante de un gen *ptch*, o una reducción del nivel de expresión del gen, que da como resultado un fenotipo que se asemeja a la puesta en contacto de la célula con una proteína de hedgehog, *por ejemplo*, activación aberrante de una ruta de hedgehog. La pérdida de función puede incluir una pérdida de la capacidad del producto del gen *ptch* para regular el nivel de expresión de los factores de activación de la transcripción Gli1, Gli2 y/o Gli3.

20 La expresión “ganancia de función de *smoothened*” se refiere a una modificación o mutación aberrante de un gen *Smo*, o a la capacidad de un producto génico de *ptch* de unirse a *Smo* y suprimir de ese modo la señalización de hedgehog, que da como resultado un fenotipo que se asemeja a la activación de la ruta de hedgehog con hedgehog, *por ejemplo* activación aberrante de una ruta de hedgehog.

El término “proliferante” y “proliferación” se refiere a células que sufren mitosis.

25 La expresión “trastorno proliferativo de la piel” se refiere a cualquier enfermedad/trastorno de la piel marcado por la proliferación indeseada o aberrante de tejido cutáneo. Tales afecciones se caracterizan típicamente por proliferación epidérmica o diferenciación celular incompleta, e incluyen, *por ejemplo*, ictiosis relacionada con el cromosoma X, psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis alérgica por contacto, hiperqueratosis epidermolítica, y dermatitis seborreica. *Por ejemplo*, la epidermodisplasia es una forma de desarrollo defectuoso de la epidermis. Otro ejemplo es “epidermólisis”, que se refiere a un estado suelto de la epidermis con formación de vesículas y ampollas ya sea espontáneamente o en el sitio del trauma.

30 “Psoriasis” se refiere a un trastorno crónico, recurrente, inflamatorio, hiperproliferativo de la piel, que altera los mecanismos reguladores de la piel. En particular, se forman lesiones que implican alteraciones primarias y secundarias en la proliferación epidérmica, respuestas inflamatorias de la piel, y una expresión de moléculas reguladoras tales como linfocinas y factores inflamatorios. La piel psoriásica se caracteriza morfológicamente por un recambio aumentado de células epidérmicas, epidermis más gruesa, queratinización anormal, infiltrados celulares inflamatorios en la capa de la dermis e infiltración de leucocitos polimorfonucleares en la capa de la epidermis que da como resultado un incremento en el ciclo de células basales. Hay cinco tipos, cada uno con signos y síntomas únicos. El más común es la psoriasis en placas, que es el tipo más común de psoriasis, el más comúnmente caracterizado como parches de piel rojiza levantada cubierta por escamas blancas plateadas, que aparece en los codos, rodillas, parte inferior de la espalda, y cuero cabelludo. Los otros tipos son (i) psoriasis en gota, caracterizada por puntos rojos pequeños sobre la piel, (ii) psoriasis pustular, caracterizada por pústulas blancas rodeadas de piel roja, (iii) psoriasis inversa, caracterizada por lesiones rojas suaves en plegamientos de la piel, y (iv) psoriasis eritrodérmica, caracterizada por enrojecimiento extendido, picazón severa, y dolor.

45 “Dermatitis atópica” (AD) (eccema) es una enfermedad prurítica de origen desconocido que está tipificada por prurito, lesiones eccematosas, xerosis (piel seca) y liquenización en la piel (engrosamiento de la piel e incremento de las marcas de la piel). AD está asociada con otras enfermedades atópicas (*por ejemplo*, asma, rinitis alérgica, urticaria, reacciones alérgicas agudas a alimentos, producción incrementada de IgE) en muchos pacientes. AD también se puede precipitar en individuos alérgicos por exposición a alérgenos tales como pólenes, alimentos, caspa, venenos de insectos y toxinas de plantas.

50 “Piel” se refiere a la cubierta exterior protectora del cuerpo, que consiste en el corio y la epidermis, incluyendo las glándulas sudoríparas y sebáceas, así como las estructuras de folículos pilosos.

“Carcinoma de células pequeñas” se refiere a neoplasias malignas de los bronquios. Las células de tales tumores tienen características similares a células endocrinas, y pueden segregar una o más de una amplia variedad de hormonas, especialmente péptidos reguladores tales como bombesina.

“Urogenital” se refiere a los órganos y tejidos del aparato urogenital, que incluye entre otros tejidos, la próstata, uréter, riñón, y vejiga. Un “cáncer urogenital” es un cáncer de un tejido urogenital.

Tabla 1

Referencia	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXXXXYYYYYYY	(Longitud = 15 aminoácidos)
% de identidad de secuencia de aminoácidos	=	

(el número de restos de aminoácidos idénticamente equivalentes entre las dos secuencias polipeptídicas según se determina mediante ALIGN-2) dividido entre (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido de referencia) = 5 dividido entre 15 = 33,3%

5

Tabla 2

Referencia	XXXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXXXXYYYYYYZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)
% de identidad de secuencia de aminoácidos	=	

(el número de restos de aminoácidos idénticamente equivalentes entre las dos secuencias polipeptídicas según se determina mediante ALIGN-2) dividido entre (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido de referencia) = 5 dividido entre 10 = 50%

Tabla 3

ADN de Referencia	NNNNNNNNNNNNNN	(Longitud = 14 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNNNLLLLLLLLLL	(Longitud = 16 nucleótidos)
% de identidad de secuencia de ácido nucleico	=	

(el número de nucleótidos idénticamente equivalentes entre las dos secuencias de ácidos nucleicos según se determina mediante ALIGN-2) dividido entre (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico del ADN de referencia) = 6 dividido entre 14 = 42,9%

Tabla 4

ADN de Referencia	NNNNNNNNNNNN	(Longitud = 12 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNLLLVV	(Longitud = 9 nucleótidos)
% de identidad de secuencia de ácido nucleico	=	

(el número de nucleótidos idénticamente equivalentes entre las dos secuencias de ácidos nucleicos según se determina mediante ALIGN-2) dividido entre (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico del ADN de referencia) = 4 dividido entre 12 = 33,3%

10 III. Métodos de antagonistas de hedgehog

Las proteínas de hedgehog (Hh) son morfógenos que actúan de una manera de corto o largo alcance gobernando el crecimiento celular y la formación de patrones durante el desarrollo. Ogden et al., *Biochem Pharmacol.* 67: 805 (2004); Huangfu et al., *Development* 133: 3 (2006); Jia et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (11): 1249-1265 (2006). En mamíferos, hay tres proteínas Hh: Sonic hedgehog (Shh), Desert hedgehog (Dhh), e Indian hedgehog (Ihh). En células que reciben la señal de Hh (Figura 4a), la activación de la ruta se inicia cuando el ligando de Hh se une a Patched (Ptch1), un receptor transmembránico que cruza doce veces la membrana, aliviando su inhibición de

15

Smoothened (Smo), una proteína transmembránica que cruza siete veces la membrana. Huang et al., *más arriba*, Jia et al., *más arriba*, Stone et al., Nature 384: 129-133 (1996). La activación de Smo conduce a sucesos de señalización aguas abajo y la activación de la familia asociada a glioma (Gli) de factores de transcripción de dedo de cinc. Kasper et al., Eur. J. Cancer 42: 437 (2006). En ausencia de señalización de Hh, las proteínas cinasas, tales como proteína cinasa A (Pka), glucógeno sintasa cinasa 3b (Gsk3b), y caseína cinasa 1 (Ck1), fosforilan Gli, conduciendo a la escisión de Gli, mediada por proteosoma, en una forma truncada NH2-terminal, que actúa como un represor de la expresión del gen diana de Hh. Chen et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95: 2349 (2006); Price et al., Cell 108: 823 (2002); Price et al., Development 126: 4331 (1999); Ji et al., Nature 416: 548 (2002). El supresor de fused (Sufu) actúa como otro regulador negativo de la ruta mediante la unión a Gli, tanto en el citoplasma como en el núcleo, para evitar que active genes diana de Hh. Cheng et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99: 5442 (2002); Kogerman et al., Nat. Cell Biol. 1: 312 (1999); Ding et al., Curr. Biol. 9: 1119 (1999); Pearse et al., Dev. Biol. 212: 323 (1999).

En células de mamíferos, sigue sin estar claro cómo la señal de Hh es transmitida desde Smo a Gli (Figura 5A). En *Drosophila*, se piensa que la cinasa Fused (Fu) y la molécula similar a cinesina Costal 2 (Cos2) transmiten la señal desde Smo hasta el homólogo de Gli Cubitus interruptus (Ci) de la mosca. Lum et al., Mol. Cell 12: 1261 (2003); Jia et al., Genes Dev. 17: 2709 (2003); Ruel et al., Nat. Cell Biol. 5: 907 (2003); Ogden et al., Curr. Biol. 13:1998 (2006). Sin embargo, en mamíferos, este mecanismo no está claramente conservado, puesto que ni los ortólogos de mamífero de Cos2 o Fu son necesarios para transducir la señal de Hh. Merchant et al., Mol. Cell. Biol. 25: 7054 (2005); Chen et al., Mol. Cell Biol. 25: 7042 (2005), Varjosalo et al., Dev. Cell. 10: 177 (2006). Además, la cola carboxiterminal de Smo de la mosca requerida para la señalización y unión a Fu y Cos2 [Lum et al., *más arriba*, Jia et al., *más arriba*], no está conservada en Smo de mamífero, sugiriendo que Smo de mamífero interactúa con nuevos componentes para transmitir la señal de Hh.

Por el contrario, estudios recientes han demostrado que la señalización de Hh de mamíferos requiere la presencia de un cilio no móvil. Huang et al., Nature 426: 83 (2006); Huang et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 102: 11325 (2005); May et al., Dev. Biol. 287: 378 (2005); Corbit et al., Nature 437: 1018 (2005); Haycraft et al., PLoS Genet 1: e53 (2005). Estudios genéticos en ratones revelaron que la interrupción de un número de componentes del transporte intraflagelar (IFT) anterógrado o retrógrado conduce a defectos en la formación del patrón del tubo neural y de desarrollo de las extremidades, provocados por una señalización alterada de Hh entre Smo y Gli. Huang et al., (2006), *más arriba*, Huang et al., (2005), *más arriba*, May et al., *más arriba*. Además, se encuentra un número de componentes de la ruta, incluyendo Smo, Sufu, y las tres proteínas Gli, en la punta de los cilios durante la señalización de Hh. May et al., *más arriba*, Corbit et al., *más arriba*, Haycraft et al., *más arriba*. Liu et al., Development 132: 1679 (2003). De este modo, parece que los cilios son un mediador importante de la señalización de Hh en mamíferos. En *Drosophila*, los cilios no son necesarios para la señalización de Hh [Avidor-Reiss et al., Cell 117: 527 (2004); Han et al., Curr. Biol. 13: 1679 (2003)], proporcionando pruebas adicionales para la divergencia en la ruta de Hh entre moscas y mamíferos.

Debido a la trascendencia de la señalización de Hh en cáncer, es importante identificar dianas farmacéuticas candidatas adicionales en esta ruta. Para desvelar nuevas cinasas que desempeñan un papel en la señalización de Hh de mamíferos, se identificó una cinoteca de ARNip de ratón, que incluyó todas las cinasas así como algunas proteínas reguladoras de cinasas, en ensayos a base de células diseñados para recapitular la señalización de Hh (Figura 5A y 5C). En primer lugar se desarrolló un ensayo de alto rendimiento (Figura 5C) para monitorizar la inducción de la ruta de Hh utilizando la estirpe de células mesenquimales C3H10T1/2 murina que se ha usado como modelo para estudiar la señalización de Hh. Esta estirpe celular se manipuló mediante ingeniería para expresar de forma estable un informador de luciferasa inducible por Hh, que consiste en ocho sitios de unión a Gli que conducen la expresión de un ADNc que codifica la luciferasa de luciérnaga, y se denomina como S12. Frank-Kamenetsky et al., J. Biol. 1: 10 (2002). En ausencia de Shh, las células S12 producen cantidades basales de luciferasa (Figura 5B). Con la adición de Shh, se activa la ruta de Hh y la expresión de luciferasa aumenta hasta 15 veces (Figura 5B). Por el contrario, las células tratadas con ARNip frente a Smo y después estimuladas con Shh son defectuosas en la acumulación de luciferasa (Figura 5B).

Angiogénesis

Puesto que se sabe que hedgehog estimula la angiogénesis, es de esperar que los antagonistas de hedgehog cinasas, que inhiben la actividad de hedgehog, inhiban la angiogénesis, particularmente cuando cierto nivel de señalización de hedgehog es un prerrequisito necesario para la angiogénesis. La angiogénesis es fundamental para muchos trastornos. La angiogénesis desregulada, persistente, se produce en un abanico de estados mórbidos, metástasis tumorales y crecimientos anormales por células endoteliales. La vasculatura creada como resultado de procesos angiogénicos soporta el daño patológico observado en estas enfermedades.

Las enfermedades asociadas con o que resultan de angiogénesis incluyen: crecimiento tumoral, metástasis tumoral o crecimientos anormales por células endoteliales, incluyendo enfermedad neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, retinopatía de premadurez, rechazo de injerto córneo, glaucoma neovascular, fibroplasias retrolenticulares, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de vitamina A, sobredesgaste

de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, terigión, queratitis seca, síndrome de Sjogren, acné rosácea, flictenulosis, sífilis, infecciones por micobacterias, degeneración lipídica, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por herpes simple, infecciones por herpes zóster, infecciones por protozoos, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis marginal, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliartritis, trauma, granulomatosis de Wegener, sarcoidosis, escleritis, síndrome de Stevens-Johnson, penfingoide, queratotomía radial, rechazo de injerto córneo, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliartritis, trauma, granulomatosis de Wegener, sarcoidosis, escleritis, síndrome de Stevens-Johnson, penfingoide, queratotomía radial, rechazo de injerto córneo, artritis reumatoide, osteoartritis, inflamación crónica (*por ejemplo* colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn), hemangioma, enfermedad de Osler-Weber-Rendu, y telangiectasia hemorrágica hereditaria.

La angiogénesis desempeña un papel crítico en cáncer. Un tumor no se puede expandir sin un suministro de sangre para proporcionar nutrientes y eliminar desechos celulares. Los tumores en los que la angiogénesis es importante incluyen tumores sólidos tales como rabdomiosarcomas, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, osteosarcoma, y tumores benignos tales como neuroma acústico, neurofibroma, tracoma y granulomas piogénicos. Se han encontrado factores angiogénicos asociados con varios tumores sólidos, y la prevención de la angiogénesis podría detener el crecimiento de estos tumores y el daño resultante al animal debido a la presencia del tumor. La angiogénesis está también asociada con tumores portados por la sangre, tales como leucemias, cualquiera de las diversas enfermedades neoplásicas agudas o crónicas de la médula ósea en las que se produce la proliferación no restringida de glóbulos blancos, habitualmente acompañada por anemia, coagulación alterada de la sangre, y alargamiento de los ganglios linfáticos, hígado, y bazo. Se cree que la angiogénesis desempeña un papel en las anomalías en la médula ósea, que dan lugar a tumores semejantes a leucemia.

Además del crecimiento tumoral, la angiogénesis es importante en la metástasis. Inicialmente, la angiogénesis es importante en la vascularización del tumor, lo que permite que las células cancerosas entren en el torrente sanguíneo y circulen por todo el cuerpo. Después que las células tumorales han abandonado el sitio primario, y se han asentado en el sitio metastásico secundario, la angiogénesis se debe de producir antes de que el nuevo tumor pueda crecer y expandirse. Por lo tanto, la prevención de la angiogénesis podría conducir a la prevención de metástasis de tumores, y posiblemente contener el crecimiento neoplásico en el sitio primario.

La angiogénesis también está implicada en procesos fisiológicos normales, tales como la reproducción y la curación de heridas. La angiogénesis es una etapa importante en la ovulación, y también en la implantación de la blástula tras la fertilización. La prevención de la angiogénesis se podría usar para inducir amenorrea, para bloquear la ovulación, o prevenir la implantación por la blástula.

Función hepática

Los antagonistas de hedgehog cinasas descritos son útiles para el tratamiento y/o la prevención del síndrome disneico u otros trastornos que resultan de la tensión superficial pulmonar inapropiada. El síndrome disneico resulta de tensoactivo insuficiente en los alvéolos de los pulmones. Los pulmones de vertebrados contienen tensoactivo, una mezcla compleja de lípidos y proteína que provoca que aumente la tensión superficial durante el inflamamiento del pulmón, y disminuya durante el desinflamamiento pulmonar. Durante el desinflamamiento pulmonar, el tensoactivo disminuye de manera que no hay fuerzas superficiales que de otro modo evitarían el colapso alveolar. Los alvéolos aireados que no se han colapsado durante la espiración permiten el transporte continuo de oxígeno y de dióxido de carbono entre la sangre y el gas alveolar, y requieren mucha menos fuerza para inflarse durante la inspiración subsiguiente. Durante el inflamamiento, el tensoactivo pulmonar aumenta la tensión superficial a medida que aumenta las áreas superficiales alveolares. Una tensión superficial cada vez mayor en los alvéolos que se expanden se opone al sobreinflamamiento en aquellos espacios aéreos, y tiende a desviar el aire inspirado hacia alvéolos mucho menos aireados, facilitando de ese modo incluso la aireación pulmonar.

El síndrome disneico es particularmente prevalente entre lactantes prematuros. El tensoactivo pulmonar se sintetiza normalmente a una tasa muy baja hasta las últimas seis semanas de vida fetal. Los lactantes humanos nacidos más de seis semanas antes del plazo normal de embarazo tienen un riesgo elevado de nacer con cantidades inadecuadas de tensoactivo pulmonar y tasas inadecuadas de síntesis de tensoactivo. Cuanto más prematuramente nace un lactante, más grave es probable que sea la deficiencia de tensoactivo. Una deficiencia de tensoactivo grave puede conducir a insuficiencia respiratoria en unos pocos minutos u horas del nacimiento. La deficiencia de tensoactivo produce colapso progresivo de los alvéolos (atelectasia) debido a la capacidad cada vez menor del pulmón para expandirse a pesar del máximo esfuerzo inspiratorio. Como resultado, cantidades inadecuadas de oxígeno alcanzan a la sangre del lactante. El RDS también puede aparecer en adultos, típicamente como consecuencia de fallo en la biosíntesis de tensoactivo.

El tejido pulmonar de lactantes prematuros muestra una actividad elevada de la ruta de señalización de hedgehog. La inhibición de esta ruta usando antagonista de hedgehog aumenta la formación de cuerpos laminados, e incrementa la expresión de genes implicados en la biosíntesis de tensoactivo. Los cuerpos laminados son estructuras subcelulares asociadas con la biosíntesis de tensoactivo. Por estas razones, el tratamiento de lactantes

prematuros con un antagonista de hedgehog debería estimular la biosíntesis de tensioactivo y mejorar el RDS. En casos en los que el RDS del adulto esté asociado con la activación de la ruta de hedgehog, el tratamiento con un antagonista de hedgehog cinasas debería ser también efectivo.

Trastornos que resultan de la señalización hiperactiva de hedgehog

5 Los antagonistas de hedgehog cinasas de la invención se pueden dirigir específicamente a trastornos en los que el tejido y/o células afectadas muestran una activación elevada de la ruta de hedgehog. La expresión de genes *gli* activados por la ruta de señalización de hedgehog, incluyendo *gli-1*, *gli-2* y *gli-3*, se correlaciona muy consistentemente con la señalización de hedgehog a lo largo de un amplio intervalo de tejidos y trastornos, mientras que *gli-3* lo está en cierto modo menos. Los genes *gli* codifican factores de transcripción que activan la expresión de muchos genes necesarios para provocar los efectos completos de la señalización de hedgehog. Sin embargo, los factores de transcripción para *Gli-3* también pueden actuar como un represor de los genes efectores de hedgehog, y por lo tanto la expresión de *gli-3* puede provocar un efecto reducido de la ruta de señalización de hedgehog. El hecho de que *gli-3* actúe como activador o represor transcripcional depende de sucesos post-traduccionales, y por lo tanto se espera que los métodos para detectar la forma activante (frente a la forma represora) de la proteína *Gli-3* también serían una medida fiable de la activación de la ruta de hedgehog. El gen *gli-1* es expresado fuertemente en un amplio conjunto de cánceres, hiperplasias y pulmones inmaduros, y sirve como un marcador para la activación relativa de la ruta de hedgehog. Además, los tejidos tales como pulmón inmaduro, que tienen una expresión elevada del gen *gli*, se ven afectados fuertemente por inhibidores de hedgehog. En consecuencia, se contempla que la detección de la expresión del gen *gli* se puede usar como una herramienta predictiva poderosa para identificar tejidos y trastornos que se beneficiarán particularmente del tratamiento con un antagonista de hedgehog.

Los niveles de expresión de *gli-1* se pueden detectar mediante detección directa del transcrito, o mediante detección de los niveles o actividad proteica. Los transcritos se pueden detectar usando cualquiera de un amplio abanico de técnicas que dependen principalmente de la hibridación o sondas para los transcritos de *gli-1* o para los ADNc sintetizados a partir de ellos. Las técnicas bien conocidas incluyen transferencia Northern, PCR de transcriptasa inversa y análisis de micromatrices de niveles de transcrito. Los métodos para detectar los niveles de la proteína *Gli* incluyen transferencia Western, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D SDS-PAGE – preferiblemente comparado frente a un patrón en el que se ha determinado la posición de las proteínas *Gli*), y espectroscopía de masas. La espectroscopía de masas se puede acoplar 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 espectroscopía de masas y 2D SDS-PAGE también se pueden usar para identificar modificaciones post-transcripcionales de proteínas, incluyendo sucesos proteolíticos, ubiquitinación, fosforilación, modificación de lípidos, etc. La actividad de *Gli* también se puede evaluar analizando la unión a ADN sustrato o la activación transcripcional in vitro de promotores diana. El ensayo de desplazamiento de gel, los ensayos de huellas de ADN y los ensayos de reticulación de ADN con proteína son todos ellos métodos que se pueden usar para evaluar la presencia de una proteína capaz de unirse a sitios de unión a *Gli* en el ADN. *J Mol. Med* 77(6):459-68 (1999); *Cell* 100(4): 423-34 (2000); *Development* 127(19): 4923-4301 (2000).

Los niveles del transcrito de *gli* se pueden medir, y los tejidos enfermos o trastornados que muestran niveles anormalmente elevados de *gli* se pueden tratar con un antagonista de hedgehog cinasa. En otras realizaciones, se sabe que la afección que se está tratando tiene una correlación significativa con la activación aberrante de la ruta de hedgehog, incluso aunque no se realice una medición de los niveles de expresión de *gli* en el tejido que se esté tratando. El tejido pulmonar prematuro, los cánceres de pulmón (*por ejemplo*, adenocarcinomas, adenocarcinoma broncoalveolar, carcinomas de células microcíticas), los cánceres de mama (*por ejemplo*, carcinomas ductales inferiores, carcinomas lobulares inferiores, carcinomas tubulares), los cánceres de próstata (*por ejemplo*, adenocarcinomas), y las hiperplasias prostáticas benignas muestran todos ellos niveles de expresión de *gli-1* fuertemente elevados en ciertos casos. En consecuencia, los niveles de expresión de *gli-1* son un dispositivo de diagnóstico poderoso para determinar cuáles de estos tejidos se deberían tratar con un antagonista de hedgehog cinasa. Además, hay pruebas correlativas sustanciales de que los cánceres de las células uroteliales (*por ejemplo*, cáncer de vejiga, otros cánceres urogenitales) también tendrán en ciertos casos niveles elevados de *gli-1*. Por ejemplo, se sabe que la pérdida de heterocigosidad en cromosomas 9q22 es habitual en cánceres de vejiga. El gen *ptch-1* está situado en esa posición, y la pérdida de función de *ptch-1* es probablemente una causa parcial de la hiperproliferación, como en muchos otros tipos de cáncer. En consecuencia, tales cánceres también mostrarían una expresión elevada de *gli*, y serían particularmente susceptibles de ser tratados con un antagonista de hedgehog.

La expresión de *ptch-1* y *ptch-2* también es activada por la ruta de señalización de hedgehog, pero no típicamente en el mismo grado que los genes *gli*, y como resultado son inferiores a los genes *gli* como marcadores de la activación de la ruta de hedgehog. En ciertos tejidos, sólo se expresa uno de *ptch-1* o *ptch-2*, aunque la ruta de hedgehog es muy activa. Por ejemplo, en el desarrollo testicular, desert hedgehog desempeña un papel importante y la ruta de hedgehog está activada, pero sólo se expresa *ptc-2*. En consecuencia, estos genes pueden ser individualmente poco fiables como marcadores para la activación de la ruta de hedgehog, aunque en la medida simultánea de ambos genes se contempla como un indicador más útil para tejidos a tratar con un antagonista de

hedgehog.

Debido a que *gli* está tan expresado ubicuamente durante la activación de hedgehog, cualquier grado de sobreexpresión de *gli* debería ser útil para determinar que un antagonista de hedgehog cinasa será un compuesto terapéutico efectivo. *gli* se debería expresar a un nivel al menos dos veces tan alto como el normal. La expresión es cuatro, seis, ocho o diez veces tan alto como el normal.

A la luz de la amplia implicación de la señalización de hedgehog en la formación de disposiciones espaciales ordenadas de tejidos diferenciados invertebrados, los antagonistas de hedgehog cinasa de la presente invención se podrían usar en un proceso para generar y/o mantener un conjunto de diferentes tejidos vertebrados tanto *in vitro* como *in vivo*. El antagonista de hedgehog cinasa, ya sea inductivo o anti-inductivo con respecto a la proliferación o diferenciación de un tipo tisular dado, puede ser, según sea apropiado, cualquiera de las preparaciones descritas anteriormente.

Cultivo de células neuronales

Los antagonistas de hedgehog cinasa de la presente invención son aplicables además a técnicas de cultivo celular en las que es deseable la reducción en la señalización de hedgehog. Los sistemas de cultivo neuronal *in vitro* han demostrado ser herramientas fundamentales e indispensables para el estudio del desarrollo neuronal, así como la identificación de factores neurotróficos tales como el factor de crecimiento de nervios (NGF), factores tróficos ciliares (CNTF), y factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). El uso del presente método puede ser en cultivo de células madre neuronales, tales como en el uso de tales cultivos para la generación de nuevas neuronas y gliocitos. Estos cultivos se pueden poner en contacto con antagonistas de hedgehog cinasa a fin de alterar la tasa de proliferación de células madre neuronales en el cultivo, y/o alterar la tasa de diferenciación, o para mantener la integridad de un cultivo de ciertas células neuronales terminalmente diferenciadas. En una realización ejemplar, el presente método se puede usar para cultivar ciertos tipos de neuronas (*por ejemplo*, neuronas sensoriales, neuronas motoras). Tales cultivos neuronales se pueden usar como sistemas de ensayo convenientes así como fuentes de células implantables para tratamientos terapéuticos.

Los antagonistas de hedgehog cinasa de la presente invención son aplicables además al injerto intracerebral, un tratamiento emergente para trastornos del sistema nervioso central. Por ejemplo, un enfoque para reparar tejidos cerebrales dañados implica el trasplante de células de animales fetales o neonatales en el cerebro adulto. Dunnett et al., J. Exp. Biol. 123: 265-289 (1987). Las neuronas fetales de una variedad de regiones cerebrales se pueden incorporar con éxito en el cerebro adulto, y tales injertos pueden aliviar los defectos de comportamiento. Por ejemplo, el trastorno de movimiento inducido por lesiones de proyecciones dopaminérgicas a los ganglios basales se puede evitar mediante injertos de neuronas dopaminérgicas embrionarias. Las funciones cognitivas complejas que se ven alteradas después lesiones de la neocorteza también se pueden restaurar parcialmente mediante injertos de células corticales embrionarias. El actual método se puede usar para regular el estado de crecimiento en el cultivo, o cuando se use tejido fetal, especialmente células madre neuronales, se puede usar para alterar la tasa de diferenciación de las células madre.

Las células madre útiles en los métodos descritos se conocen generalmente. Por ejemplo, se han identificado varias células de la cresta neural, algunas de las cuales son multipotentes y probablemente representan células de la cresta neural no comprometidas, y otras pueden generar sólo un tipo de célula, tal como neuronas sensoriales, y probablemente representan células progenitoras comprometidas. El papel de los antagonistas de hedgehog empleados en el presente método para cultivar tales células madre puede ser para regular la diferenciación de la progenitora no comprometida, o para regular la restricción posterior del destino de desarrollo de una progenitora comprometida, o para regular la restricción posterior del destino de desarrollo de una célula progenitora comprometida con relación a convertirse en una célula neuronal terminalmente diferenciada. Por ejemplo, el presente método se puede usar *in vitro* para regular la diferenciación de células de la cresta neural en gliocitos, células de Schwann, células de cromafina, neuronas colinérgicas, simpáticas o parasimpáticas, así como neuronas peptidérgicas y serotoninérgicas. El antagonista de hedgehog cinasa se puede usar solo, o en combinación con otros factores neurotróficos que actúan para potenciar más particularmente un destino de diferenciación particular de la célula progenitora neuronal.

Regulación del crecimiento y diferenciación neuronales

Además de usar los antagonistas de hedgehog cinasa de la presente invención en combinación con el implante de cultivos celulares, otro aspecto de la presente invención se refiere a la aplicación terapéutica de antagonistas de hedgehog cinasa para regular el estado de crecimiento de neuronas y otras células neuronales tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico. La capacidad del componente de la ruta de hedgehog (*por ejemplo*, *ptch*, hedgehog, y *smoothed*) para regular la diferenciación neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso, y también presumiblemente en el estado adulto, indica que, en ciertos casos, se puede esperar que los presentes antagonistas de hedgehog cinasa faciliten el control de neuronas adultas con respecto al mantenimiento, comportamiento funcional y envejecimiento de células normales; procesos de reparación y regeneración en células

5 lesionadas química o mecánicamente; y tratamiento de degeneración en ciertos estados patológicos. A la luz de esta comprensión, la presente invención contempla específicamente aplicaciones del presente método al tratamiento (*por ejemplo*, prevención, reducción en la gravedad, *etc.*) de afecciones neurológicas que derivan de: (i) lesión aguda, subaguda, o crónica al sistema nervioso, incluyendo lesión traumática, lesión química, lesión vascular y déficits (tales como la isquemia que resulta de apoplejía), junto con lesión infecciosa/inflamatoria e inducida por tumor; (ii) envejecimiento del sistema nervioso, incluyendo enfermedad de Parkinson, corea de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y similares, así como degeneración espinocerebelosa; y (iv) enfermedades inmunológicas crónicas del sistema nervioso o que afectan al sistema nervioso, incluyendo esclerosis múltiple.

10 Según sea apropiado, el presente método también se puede usar para generar prótesis nerviosas para la reparación de daño de nervio central y periférico. En particular, cuando un axón machacado o dañado se intuba mediante el uso de un dispositivo protésico, los antagonistas de hedgehog se pueden añadir al dispositivo protésico para regular la tasa de crecimiento y la regeneración de los procesos dendríticos. En las patentes U.S. 5.092.871 y 4.955.892 se describen canales de guía de nervios ejemplares.

15 Se describe el tratamiento de la transformación neoplásica o hiperplásica, tal como puede ocurrir en el sistema nervioso central. Por ejemplo, los antagonistas de hedgehog cinasa se pueden utilizar para hacer que las células transformadas se hagan post-mitóticas o apoptóticas. Por lo tanto, el presente método se puede usar como parte de un tratamiento para, *por ejemplo*, gliomas malignos, meningiomas, meduloblastomas, tumores neuroectodérmicos, y ependimomas.

Cáncer neuronal

20 Los antagonistas de hedgehog cinasa se pueden usar como parte de un régimen de tratamiento para meduloblastoma maligno y otros tumores neuroectodérmicos malignos del SNC primarios. El meduloblastoma, un tumor cerebral primario, es el tumor cerebral más habitual en niños. Un meduloblastoma es un tumor neuroectodérmico primitivo (PNET) que surge en la fosa posterior. Dan cuenta de aproximadamente el 25% de todos los tumores cerebrales pediátricos. Histológicamente, son tumores de células redondas pequeñas dispuestas habitualmente en una roseta verdadera, pero muchos presentan alguna diferenciación con astrocitos, ependimocitos o neuronas. Los PNET pueden surgir en otras áreas del cerebro, incluyendo la glándula pineal (pineoblastoma) y cerebro. Aquellos que surgen en la región supratentorial tienen generalmente un peor pronóstico.

25 Se sabe que los meduloblastomas/PNET se repiten en cualquier parte en el SNC después de la resección, e incluso se pueden metastatizar al hueso. Por lo tanto, la evaluación de pretratamiento debería incluir un examen de la médula espinal para excluir la posibilidad de "metástasis caídas". Para este fin, la NRI potenciada por gadolinio ha sustituido en gran medida a la mielografía, y la citología de CSF se obtiene posquirúrgicamente como un procedimiento normal.

30 En otra realización, el presente método se usa como parte de un programa de tratamiento para ependimomas. Los ependimomas dan cuenta de aproximadamente el 10% de los tumores cerebrales pediátricos en niños. En líneas generales, son tumores que surgen del forro ependimario de los ventrículos, y microscópicamente forman rosetas, canales, y rosetas perivasculares. En la serie de CHOP de 51 niños con ependimomas, $\frac{3}{4}$ fueron histológicamente benignos. Aproximadamente $\frac{2}{3}$ surgieron de la región del 4º ventrículo. Un tercio se presentó en la región supratentorial. La edad de la presentación alcanza el máximo entre el nacimiento y los 4 años, como se demuestra mediante los datos de SEER así como los datos de CHOP. La edad media es alrededor de 5 años. Debido a que muchos niños con esta enfermedad son bebés, a menudo requieren terapia multimodal.

Cultivo de células no neuronales

35 Los antagonistas de hedgehog cinasa se pueden usar en cultivo celular y método terapéutico relacionado con la generación y mantenimiento de tejido no neuronal. Tales usos se contemplan como resultado de la implicación de los componentes de la señalización de hedgehog (*por ejemplo*, *ptch*, hedgehog, *smo*, *etc.*) en señales morfogénicas de otras rutas organogénicas de vertebrados, tales como la formación de patrón endodérmico, y la diferenciación mesodérmica y endodérmica.

40 La señalización de hedgehog, especialmente *ptc*, *hedgehog*, y *smoothened*, está implicada en el control del desarrollo de células madre responsables de la formación del tubo digestivo, hígado, pulmones, y otros órganos derivados del intestino primitivo. *Shh* es la señal inductora desde el endodermo hasta el mesodermo, que es crítica para la morfogénesis del intestino. Por lo tanto, por ejemplo, los antagonistas de hedgehog cinasa del presente método se pueden emplear para regular el desarrollo y mantenimiento de un hígado artificial que puede tener múltiples funciones metabólicas de un hígado normal. En una realización ejemplar, el presente método se puede usar para regular funciones de un hígado normal. En una realización ejemplar, el presente método se puede usar para regular la proliferación y diferenciación de células madre del tubo digestivo para formar cultivos de hepatocitos que se pueden usar para poblar matrices extracelulares, o que se pueden encapsular en polímeros biocompatibles, para formar hígados artificiales tanto implantables como extracorpóreos.

En otra realización, el presente método se puede emplear terapéuticamente para regular tales órganos después de la agresión física, química o patológica. Por ejemplo, se puede usar un compuesto terapéutico que comprenda un antagonista de hedgehog cinasa en la reparación hepática tras una hepatectomía.

5 En otra realización, el presente método se puede usar para controlar o regular la proliferación y/o diferenciación de tejido pancreático tanto *in vivo* como *in vitro*. La generación del páncreas e intestino delgado a partir de intestino embrionario depende de la señalización intracelular entre las células endodérmicas y mesodérmicas del intestino. En particular, se ha sugerido que la diferenciación de mesodermo intestinal en músculo liso depende de señales procedentes de células endodérmicas adyacentes. Un mediador candidato de señales derivadas endodérmicamente en el intestino posterior embrionario es Sonic hedgehog (*Shh*). Apelqvist et al., Curr. Biol. 7: 801-4 (1997). El gen de *Shh* es expresado en todo el endodermo del primordio embrionario, con la excepción del endodermo del primordio pancreático, que en su lugar expresó niveles elevados de la proteína de homeodominio *lpx1/Pdx1* (factor promotor de insulina 1/homeocaja pancreática y duodenal 1), un regulador esencial del desarrollo pancreático temprano. La *lpx1/Pdx1* se usó para expresar selectivamente *Shh* en el epitelio pancreático en desarrollo. El mesodermo pancreático de ratones transgénicos *lpx1/Pdx1-Shh* se desarrolló en músculo liso y células intersticiales de células de cajal, que son características del intestino, en lugar de mesénquima pancreático y bazo. Apelqvist *et al.*, *más arriba*. También, los explantes pancreáticos expuestos a *Shh* sufrieron como expresión similar de controles de *Shh* derivados endodérmicamente el destino de mesodermo adyacente en diferentes regiones del tubo intestinal.

20 En otra realización, los antagonistas de hedgehog cinasa se usan para modular la generación de tejido endodérmico a partir de células madre no endodérmicas, incluyendo células mesenquimatosas y células madre derivadas de tejidos mesodérmicos. Los tejidos mesodérmicos ejemplares a partir de los cuales se pueden aislar células madre incluyen musculoesquelético, musculocardiaco, riñón, cartilago y grasa.

Afecciones/trastornos pancreáticos

25 Existe una amplia variedad de afecciones pancreáticas proliferativas celulares patológicas para las cuales pueden proporcionar beneficios terapéuticos los antagonistas de hedgehog cinasa de la presente invención. Más específicamente, tales beneficios terapéuticos se refieren a corregir la expresión aberrante de insulina, o la modulación de la diferenciación de células pancreáticas. Más generalmente, sin embargo, la presente invención se refiere a un método para inducir y/o mantener un estado diferenciado, potenciando la supervivencia y/o afectando a la proliferación de células pancreáticas, poniendo en contacto las células con los antagonistas de hedgehog cinasa en cuestión. Por ejemplo, se contempla por la invención que, a la luz de la implicación manifiesta de *ptc*, *hedgehog* y *smoothened* en la formación de ordenamientos espaciales ordenados de tejidos pancreáticos, el presente método se podría usar como parte de una técnica para generar y/o mantener tal tejido tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, la modulación de la señalización de hedgehog se pueden emplear tanto en cultivo celular como en métodos terapéuticos que implican la generación y mantenimiento de células β de los islotes, y posiblemente también de tejido no pancreático, tal como en el control del desarrollo y mantenimiento de tejido del tubo digestivo, bazo, pulmones, órganos urogenitales (*por ejemplo vejiga*), así como otros órganos que derivan del intestino primitivo.

35 En una realización específica, los antagonistas de hedgehog cinasa de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de trastornos hiperplásicos y neoplásicos que afectan al tejido pancreático, especialmente aquellos caracterizados por proliferación aberrante de células pancreáticas. Por ejemplo, las células pancreáticas están marcadas por proliferación anormal de células pancreáticas, lo que puede dar como resultado alteraciones de la capacidad secretora de insulina del páncreas. Por ejemplo, ciertas hiperplásias pancreáticas, tales como carcinomas pancreáticos, pueden dar como resultado hipoinsulinemia debido a disfunción de células β o la reducción de la masa celular de los islotes. Además, la manipulación de las propiedades de señalización de hedgehog en diferentes puntos puede ser útil como parte de una estrategia para remodelar/reparar tejido pancreático tanto *in vivo* como *in vitro*. En una realización, la presente invención hace uso de la implicación manifiesta de *ptc*, *hedgehog* y *smoothened* en la regulación del desarrollo del tejido pancreático. En otra realización, los presentes antagonistas de hedgehog cinasa se pueden emplear terapéuticamente para regular el páncreas después de agresión física, química o patológica. En todavía otra realización, el presente método se puede aplicar a técnicas de cultivo celular, y, en particular, se puede emplear para potenciar la integración inicial de dispositivos protésicos de tejido pancreático. La manipulación de la proliferación y diferenciación de tejido pancreático, tal como mediante el uso de antagonistas de hedgehog cinasa, puede proporcionar un medio para controlar con más cuidado las características de un tejido cultivado. En una realización ejemplar, el presente método se puede usar para aumentar la producción de dispositivo protésico que requiere células β de los islotes, tal como se puede usar en los dispositivos de encapsulamiento descritos en, por ejemplo, las patentes U.S.P. 4.892.538, 5.106.627, 4.391.909 y 4.353.888. Las células progenitoras tempranas de los islotes pancreáticos son multipotenciales, y coactivan aparentemente todos los genes específicos de los islotes desde el momento en que aparecen por primera vez. A medida que transcurre el desarrollo, la expresión de hormonas específicas de los islotes, tales como insulina, se restringe al patrón de la característica de expresión de las células maduras de los islotes. El fenotipo de células madura de los islotes, sin embargo, no es estable en cultivo, puesto que se puede observar la reaparición de rasgos embrionarios en células β maduras. Utilizando los presentes antagonistas de hedgehog cinasa, se puede regular la ruta de diferenciación o el índice

proliferativo de las células.

Además, la manipulación del estado diferenciativo del tejido pancreático se puede utilizar conjuntamente con el trasplante de páncreas artificial. Por ejemplo, la manipulación de la función de hedgehog para afectar a la diferenciación tisular se puede utilizar como un medio para mantener la viabilidad del injerto.

- 5 Los antagonistas de hedgehog cinasa de la presente invención se pueden usar para regular la regeneración de tejido pulmonar, *por ejemplo* en el tratamiento de enfisema. Se ha dado a conocer que *Shh* regula *in vivo* la proliferación de células mesenquimatosas del pulmón. Bellusci et al., *Development* 124: 53 (1997).

Trastornos proliferativos celulares, tumores y cánceres

- 10 Los antagonistas de hedgehog cinasa de la presente invención también se pueden usar para tratar carcinoma y adenocarcinoma pulmonar, y otros trastornos proliferativos que implican el epitelio pulmonar. Se sabe que *Shh* es expresada en células escamosas de carcinoma y adenocarcinoma pulmonares humanas. Fujita et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238: 658 (1997). La expresión de *Shh* también se detectó en tejidos de carcinoma pulmonar de células escamosas humanos, pero no en el tejido pulmonar normal del mismo paciente. También se observó que *Shh* estimula la incorporación de BrdU en las células del carcinoma y estimula su crecimiento, mientras que anti-*Shh*-H inhibió tal crecimiento. Estos resultados sugieren que una *ptc*, *hedgehog*, y/o *smoothened* está implicada en el crecimiento celular de tal tejido pulmonar transformado, y por lo tanto indican que los antagonistas de hedgehog cinasa se pueden usar para tratar carcinoma y adenocarcinomas pulmonares, y otros trastornos proliferativos que implican el epitelio pulmonar.

- 20 Los antagonistas de hedgehog cinasa de la presente invención también se pueden usar para tratar tumores en los que la señalización de hedgehog está asociada con la existencia de patogénesis. Tales tumores incluyen, pero no se limitan a: tumores relacionados con el síndrome de Gorlin (*por ejemplo*, meduloblastoma, meningioma, *etc.*), pruebas de tumores en ratones con *ptc* desactivado (*por ejemplo*, hemangioma, rhabdomyosarcoma, *etc.*), tumores que resultan de la amplificación de *gli-1* (*por ejemplo*, glioblastoma, sarcoma, *etc.*), tumores que resultan de la disfunción de *Smo* (*por ejemplo*, carcinoma basocelular, *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 *Shh* (*por ejemplo*, cáncer pulmonar, condrosarcomas, *etc.*), y otros tumores (*por ejemplo*, cáncer de mama, cáncer urogenital (*por ejemplo*, riñón, vejiga, uréter, próstata, *etc.*), cáncer suprarrenal, cáncer gastrointestinal (*por ejemplo*, estómago, intestino, *etc.*).

- 30 Los antagonistas de hedgehog cinasa de la presente invención también se pueden usar para tratar varias formas de cáncer. Estos cánceres incluyen, pero no se limitan a: cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer biliar, cáncer pulmonar (incluyendo microcítico y no microcítico), cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer hepático, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial u otro cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer testicular, cáncer del pene, cáncer de la vagina, cáncer de la uretra, cáncer de la vesícula biliar, cáncer esofágico, o cáncer pancreático. Tipos adicionales de cáncer incluyen cáncer del músculo esquelético o liso, cáncer de estómago, 35 cáncer del intestino delgado, cáncer de la glándula salivar, cáncer anal, cáncer rectal, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer de la pituitaria, y cáncer nasofaríngeo. Formas ejemplares adicionales de cáncer que se pueden tratar con los antagonistas de hedgehog de la presente invención incluyen cánceres que comprenden células que expresan hedgehog. Todavía otras formas ejemplares de cáncer que se pueden tratar con los antagonistas de hedgehog de la presente invención incluyen cánceres que comprenden células que expresan *gli*. En una realización, 40 el cáncer no está caracterizado por una mutación en *patched-1*.

Tejido esquelético y conjuntivo:

- Se describe el uso de antagonistas de hedgehog cinasa en la generación *in vitro* de tejido esquelético, tal como a partir de células madre esqueléticas, así como el tratamiento *in vivo* de deficiencias del tejido esquelético. Más específicamente, tales antagonistas de hedgehog cinasa se pueden usar para regular la condrogénesis y/u osteogénesis. Por "deficiencia del tejido esquelético" se quiere decir una deficiencia en el hueso u otro tejido 45 conjuntivo esquelético en cualquier sitio en el que se desea restaurar el hueso o tejido conjuntivo, sin importar cómo se originó la deficiencia, *por ejemplo* como resultado de intervención quirúrgica, eliminación del tumor, ulceración, implante, fractura, u otras condiciones traumáticas o degenerativas.

- Los antagonistas de hedgehog cinasa descritos se pueden usar en un método para restaurar la función de cartílago al tejido conjuntivo, por ejemplo la reparación de defectos o lesiones en el tejido de cartílago resultante del desgaste degenerativo. Más específicamente, desgaste degenerativo que resulta de artritis (osteoartritis y artritis reumatoide) y/o trauma – tal como un desplazamiento de tejido de menisco desgarrado, meniscectomía, una relajación de una articulación mediante un ligamento desgarrado, desalineamiento de la articulación, fractura ósea. Tales métodos reparadores también pueden ser útiles para remodelar matriz de cartílago, tal como en cirugía plástica o 55 reconstructiva, así como cirugía periodontal. El método reparador también se puede aplicar para aumentar o corregir un procedimiento previo, por ejemplo tras la reparación quirúrgica del menisco, ligamento, o cartílago. Además, puede prevenir el comienzo o exacerbación de enfermedad degenerativa si se aplica suficientemente pronto

después del trauma.

Se describe un método reparador que comprende tratar el tejido conjuntivo afligido con una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de hedgehog cinasa, a fin de regular una respuesta de reparación de cartilago en el tejido conjuntivo mediante la modulación de la tasa de diferenciación y/o proliferación de condrocitos embebidos en el tejido. Tales tejidos conjuntivos como cartilago articular, cartilago interarticular (meniscos), cartilago costal (que conecta las costillas verdaderas y el esternón), ligamentos, y tendones, son particularmente susceptibles de tratamiento en terapias reconstructivas y/o regenerativas que usan el presente método. Como se usa aquí, las terapias regenerativas incluyen tratamiento en el que es manifiesta la degeneración, así como los tratamientos preventivos o profilácticos de tejido en los que la degeneración está en sus etapas más tempranas o es inminente.

El método reparador se puede usar como parte de una intervención terapéutica en el tratamiento de cartilago de una articulación diartroïdal, tal como una rodilla, un tobillo, un codo, una cadera, una muñeca, un nudillo o un dedo de la mano o del pie, o una articulación tempomandibular. El tratamiento se puede dirigir al menisco de la articulación, al cartilago articular de la articulación, o a ambos. Para ilustrar adicionalmente, el presente método se puede usar para tratar un trastorno degenerativo de una rodilla, tal como el que puede resultar de lesión traumática (*por ejemplo*, una lesión deportiva o desgaste excesivo) u osteoartritis. Los antagonistas descritos se pueden administrar como una inyección en la articulación con, por ejemplo, una aguja artroscópica. En algunos casos, el agente inyectado puede estar en forma de un hidrogel u otro vehículo de liberación lenta descrito anteriormente, a fin de permitir un contacto más extendido y regular del agente con el tejido tratado.

El método reparador se puede aplicar para potenciar tanto la generación de dispositivos protésicos de cartilago como para su implantación. La necesidad de tratamientos mejorados ha motivado la investigación dirigida a crear nuevo cartilago que se basa en moldes de colágeno glucosaminoglucanos (Stone et al., *Clin. Orthop. Relat. Res.* 252: 129 (1990)), condrocitos aislados (Grande et al., *J. Orthop. Res.* 7: 208 (1989); Takigawa et al., *Bone Miner* 2: 449 (1987)), y condrocitos unidos a polímeros naturales o sintéticos (Walitani et al., *J. Bone Jt. Surg.* 71B:74 (1989); Vacanti et al., *Plast. Reconstr. Surg.* 88:753 (1991); von Schroeder et al., *J. Biomed Mater. Res.* 25: 329 (1991); Freed et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 27: 11 (1993); patente U.S. 5.041.138). Por ejemplo, los condrocitos se pueden hacer crecer en cultivo en armazones o matrices biodegradables, biocompatibles, muy porosos, formados de polímeros tales como poliácido glucólico, poliácido láctico, gel de agarosa, u otros polímeros que se degradan con el tiempo, en función de la hidrólisis de la cadena principal polimérica, en monómeros inocuos. Las matrices se diseñan para permitir el intercambio adecuado de nutrientes y gases a las células hasta que se produce la consolidación del injerto. Las células se pueden cultivar in vitro hasta que se hayan desarrollado un volumen y densidad adecuados de las células para que las células sean implantadas. Una ventaja de las matrices es que se pueden colar o moldear en una forma deseada en una base individual, de manera que el producto final se asemeja mucho a la porción corporal afectada propia del paciente (*por ejemplo*, oreja, nariz, etc.), o se pueden usar matrices flexibles que permiten la manipulación en el momento de la implantación, como en una articulación.

Los implantes se pueden poner en contacto con el antagonista de hedgehog cinasa durante ciertas etapas del proceso de cultivo, a fin de manejar la tasa de diferenciación de condrocitos y la formación de condrocitos hipertróficos en el cultivo.

El dispositivo implantado se trata con un antagonista de hedgehog cinasa a fin de remodelar activamente la matriz implantada y hacerla más adecuada para su función pretendida. Como se describe previamente, cualesquiera transplantes artificiales sufren de la deficiencia de no derivar en un marco que sea comparable al entorno mecánico real en el que se implanta la matriz. La capacidad para regular los condrocitos en la matriz mediante el método reparador puede permitir que el implante adquiera características similares al tejido para el cual está destinado a sustituir.

Los antagonistas de hedgehog cinasa se pueden usar en un método para la generación de hueso (osteogénesis) en un sitio en un animal en el que tal tejido esquelético es deficiente. Puesto que indian hedgehog está particularmente asociada con los condrocitos hipertróficos que se sustituyen en última instancia por osteoblastos, la modulación de la función de indian hedgehog se puede producir mediante el uso de los presentes antagonistas de hedgehog cinasa. Por ejemplo, la administración de un antagonista de hedgehog cinasa de la presente invención se puede emplear como parte de un método para regular la tasa de pérdida ósea en un sujeto. Las preparaciones que comprenden antagonistas de hedgehog cinasa se pueden emplear, por ejemplo, para controlar la osificación endocondrial en la formación de un "modelo" para la osificación.

Espermatogénesis y anticoncepción masculina

Los antagonistas de hedgehog cinasa descritos se pueden usar para regular la espermatogénesis. Las proteínas hedgehog, particularmente *Dhh*, han demostrado que están implicadas en la diferenciación y/o proliferación y mantenimiento de células germinales testiculares. La expresión de *Dhh* se inicia en los precursores de células de Sertoli muy poco después de la activación de *Sry* (gen determinante testicular), y persiste en los testículos en el adulto. Los ratones macho con mutaciones carentes de *Dhh* son viables pero infértiles, dada la ausencia completa

de esperma maduro. El examen de los testículos en desarrollo en diferentes antecedentes genéticos diferentes sugiere que *Dhh* reguló las etapas tanto temprana como tardía de la espermatogénesis. Bitgood et al., Cur. Biol 6(3): 298-304 (1996). En una realización preferida, el antagonista de hedgehog cinasa descrito se puede usar como un anticonceptivo.

5 *Tejido epitelial*

Los antagonistas de hedgehog cinasa descritos también se pueden usar en el tratamiento (incluyendo profilaxis) de trastornos que afectan al tejido epitelial. En general, tal tratamiento comprende administrar una cantidad de un antagonista de hedgehog cinasa efectiva para alterar el estado de crecimiento del tejido epitelial tratado. El modo de administración y los regímenes de dosificación variarán dependiendo del tejido o tejidos epiteliales que se van a tratar (*por ejemplo*, dérmico, mucosal, glandular, etc.). En un aspecto específico, el método se puede usar para regular la inducción de la diferenciación inducida por *Shh* y/o inhibir la proliferación de tejido derivado epitelialmente. De este modo, los antagonistas de hedgehog cinasa descritos se pueden usar en un método para el tratamiento de afecciones hiperplásicas y/o neoplásicas que implican tejido epitelial.

(i) *Curación de heridas*

15 Los antagonistas de hedgehog cinasa descritos se pueden usar en un método para promover la curación de heridas. Específicamente, “promover la curación de heridas” significa una curación de heridas más eficientemente como resultado de la aplicación del tratamiento de lo que sana una herida similar en ausencia del tratamiento. “Promoción de la curación de heridas” también puede significar que el método regula la proliferación y/o crecimiento de, entre otros, queratinocitos, o que la herida sana con menos cicatrización, menos contracciones de la herida, menos deposición de colágeno y más área superficial. En ciertos casos, “promoción de la curación de heridas” también puede significar que ciertos métodos de curación de heridas tienen tasas de éxito mejoradas (*por ejemplo*, las tasas de captación de injertos de piel) cuando se usan junto con el método descrito.

25 A pesar del progreso significativo en técnicas quirúrgicas reconstructivas, la cicatrización puede ser un obstáculo importante en volver a ganar la función normal y el aspecto de la piel sanada. Esto es particularmente cierto cuando la cicatrización patológica, tales como queloides o cicatrices hipertróficas de las manos o de la cara, provoca minusvalía funcional o deformidad física. En las circunstancias más graves, tal cicatrización puede precipitar sufrimiento psicosocial y una vida de privación económica. La reparación de heridas incluye las etapas de hemostasia, inflamación, proliferación, y remodelación. La etapa proliferativa implica multiplicación de fibroblastos y células endoteliales y epiteliales. La aplicación de los antagonistas de hedgehog cinasa descritos pueden modular la proliferación de células epiteliales en y próximas a la herida, a fin de manejar el cierre de la herida y/o minimizar la formación de tejido cicatrizal.

35 Los antagonistas de hedgehog cinasa descritos también se pueden usar para tratar úlceras de la membrana oral, paraoral y mucosa, *por ejemplo* tal como aquellas que resultan de radiación y/o quimioterapia. Tales úlceras se desarrollan habitualmente a los pocos días después de la quimioterapia o de la terapia de radiación. En muchos casos, la falta de tratamiento da como resultado la proliferación de tejido inflamatorio alrededor de la periferia de la lesión, dando como resultado la pérdida de continuidad de epitelio superficial. Como resultado de la pérdida de integridad epitelial, el cuerpo es proclive a una infección secundaria potencial. Si tales úlceras proliferan a lo largo del canal alimentario, la ingestión normal de comida y agua se hace dolorosa, junto con diarrea y sus factores problemáticos. Los antagonistas de hedgehog cinasa de la invención pueden ser un tratamiento para tales úlceras mediante la reducción de la proliferación y diferenciación anormales del epitelio afectado, ayudando de ese modo a reducir la gravedad de los sucesos inflamatorios subsiguientes.

(ii) *Reparación córnea y de la lente*

45 Los antagonistas de hedgehog cinasa de la invención se pueden usar para inhibir la proliferación de células epiteliales de la lente para evitar complicaciones post-quirúrgicas de la extracción de catarata extracapsular. Las cataratas son una enfermedad ocular intratable sobre la que se ha realizado una gran cantidad de estudios. Sin embargo, actualmente, el tratamiento de esta enfermedad se obtiene principalmente mediante cirugía. Las cirugías de cataratas se han aplicado durante mucho tiempo, y se han examinado diversos métodos quirúrgicos. La extracción de la lente extracapsular se ha convertido en el método de elección para eliminar las cataratas. Las principales ventajas médicas de esta técnica con respecto a la extracción intracapsular son una menor incidencia de edema macular cistoideo afáquico y desprendimiento retiniano. La extracción extracapsular también es necesaria para el implante de lentes intraoculares de tipo cámara posterior, que se consideran actualmente que son las lentes de elección en la mayoría de los casos.

55 Sin embargo, una desventaja de la extracción de cataratas extracapsular es la elevada incidencia de opacificación de la lente posterior, denominada a menudo catarata secundaria, que puede ocurrir en hasta 50% de casos en los tres años después de la cirugía. La catarata secundaria está provocada por la proliferación de células epiteliales de la lente en la cápsula ecuatorial y anterior, que quedan después de la extracción extracapsular de la lente. Estas células proliferan para provocar anillos de Sommerling, y, junto con fibroblastos, que también se depositan y

aparecen en la cápsula posterior, provocan la opacificación de la cápsula posterior, lo que interfiere con la visión. Sería preferible la prevención de tales cataratas secundarias. Para inhibir la formación de tales “post-cataratas” o cataratas secundarias, el presente método proporciona un medio para inhibir la proliferación de las células epiteliales de la lente que quedan. Por ejemplo, tales células se pueden inducir a que permanezcan en reposo instilando una disolución que contiene una preparación de antagonistas de hedgehog cinasa en la cámara anterior del ojo después de la retirada de la lente. Además, la disolución se puede equilibrar osmóticamente para proporcionar una dosis efectiva mínima cuando se instala en la cámara anterior del ojo, inhibiendo de ese modo con cierta especificidad el crecimiento epitelial subcapsular.

Los antagonistas de hedgehog cinasa también se pueden usar en el tratamiento de corneopatías marcadas por proliferación de células epiteliales de la córnea, como por ejemplo en trastornos epiteliales oculares tales como el menor crecimiento epitelial o carcinomas de células escamosas de la superficie ocular. Se ha demostrado que las proteínas hedgehog regulan la mitogénesis y la diferenciación de fotorreceptores en la retina de vertebrados (Levine et al., J. Neurosci. 17: 6277 (1997)), e Ihh es un factor candidato del epitelio pigmentado para promover la proliferación de progenitores retinianos y la diferenciación de fotorreceptores. Igualmente, Jensen et al., Development 124: 363 (1997), demostraron que el tratamiento de cultivos de células retinianas de ratón perinatal con el fragmento aminoterminal de la proteína *Shh* da como resultado un incremento en la proporción de células que incorporan bromodesoxiuridina en fotorreceptores de varillas, células de amacrina y gliocitos de Müller. Esto sugiere que *Shh* promueve la proliferación de células precursoras retinianas, lo que significa que se podría esperar que los antagonistas de hedgehog cinasa de la presente invención modulasen tal proliferación mediada por *Shh*. De este modo, los antagonistas de hedgehog cinasa de la invención se pueden usar en el tratamiento de enfermedades proliferativas de células retinianas, y regular la diferenciación de fotorreceptores.

(iii) Crecimiento del pelo

Los antagonistas de hedgehog cinasa descritos también se pueden usar para controlar el crecimiento del pelo. El pelo está compuesto básicamente de queratina, una proteína fuerte e insoluble. Cada pelo individual comprende un tallo cilíndrico y una raíz, y está contenido en un folículo, una depresión semejante a un matraz en la piel. La parte inferior del folículo contiene una proyección similar a un dedo denominada papila, que consiste en tejido conjuntivo del que crece el pelo, y a través del cual los vasos sanguíneos suministran nutrición a las células. El tallo es la parte que se extiende hacia fuera desde la superficie de la piel, mientras que la raíz se ha descrito como la parte enterrada del pelo. La base del pelo se expande en el bulbo del folículo, que descansa sobre la papila. Las células a partir de las cuales se produce el pelo crecen en el bulbo del folículo; se extruyen en forma de fibras a medida que las células proliferan en el folículo. “Crecimiento” del pelo se refiere a la formación y alargamiento de la fibra pilosa por las células en división.

Como es bien sabido en la técnica, el ciclo normal del pelo se divide en tres etapas: anágena, catágena y telógena. Durante la fase activa (anágena), las células madre epidérmicas de la papila dérmica se dividen rápidamente. Las células hija se mueven ascendentemente y se diferencian para formar las capas concéntricas del propio pelo. La etapa de transición, catágena, está marcada por el cese de la mitosis de las células madre en el folículo. La etapa de descanso se conoce como telógena, en la que el pelo es retenido en el cuero cabelludo durante varias semanas antes de que un nuevo pelo emergente que se desarrolla debajo de él desaloje el tallo de la fase telógena de su folículo. A partir de este modelo se hace claro que cuanto mayor es el conjunto de células madre en división que se diferencian en células pilosas, mayor crecimiento de pelo se produce. En consecuencia, se puede llevar a cabo un método para incrementar o reducir el crecimiento de pelo potenciando o inhibiendo, respectivamente, la proliferación de estas células madre.

Los antagonistas de hedgehog cinasa se pueden usar en un método para reducir el crecimiento de pelo humano, ya sea como una sustitución de o en combinación con la eliminación mediante corte, afeitado, o depilación. Por ejemplo, el presente método se puede usar en el tratamiento de tricosis caracterizada por crecimiento anormalmente rápido y fuerte del pelo, *por ejemplo*, hipertricosis. En una realización ejemplar, los antagonistas de hedgehog se pueden usar para el manejo del hirsutismo, un trastorno marcado por pilosidad anormal. El presente método también proporciona un procedimiento para prolongar la duración de la depilación.

Además, debido a que un antagonista de hedgehog cinasa será a menudo citostático para las células epiteliales, en lugar de citotóxico, tales agentes se pueden usar para proteger las células del folículo piloso de agentes citotóxicos que requieren progresión celular en la fase S del ciclo celular para eficacia, *por ejemplo* muerte inducida por radiación. El tratamiento mediante los antagonistas de hedgehog cinasa pueden proporcionar protección, haciendo que las células del folículo piloso se hagan inactivas, *por ejemplo* evitando que las células entren en la fase S, y evitando de ese modo que las células del folículo sufran una catástrofe mitótica o la muerte celular programada. Por ejemplo, los antagonistas de hedgehog cinasa se pueden usar en pacientes que están sometidos a quimioterapia o terapia de radiación, las cuales dan normalmente como resultado la pérdida del pelo. Inhibiendo la progresión del ciclo celular durante tales terapias, el presente tratamiento puede proteger a las células del folículo piloso de la muerte, lo que de otro modo puede resultar de la activación de los programas de muerte celular en ausencia de reposo. Después de que la terapia de los antagonistas de hedgehog cinasa ha concluido, el presente método

también se puede retirar con el alivio concomitante de la inhibición de la proliferación de las células foliculares.

Los antagonistas de hedgehog cinasa descritos también se pueden usar en el tratamiento de foliculitis, tales como foliculitis decalvante, foliculitis uleritematosa reticulada o foliculitis queiloidea. Por ejemplo, se puede aplicar tópicamente una preparación cosmética de un antagonista de hedgehog cinasa en el tratamiento de pseudofoliculitis, un trastorno crónico que aparece muy a menudo en la región submandibular del cuello y está asociado con el afeitado, cuyas lesiones características son pápulas y pústulas eritematosas que contienen pelos enterrados.

Los antagonistas de hedgehog cinasa descritos se pueden usar en un método para modular el crecimiento de pelo humano. Sato et al., J. Clin. Invest. 104: 855-864 (1999) dieron a conocer que el aumento de la actividad de *Shh* en piel postnatal funciona como un interruptor biológico que induce a los folículos pilosos en reposo a que entren en la anágena, con el crecimiento consiguiente de pelo. Sato *et al.* usaron un vector adenovírico AdShh, para transferir el ADNc de *Shh* murino a piel de ratones C57BL/6 de 19 días postnatales. La piel tratada mostró una expresión incrementada de ARNm de *Shh*, *Patched*, y *Gli-1*. En ratones que recibieron AdShh, pero no en los controles, la aceleración en la anágena fue evidente, puesto que el tamaño del folículo piloso y la melanogénesis aumentaron, y la queratina específica del pelo ghHb-1 y los ARNm de tirosinasa relacionados con la síntesis de melamina se acumularon. Finalmente, los ratones C57BL/6 mostraron una aceleración notable del comienzo de crecimiento de nuevo pelo en la región de la administración de AdShh a la piel semanas después del tratamiento, pero no en áreas no tratadas o tratadas con el vector de control. Después de 6 meses, la piel tratada con AdShh mostró una morfología de pelo normal y piel normal. De este modo, los antagonistas de hedgehog cinasa descritos pueden ser útiles para regular o modular el crecimiento piloso inducido por *Shh*.

(iv) *Proliferación epitelial excesiva*

Los antagonistas de hedgehog cinasa de la invención se pueden usar en un método para el tratamiento de afecciones hiperplásicas (*por ejemplo*, queratosis) y afecciones epidérmicas neoplásicas caracterizadas por una tasa elevada de proliferación (*por ejemplo*, carcinoma de células escamosas). El presente método también se puede usar en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias que afectan a la piel, en particular, o enfermedades dermatológicas que implican proliferación mórbida y/o queratinización de la epidermis, como *por ejemplo* causada por psoriasis o dermatitis atópica. También sería de esperar que los trastornos habituales de la piel que se caracterizan por proliferación anormal localizada de la piel (*por ejemplo*, psoriasis, carcinoma de células escamosas, queratocantoma, queratosis actínica) sean tratables mediante aplicación de los antagonistas de hedgehog cinasa de la invención.

Las preparaciones de los antagonistas de hedgehog cinasa son adecuadas para el tratamiento de males dermatológicos relacionados con trastornos de queratinización que provocan proliferación anormal de células de la piel, en los que tales trastornos pueden estar marcados por componentes inflamatorios o no inflamatorios. Los antagonistas de hedgehog cinasa de la invención, que promueven la inactivación o diferenciación, se pueden usar para tratar formas variables de psoriasis, *por ejemplo* cutánea, mucosal o lingual. La psoriasis, como se describe anteriormente, se caracteriza típicamente por queratinocitos epidérmicos que presentan una notable activación proliferativa y diferenciación a lo largo de una ruta "regenerativa". El tratamiento con los antagonistas de hedgehog cinasa de la presente invención se puede usar para invertir la activación epidérmica patológica, y puede proporcionar una base para la remisión sostenida de la enfermedad.

Una variedad de otros trastornos caracterizados por lesiones queratósicas también son candidatos para el tratamiento con los antagonistas de hedgehog cinasa de la invención. Las queratosis actínicas, *por ejemplo*, son tumores premalignos inflamatorios superficiales que surgen en la piel irradiada y expuesta al sol. Las terapias actuales incluyen escisión y criocirugía. Estos tratamientos son sin embargo dolorosos, y a menudo producen cicatrización cosméticamente inaceptable. En consecuencia, el tratamiento de queratosis, tal como queratosis actínica, incluye la aplicación de una composición de antagonista de hedgehog en cantidades suficientes para inhibir la proliferación de células epidérmicas/epidermoides de la lesión.

(v) *Acné*

El acné representa todavía otro mal dermatológico que se puede tratar mediante los antagonistas de hedgehog cinasa descritos. El acné vulgar, una enfermedad de múltiples factores que aparece muy habitualmente en adolescentes y adultos jóvenes, se caracteriza por la aparición de lesiones inflamatorias y no inflamatorias sobre la cara y el tronco superior. El defecto básico que da lugar a acné vulgar es la hipercornificación del conducto de una glándula sebácea hiperactiva. La hipercornificación bloquea la movilidad normal de los microorganismos de la piel y de los folículos, y, al hacerlo, estimula la liberación de lipasas por bacterias *Staphylococcus epidermidis* y por *Pitrosporium ovale*, una levadura. El tratamiento con antagonistas de hedgehog cinasa, particularmente preparaciones tópicas, puede ser útil para prevenir los rasgos transicionales de los conductos, *por ejemplo*, hipercornificación, que conducen a la formación de la lesión. Un régimen terapéutico que comprenda antagonistas de hedgehog cinasa puede incluir además, *por ejemplo*, antibióticos, retinoides y antiandrógenos.

(vi) Dermatitis y otros males de la piel

- Los antagonistas de hedgehog cinasa descritos también se pueden usar en un método para tratar diversas formas de dermatitis. La dermatitis es un término descriptivo que se refiere a lesiones pobremente demarcadas ya sea pruríticas, eritematosas, escamosas, vesiculosas, lacrimosas, fisuradas o costrosas. Estas lesiones surgen de cualquiera de una amplia variedad de causas. Los tipos más habituales de dermatitis son atópica, de contacto y dermatitis de pañal. Por ejemplo, la dermatitis seborreica es una dermatitis crónica, habitualmente prurítica, con eritema, escamas secas, húmedas, o grasientas, y parches agrupados amarillos en diversas áreas, especialmente el cuero cabelludo, con esfoliación de una cantidad excesiva de escamas secas. Los antagonistas de hedgehog cinasa del presente método también se pueden usar en el tratamiento de dermatitis por estasia, una dermatitis a menudo crónica, habitualmente eccematosa. La dermatitis actínica es una dermatitis debida a exposición a radiación actínica, tal como la procedente del sol, ondas ultravioletas, o radiación X o gamma. Según la presente invención, el presente método se puede usar en el tratamiento y/o prevención de ciertos síntomas de dermatitis causada por proliferación indeseada de células epiteliales. Tales terapias para estas diversas formas de dermatitis también pueden incluir corticosteroides tópicos y sistémicos, antipruríticos, y antibióticos.
- Los males adicionales que se pueden tratar mediante el presente objeto son trastornos específicos para seres no humanos, tal como sarna de las plantas.

Señalización de hedgehog no canónica

- Los antagonistas de hedgehog cinasa de la invención se pueden usar para regular la actividad en una ruta de *Shh* no canónica que es independiente del complejo de receptores de *Patched-Smoothened* y los factores de transcripción *Gli*. En un informe reciente, Jarov et al., Dev. Biol. 261(2): 520-536 (2003), describen que, cuando se inmovilizó *Shh* al sustrato (matriz extracelular) o se produjo mediante las propias células neuroepiteliales después de la transfección, los explantes de la placa neural no se pudieron dispersar, y en su lugar formaron estructuras compactas. Los cambios en las capacidades adhesivas de células neuroepiteliales provocados por *Shh* se podrían explicar por la inactivación de integrinas $\beta 1$ de superficie combinado con un incremento en la adhesión celular mediada por N-cadherinas. Esta adhesión mediada por *Shh* inmovilizada no contradice ni interfiere con las funciones inductivas, mitógenas y tróficas mediadas por *Shh* (soluble) previamente conocidas, puesto que la *Shh* inmovilizada promovió la diferenciación de células neuroepiteliales en neuronas motoras y células de la placa ventral mesencefálica con la misma potencia que *Shh* soluble. También se ha demostrado que la regulación mediante *Shh* de las propiedades de adhesión durante la morfogénesis del tubo neural es rápida y reversible, y no implica la ruta clásica de señalización de *Patched-Smoothened-Gli*, y es independiente y discernible de la diferenciación celular mediada por *Shh*. De este modo, las modificaciones de las propiedades adhesivas de las células epiteliales neurales inducidas por *Shh* no se pueden atribuir a su efecto promotor de la diferenciación, sino que revelan una nueva función de *Shh* en este tejido, que no se ha descrito previamente. De este modo, los antagonistas de hedgehog cinasa de la presente invención se pueden usar para regular esta ruta de hedgehog no canónica que es independiente de *Ptch*, *Smo*, *Fu*, *Su(Fu)* y/o *Gli*. Más específicamente, tales antagonistas de hedgehog cinasa se pueden usar en un método para interrumpir esta función en tejidos neuronales u otros tejidos aplicables, preferiblemente en etapas de desarrollo específicas.

IV. Composiciones y métodos de la invención

A. Anticuerpos anti-hedgehog cinasa

- Se describe aquí el uso de anticuerpos anti-hedgehog cinasa, que pueden encontrar uso aquí como agentes terapéuticos, de diagnóstico y/o de pronóstico para determinar la gravedad de y/o pronosticar el transcurso de la enfermedad de un tumor o cáncer. Los anticuerpos ejemplares que se pueden usar para tales fines incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, y específicos, y heteroconjugados. El término "anticuerpos" también incluye algunas veces fragmentos de unión a antígenos. Debido a que las hedgehog cinasas son componentes intracelulares de la ruta de señalización de hedgehog, se prefieren cuerpos de internalización, o técnicas de suministro intracelular de los anticuerpos.

1. Anticuerpos policlonales

- Los anticuerpos policlonales se provocan preferiblemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente (especialmente cuando se usan péptidos sintéticos) a una proteína que es inmunógena en las especies a inmunizar. Por ejemplo, el antígeno se puede conjugar a hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de haba de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, *por ejemplo*, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de los restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de los restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}'\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en el que R y R¹ son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan frente al antígeno, conjugados inmunógenos, o derivados, combinando, *por ejemplo*, 100

5 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund, e inyectando intradérmicamente la disolución en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se revacunados con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días más tarde, los animales se sangran, y el suero se evalúa para determinar el título de anticuerpos. Los animales se revacunados hasta que el título alcanza un valor de meseta. Los conjugados también se pueden obtener en cultivo celular recombinante como fusiones proteicas. También, los agentes agregantes, tales como alumbre, se usan de forma adecuada para potenciar la respuesta inmunitaria.

2. Anticuerpos monoclonales

10 Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975), o se pueden obtener mediante métodos de ADN recombinante (patente U.S. n° 4.816.567).

15 En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedante apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se describe anteriormente para provocar linfocitos que producen o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para inmunización. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Tras la inmunización, los linfocitos se aíslan y después se fusionan con una estirpe celular de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, p. 59-103 (Academic Press, 1986)).

20 Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se hacen crecer en un medio de cultivo adecuado, medio el cual contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas (también denominadas como pareja de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), sustancias las cuales evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

25 Las células de mieloma de pareja de fusión preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, mantienen la producción estable con un nivel elevado de anticuerpo mediante las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio selectivo que selecciona frente a las células parentales no fusionadas. Las estirpes celulares de mieloma preferidas son estirpes de mieloma murino, tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California
30 USA, y SP-2 y derivados *por ejemplo* células X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA. 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); y Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)). El medio de cultivo en el que se hacen crecer las células de hibridoma se ensaya para determinar la
35 producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunosorbente enlazado a enzima (ELISA).

3. Anticuerpos humanos y humanizados

40 Los anticuerpos anti-hedgehog cinasa útiles en la práctica de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas o fragmentos inmunoglobulínicos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígenos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas
45 (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata, o conejo, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos del armazón Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias del
50 armazón o de CDR importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una porción de una región constante inmunoglobulínica (Fc), típicamente
55 aquella de una inmunoglobulina humana [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un

anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo como restos "importados", que se toman típicamente de un dominio variable "importado". La humanización se puede llevar a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], sustituyendo las CDR o secuencias de CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente U.S. n° 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a usar en la obtención de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo humano anti-ratón) cuando el anticuerpo está destinado a uso terapéutico humano. Según el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se selecciona frente a toda la librería de secuencias de dominios variables humanos conocidas. Se identifica la secuencia del dominio V humano que es la más cercana a la del roedor, y se acepta la región de armazón humano (FR) en ella para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.* 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método usa una región de armazón particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo armazón se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623 (1993)).

Como alternativa, la tecnología de presentación de fagos (McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 [1990]) se puede usar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominios variables (V) inmunoglobulínicos procedentes de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes de dominios V de anticuerpos se clonan en un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula fágica. Debido a que la partícula filamentosos contiene una copia de ADN monocatenario del genoma fágico, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. De este modo, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación de fagos se puede llevar a cabo en una variedad de formatos, revisados en, *por ejemplo*, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Para la presentación de fagos, se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) aislaron una matriz diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una librería combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados, y se pueden aislar anticuerpos contra un conjunto diverso de antígenos (incluyendo autoantígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), o Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Véanse también las patentes U.S. n°s 5.565.332 y 5.573.905.

Como se discute anteriormente, los anticuerpos humanos también se pueden generar mediante células B activadas *in vitro* (véanse las patentes U.S. 5.567.610 y 5.229.275).

4. Fragmentos de anticuerpos

En ciertas circunstancias hay ventajas a la hora de usar fragmentos de anticuerpos, en vez de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite un aclaramiento rápido, a la vez que retienen una especificidad de unión al antígeno similar de la molécula de longitud completa correspondiente, y pueden conducir a un acceso mejorado a tumores sólidos.

Se han desarrollado técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron vía digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, *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 se pueden producir ahora directamente mediante células hospedantes recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y scFv se pueden expresar todos ellos en y se pueden segregar a partir de *E. coli* permitiendo así la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las librerías de fagos de anticuerpos explicadas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y se pueden acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células hospedantes recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂, con una mayor semivida *in vivo*, que comprenden restos de un epítipo de unión al receptor salvaje, se describen en la patente U.S. n° 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán manifiestas para el experto. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véanse el documento WO 93/16185; la patente U.S. n° 5.571.894; y la patente U.S. n° 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; de este modo, son adecuados para la unión

no específica reducida durante el uso in vivo. Las proteínas de fusión de sFv se pueden construir para producir la fusión de una proteína efectora en el término amino o carboxi de un sFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, más arriba. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", *por ejemplo* como se describe en la patente U.S. 5.641.870. Tales fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o

5

5. Inmunoconjugados

La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (*por ejemplo*, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o sus fragmentos), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

10

a. Agentes quimioterapéuticos

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden usar incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica carantia, curcina, crotina, inhibidor de saponaria oficialis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Hay disponible una variedad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, y ¹⁸⁶Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se obtienen usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como hidrocloreto de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azídicos (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina, derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos fluorados bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de un radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

15

20

25

30

También se contemplan aquí conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de pequeña molécula, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteno, y CC 1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad tóxica.

b. Maitansina y maitansinoides

Un anticuerpo anti-hedgehog cinasa (de longitud completa o sus fragmentos) descrito se puede conjugar a una o más moléculas maitansinoides.

35

40

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto africano oriental *Maytenus serrata* (patente U.S. n° 3.896.111). Subsiguientemente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tal como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente U.S. n° 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos se describen, por ejemplo, en las patentes U.S. n°s 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.

45

50

55

En un intento por mejorar su índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides se han conjugado a anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las patentes U.S. n°s 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1. Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide, designado DM1, enlazado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se encontró que el conjugado es muy citotóxico contra células de cáncer de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que se conjugó un maitansinoide con un ligador de disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en estirpes celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/*neu*. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la estirpe celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3 x 10⁵ antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado farmacéutico logró un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que se pudo incrementar aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Los complejos de hedgehog cinasa-maitansinoides, incluyendo anticuerpo anti-hedgehog cinasa-maitansinoide (por

ejemplo, anticuerpo anti-GYK-maitansinoide, anticuerpo anti-NEK1-maitansinoide, anticuerpo anti-TTK-maitansinoide, anticuerpo anti-TTBK1-maitansinoide, fragmentos de unión a antígeno u oligopéptidos de los mismos, se pueden preparar enlazando químicamente el anticuerpo, fragmento u oligopéptido a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo, fragmento, oligopéptido o la molécula de maitansinoide. Una media de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia potenciando la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se podría esperar que incluso una molécula de toxina/anticuerpo potencie la citotoxicidad con respecto al uso de anticuerpo solo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica, y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas, o se pueden aislar de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se describen, por ejemplo, en la patente U.S. nº 5.208.020 y en otras patentes y publicaciones no de patentes citadas aquí anteriormente. Los maitansinoides preferidos 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.

Existen muchos grupos enlazantes conocidos en la técnica para obtener conjugados de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos con maitansinoides, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la patente U.S. nº 5.208.020 o la patente EP 0 425 235 B1, y en Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992). Los grupos enlazantes incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas, o grupos lábiles a estererasas, como se describen en las patentes identificadas anteriormente, prefiriéndose los grupos disulfuro y tioéter.

Los conjugados del anticuerpo o fragmento de anticuerpo y maitansinoide se pueden obtener usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como hidrocloreuro de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azídicos (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina, derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos fluorados bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), (Carlsson et al., *Biochem. J.* 173:723-737 [1978]) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP), para proporcionar un enlace de disulfuro.

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

c. Caliqueamicina

Otro inmunconjugado de interés comprende anticuerpo anti-hedgehog cinasa, un fragmento de anticuerpo de unión a hedgehog cinasa, u oligopéptido de hedgehog cinasa conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir rupturas de ADN bicatenario a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véanse las patentes U.S. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas ellas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, $\gamma_1^1, \alpha_2^1, \alpha_3^1, N$ -acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman et al., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode et al., *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) y las patentes U.S. mencionadas anteriormente de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que se puede conjugar el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto caliqueamicina como QFA tienen sitios de acción intracelulares y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

d. Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar a los antagonistas anti-hedgehog cinasa (anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, oligopéptido) de la invención incluyen BCNU, estreptozoicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las patentes U.S. 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (patente U.S. 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden usar incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica carantia,

curcina, crotina, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

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

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo muy radioactivo. Existe una variedad de isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos anti-hedgehog cinasa radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} , e isótopos radioactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para diagnóstico, puede comprender un átomo radioactivo para estudios de centelleo, por ejemplo Tc^{99m} o I^{123} , o un marcador de espín para la formación de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes de resonancia magnética, mri), tales como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

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

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden obtener usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como hidrocloreto de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azídicos (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina, derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos fluorados bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de un radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO 94/11026. El ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un ligador lábil a ácidos, un ligador sensible a peptidasas, un ligador fotolábil, un ligador de dimetilo o un ligador que contiene disulfuro (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); Patente U.S. n° 5.208.020).

Como alternativa, se puede obtener una proteína de fusión o una molécula quimérica que comprende el antagonista de hedgehog cinasa (por ejemplo anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, oligopéptido) y 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 ligador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

El anticuerpo descrito se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en la preselección de un tumor, en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de aclaramiento y administrando después un "ligando" (*por ejemplo*, avidina) que está conjugado a un agente citotóxico (*por ejemplo*, un radionucleótido).

B. Oligopéptidos de unión a hedgehog cinasa

Los oligopéptidos de unión a hedgehog cinasa u oligopéptido de hedgehog cinasa descritos aquí son oligopéptidos que se unen, de forma preferiblemente específica a un péptido de hedgehog cinasa como se describe aquí. Los oligopéptidos de unión a hedgehog cinasa se pueden sintetizar químicamente usando metodología de síntesis oligopeptídica conocida, o se pueden preparar y purificar usando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de hedgehog cinasa tienen habitualmente al menos alrededor de 5 aminoácidos de longitud, como alternativa tienen una longitud de al menos alrededor de 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ó 100 aminoácidos o más, en el que tales oligopéptidos son capaces de unirse, de forma preferiblemente específica, a un polipéptido de hedgehog cinasa como se describe aquí. Los oligopéptidos de hedgehog cinasa se pueden identificar sin experimentación innecesaria usando técnicas bien conocidas. A este respecto, se señala que las técnicas para identificar librerías oligopeptídicas para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a una diana polipeptídica son bien conocidos en la técnica (*véanse, por ejemplo*, las patentes U.S. n°s 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; las publicaciones PCT n°s WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002

(1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen et al., en Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378; Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

A este respecto, la presentación de bacteriófagos (fagos) es una técnica bien conocida que permite identificar grandes librerías oligopeptídicas para identificar un miembro o miembros de aquellas librerías que son capaces de unirse específicamente a una diana polipeptídica. La presentación de fagos es una técnica mediante la cual se presentan polipéptidos variantes como proteínas de fusión a la proteína de cubierta sobre la superficie de partículas de bacteriófagos (Scott, J.K. y Smith, G. P. (1990) Science 249: 386). La utilidad de la presentación de fagos se basa en el hecho de que se pueden clasificar rápida y eficientemente grandes librerías de variantes proteicas selectivamente aleatorizadas (o ADNc clonados aleatoriamente) para aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con afinidad elevada. La presentación de librerías peptídicas (Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378) o proteicas (Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363) en un fago se ha usado para identificar millones de polipéptidos u oligopéptidos en busca de aquellos con propiedades de unión específica (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668). La clasificación de librerías de fagos de mutantes aleatorios requiere una estrategia de construir y propagar un gran número de variantes, un procedimiento para la purificación mediante afinidad usando el receptor diana, y un medio para evaluar los resultados de los enriquecimientos de la unión. Patentes U.S. n^{os} 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, y 5.663.143.

Aunque la mayoría de los métodos de presentación de fagos han usado sistemas de presentación de fagos filamentosos y de fagos lamboides (documentos WO 95/34683; U.S. 5.627.024), también se conocen sistemas de presentación de fagos T4 (Ren et al., Gene, 215: 439 (1998); Zhu et al., Cancer Research, 58(15):3209-3214 (1998); Jiang et al., Infection & Immunity, 65(11): 4770-4777 (1997); Ren et al., Gene, 195(2):303-311 (1997); Ren, Protein Sci., 5: 1833 (1996); Efimov et al., Virus Genes, 10: 173 (1995)) y sistemas de presentación de fagos T7 (Smith y Scott, Methods in Enzymology, 217: 228-257 (1993); patente U.S. 5.766.905).

Ahora se han desarrollado muchas otras mejoras y variaciones del concepto básico de presentación de fagos. Estas mejoras potencian la capacidad de los sistemas de presentación para identificar librerías peptídicas para la unión a moléculas diana seleccionadas y presentar proteínas funcionales con el potencial de identificar aquellas proteínas en busca de las propiedades deseadas. Se han desarrollado dispositivos de reacción combinatorios para reacciones de presentación de fagos (documento WO 98/14277), y se han usado librerías de presentación de fagos para analizar y controlar interacciones bimoleculares (documentos (WO 98/20169; WO 98/20159) y propiedades de péptidos helicoidales restringidos (documento WO 98/20036). El documento WO 97/35196 describe un método para aislar un ligando de afinidad en el que una librería de presentación de fagos se pone en contacto con una disolución en la que el ligando se unirá a una molécula diana, y una segunda disolución en la que el ligando de afinidad no se unirá a una molécula diana, para aislar selectivamente ligandos de unión. El documento WO 97/46251 describe un método de biocribado mediante inmunoadsorción de una librería de presentación de fagos aleatoria con un anticuerpo purificado por afinidad, y de aislamiento después del fago de unión, seguido de un proceso de microcribado por inmunoadsorción usando pocillos de microplacas para aislar el fago de unión de alta afinidad. También se ha dado a conocer el uso de la proteína A de *Staphylococcus aureus* como una etiqueta de afinidad (Li et al. (1998) Mol Biotech., 9:187). El documento WO 97/47314 describe el uso de librerías de sustracción de sustratos para distinguir especificidades enzimáticas usando una librería combinatoria que puede ser una librería de presentación de fagos. En el documento WO 97/09446 se describe un método para seleccionar enzimas adecuadas para uso en detergentes usando presentación de fagos. En las patentes U.S. n^{os} 5.498.538, 5.432.018 y el documento 98/15833 se describen métodos adicionales para seleccionar proteínas de unión específicas.

Los métodos para generar librerías peptídicas e identificar estas librerías también se describen en las patentes U.S. n^{os} 5.723.286, 5.432.018, 5.580.717, 5.427.908, 5.498.530, 5.770.434, 5.734.018, 5.698.426, 5.763.192, y 5.723.323.

C. Identificación de antagonistas de hedgehog cinasa

Las técnicas para generar los antagonistas de hedgehog cinasa (polipéptidos, anticuerpos, polipéptidos, oligopéptidos, moléculas de ARNi, constructos de ARNi, ribozimas y moléculas orgánicas) para uso se han descrito anteriormente. Se pueden seleccionar además anticuerpos (y sus fragmentos de unión a antígeno), oligopéptidos u otras moléculas orgánicas con ciertas características biológicas, según se desee.

Los efectos inhibidores del crecimiento de los diversos antagonistas de hedgehog cinasa utilizables en la invención se pueden evaluar mediante métodos conocidos en la técnica, *por ejemplo* usando células que expresan un polipéptido de hedgehog cinasa ya sea endógenamente o después de la transfección con el gen de hedgehog cinasa. Por ejemplo, las estirpes celulares tumorales apropiadas y las células transfectadas con ácido nucleico que codifica hedgehog cinasa se pueden tratar con los antagonistas de hedgehog cinasa de la invención a diversas

concentraciones durante unos pocos días (*por ejemplo*, 2-7 días) y se pueden teñir con violeta de cristal o MTT, o se pueden analizar mediante algún otro ensayo colorimétrico. Otro método para medir la proliferación sería comparando la captación de ^3H -timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de tales antagonistas de hedgehog cinasa. Después del tratamiento, las células se cosechan, y la cantidad de radiactividad 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 que se sabe que inhibe el crecimiento de esa estirpe celular. La inhibición del crecimiento de células tumorales *in vivo* se puede determinar de diversas maneras conocidas en la técnica. Preferiblemente, la célula tumoral es aquella que sobreexpresa un polipéptido de hedgehog. Preferiblemente, tales antagonistas de hedgehog cinasa inhibirán *in vitro* o *in vivo* la proliferación celular de una célula tumoral que expresa hedgehog en alrededor de 25-100% en comparación con una célula tumoral no tratada, más preferiblemente en alrededor de 30-100%, e incluso más preferiblemente en alrededor de 50-100% o 70-100%, en una realización, a una concentración de anticuerpo de alrededor de 0,5 a 30 $\mu\text{g/ml}$. La inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de antagonista de hedgehog cinasa de alrededor de 0,5 a 30 $\mu\text{g/ml}$ o alrededor de 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, en el que la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al antagonista. El antagonista es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del antagonista y/o agonista a alrededor de 1 $\mu\text{g/kg}$ a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal da como resultado una reducción en el tamaño del tumor o una reducción de la proliferación de las células tumorales en alrededor de 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferiblemente en alrededor de 5 a 30 días.

Para seleccionar los antagonistas de hedgehog cinasa que inducen la muerte celular, se puede evaluar la pérdida de integridad de membrana como se indica, *por ejemplo*, mediante captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripán o 7AAD, con relación a un control. Se puede llevar a cabo un ensayo de captación de PI en ausencia de células efectoras inmunitarias y del complemento. Las células tumorales que expresan el polipéptido de hedgehog cinasa se incuban con medio solo o medio que contiene el antagonista de hedgehog cinasa apropiado. Las células se incuban durante un período de tiempo de 3 días. Después de cada tratamiento, las células se lavan y se distribuyen en alícuotas en tubos de 12 x 75 con tapa de colador de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de grumos celulares. Los tubos reciben entonces PI (10 $\mu\text{g/ml}$). Las muestras se pueden analizar usando un citómetro de flujo FACSCAN® y software FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Entonces se pueden seleccionar aquellos antagonistas de hedgehog cinasa que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular, según se determina mediante la captación de PI.

Para identificar anticuerpos anti-hedgehog cinasa que se unen a un epítipo en un polipéptido de hedgehog cinasa, se puede llevar a cabo un ensayo habitual de bloqueo cruzado, tal como el descrito en Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Este ensayo se puede usar para determinar si un anticuerpo de ensayo, oligopéptido u otra molécula orgánica se une al mismo sitio o epítipo como un anticuerpo anti-hedgehog cinasa conocido. Como alternativa, o adicionalmente, se puede llevar a cabo el cartografiado epitópico mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo se puede mutagenizar tal como mediante barrido de alanina, para identificar restos de contacto. El anticuerpo mutante se ensaya inicialmente para determinar la unión con anticuerpo policlonal para asegurar el plegamiento apropiado. En un método diferente, los péptidos que corresponden a diferentes regiones de un polipéptido de hedgehog cinasa se pueden usar en ensayos de competición con los anticuerpos de ensayo o con un anticuerpo de ensayo y un anticuerpo con un epítipo caracterizado o conocido.

D. Variantes del polipéptido de hedgehog cinasa

Además de los polipéptidos de hedgehog cinasa descritos aquí, se contempla que se pueden preparar variantes de tales moléculas. Tales variantes se pueden preparar introduciendo cambios nucleotídicos apropiados en el ADN codificante, y/o mediante síntesis del anticuerpo o polipéptido deseado. Los expertos en la técnica apreciarán que los cambios de los aminoácidos pueden alterar procesos post-traduccionales de estas moléculas, tal como el cambio del número o posición de sitios de glucosilación, o alteración de las características de anclaje de la membrana.

Se pueden realizar variaciones en la secuencia de aminoácidos, por ejemplo usando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la patente U.S. n° 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, eliminación o inserción de uno o más codones que codifican la secuencia de aminoácidos que da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es mediante sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios de la secuencia de aminoácidos de interés. Se puede encontrar una guía a la hora de determinar qué resto de aminoácido se puede insertar, sustituir o suprimir sin afectar adversamente a la actividad deseada comparando la secuencia de aminoácidos de interés con moléculas proteicas conocidas homólogas, y minimizando el número de cambios de la secuencia de aminoácidos realizados en regiones de alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, *es decir*, sustituciones de aminoácidos conservativas. Las inserciones o supresiones pueden estar opcionalmente en el intervalo de alrededor de 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida

se puede determinar realizando sistemáticamente inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia, y ensayando las variantes resultantes para determinar la actividad mostrada por la secuencia nativa madura o de longitud completa.

5 Se proporcionan aquí fragmentos de los diversos polipéptidos de hedgehog cinasa. Tales fragmentos se pueden truncar en el término N o en el término C, o pueden carecer de restos internos, por ejemplo, cuando se comparan con un anticuerpo o proteína nativa de longitud completa. Tales fragmentos que carecen de restos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada también son útiles con los métodos descritos.

10 Los fragmentos polipeptídicos anteriores se pueden preparar mediante cualquiera de un número de técnicas convencionales. Los fragmentos peptídicos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un enfoque alternativo implica generar tales fragmentos mediante digestión enzimática, *por ejemplo* tratando la proteína con una enzima que se sabe que escinde proteínas en sitios definidos por restos de aminoácidos particulares, o digiriendo el ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando el fragmento deseado. Aún otra técnica adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica el fragmento deseado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los términos deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores de 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, tales fragmentos comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con la molécula de longitud completa correspondiente.

20 Las sustituciones conservativas de interés se muestran en la Tabla 5 bajo el encabezamiento de sustituciones preferidas. Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, denominados sustituciones ejemplares en la Tabla 5, o como se describe adicionalmente más abajo con referencia a las clases de aminoácidos, y los productos se criban a fin de identificar la variante deseada.

Tabla 5

Resto Original	Sustituciones Ejemplares	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)	Pro; 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	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe

Val (V) Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina Leu

5 Las modificaciones sustanciales en la función o identidad inmunológica de los polipéptidos variantes de hedgehog cinasa se logran seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto a la hora de mantener (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustituciones, por ejemplo como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades de cadenas laterales habituales:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr; Asn; Gln

(3) ácidos: Asp, Glu;

10 (4) básicos: His, Lys, Arg;

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

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

15 Las sustituciones no conservativas supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Tales restos sustituidos también se pueden introducir en los sitios de sustitución conservativa, o, más preferiblemente, en los sitios que queden (no conservados).

20 Las variaciones se pueden realizar usando métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al sitio), barrido de alanina, y mutagénesis de PCR. La mutagénesis dirigida al sitio [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], la mutagénesis de casete [Wells et al., Gene, 34:315 (1985)], la mutagénesis de selección de restricción [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)], u otras técnicas conocidas se pueden llevar a cabo sobre el AND clonado, para producir la molécula de hedgehog cinasa.

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

30 Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada de los polipéptidos variantes de hedgehog cinasa también se puede sustituir, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. Por el contrario, se puede añadir un enlace o enlaces de cisteína a tal molécula para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

35 Un tipo particularmente preferido de variante sustitucional implica sustituir uno o más restos de una región de unión. Por ejemplo, en el caso de un antagonista de hedgehog cinasa que es un anticuerpo anti-hedgehog cinasa, restos de región hipervariable de un anticuerpo progenitor (*por ejemplo*, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas con relación al anticuerpo progenitor a partir del cual se generan. Una forma conveniente para generar tales variantes sustitucionales implican la maduración de afinidad usando presentación de fagos. De forma breve, varios sitios de región hipervariable (*por ejemplo*, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes así generadas se presentan de una manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado en cada partícula. Las variantes presentadas en los fagos se identifican entonces en busca de su actividad biológica (*por ejemplo*, afinidad de unión) como se describe aquí. A fin de identificar sitios de región hipervariable candidatos para la modificación, se puede llevar a cabo una mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al 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 polipéptido diana. Tales restos de contacto y restos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas aquí. Una vez se generan tales variantes, el panel de las variantes se somete a un cribado como se describe aquí, y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos

pertinentes se pueden seleccionar para el desarrollo posterior.

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

E. Preparación de polipéptidos de hedgehog

La descripción a continuación se refiere principalmente a la producción de polipéptidos de hedgehog cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico tales como anticuerpos, polipéptidos, oligopéptidos. Para los fines de esta sección solamente, la expresión "polipéptidos de hedgehog" debe incluir componentes de señalización de hedgehog, así como ciertos antagonistas de hedgehog cinasa (*es decir*, anticuerpos, polipéptidos, oligopéptidos que se pueden preparar convenientemente mediante tecnología recombinante. Por supuesto, se contempla que se pueden emplear métodos alternativos, que son bien conocidos en la técnica, para preparar tales anticuerpos, polipéptidos y oligopéptidos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o porciones de la misma, se puede producir mediante síntesis peptídica directa usando técnicas en fase sólida [véanse, *por ejemplo*, Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)]. La síntesis proteica *in vitro* se puede llevar a cabo usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede lograr, por ejemplo, usando un sintetizador peptídico de Applied Biosystems Peptide (Foster City, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Diversas porciones de tales anticuerpos, polipéptidos u oligopéptidos se pueden sintetizar químicamente de forma separada, y se pueden combinar usando métodos químicos o enzimáticos para producir el producto deseado.

1. Aislamiento de ADN que codifica polipéptidos de hedgehog

El ADN que codifica un polipéptido de hedgehog se puede obtener a partir de una librería de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee tal ARNm de anticuerpo, polipéptido u oligopéptido, y lo expresa a un nivel detectable. En consecuencia, el ADN que codifica tales polipéptidos se puede obtener convenientemente a partir de una librería de ADNc preparada de tejido humano, una librería genómica o mediante procedimientos sintéticos conocidos (*por ejemplo* síntesis de ácidos nucleicos automatizada).

Las librerías se pueden identificar con sondas (tales como oligonucleótidos de al menos alrededor de 20-80 bases), diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por él. La identificación de la librería de ADNc o de la librería genómica con la sonda seleccionada se puede llevar a cabo usando procedimientos estándar, tales como se describe en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Como alternativa, se puede usar metodología de PCR. [Sambrook et al., más arriba; Dieffenbach et al., PCR Primer; A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Las técnicas para identificar una librería de ADNc son bien conocidas en la técnica. Las secuencias oligonucleotídicas seleccionadas como sondas deberían tener suficiente longitud y ser suficientemente no ambiguas de manera que se minimicen los falsos positivos. El oligonucleótido se marca preferiblemente de manera que se pueda detectar al hibridarse a ADN en la librería que se identifica. Los métodos para el marcaje son bien conocidos en la técnica, e incluyen el uso de radiomarcadores como ATP marcado con ³²P, biotilación o marcaje enzimático. En Sambrook *et al.*, más arriba, se proporcionan condiciones de hibridación, que incluyen restricción moderada y restricción elevada.

Las secuencias identificadas en tales métodos de identificación de librerías se pueden comparar y alinear con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácidos o de nucleótidos) en las regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa se puede determinar usando métodos conocidos en la técnica y como se describen aquí.

El ácido nucleico que tiene la secuencia codificante de la proteína se puede obtener identificando librerías seleccionadas de ADNc o librerías genómicas usando la secuencia de aminoácidos deducida descrita aquí por primera vez, y, si es necesario, usando procedimientos de extensión con cebadores convencionales como se describe en Sambrook *et al.*, más arriba, para detectar precursores e intermedios de procesamiento de ARNm que puede que no se hayan transcrito de forma inversa en ADNc.

2. Selección y transformación de células hospedantes

Las células hospedantes se transfectan o transforman con vectores de expresión o de clonación descritos aquí para la producción de polipéptidos de hedgehog y cultivados en medios nutrientes convencionales modificados según sea

apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medio, temperatura, pH y similares, se pueden seleccionar por el experto sin experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, más arriba.

Los métodos de transfección de células eucariotas y de transformación de células procariotas son conocidos para el experto, por ejemplo transfección mediante CaCl_2 , CaPO_4 , mediada por liposomas, y electroporación. Dependiendo de la célula hospedante usada, la transformación se lleva a cabo usando técnicas estándar apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook *et al.*, más arriba, o la electroporación se usa generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células vegetales, como se describe por Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) y el documento WO 89/05859, publicado el 29 de junio de 1989. Para células de mamíferos sin tales paredes celulares, se puede emplear el método de precipitación con fosfato de calcio, de Graham y van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Los aspectos generales de las transfecciones de sistemas hospedantes de células de mamíferos se han descrito en la patente U.S. nº 4.399.216. Las transformaciones en levaduras se llevan a cabo típicamente según el método de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130:946 (1977) y Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). Sin embargo, también se pueden usar otros métodos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policones, *por ejemplo*, polibreno, poliornitina. Para las diversas técnicas para transformar células de mamíferos, véanse Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) y Mansour *et al.*, *Nature*, 336:348-352 (1988).

Las células hospedantes adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores aquí incluyen células procariotas, de levadura, o de eucariotas superiores. Los procariotas adecuados incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo enterobacteriaceas tales como *E. coli*. Existen públicamente diversas cepas de *E. coli*, tales como la cepa MM294 de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); la cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células hospedantes procariotas adecuadas incluyen enterobacteriaceas tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son más bien ilustrativos y no limitantes. La cepa W3110 es un hospedante u hospedante progenitor particularmente preferido, debido a que es una cepa hospedante común para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula hospedante segrega cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al hospedante, incluyendo los ejemplos de tales hospedantes la cepa 1A2 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa 9E4 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; la cepa 27C7 de *E. coli* W3110 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^r*; la cepa 37D6 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; la cepa 40B4 de *E. coli* W3110, que es la cepa 37D6 con la mutación de supresión de *degP* no resistente a canamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante, descrita en la patente U.S. nº 4.946.783, expedida el 7 de agosto de 1990. Como alternativa, son adecuados los métodos *in vitro* de clonación, *por ejemplo* PCR u otras reacciones de polimerasa de ácidos nucleicos.

El anticuerpo de longitud completa, los fragmentos de anticuerpo, y las proteínas de fusión con anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular cuando no se necesitan ni la glucosilación ni la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga a un agente citotóxico (*por ejemplo*, una toxina) y el propio inmunoconjugado 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 eficiente desde el punto de vista del coste. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véanse, *por ejemplo*, U.S. 5.648.237 (Carter *et al.*), U.S. 5.789.199 (Joly *et al.*), y U.S. 5.840.523 (Simmons *et al.*), que describe la región de iniciación de la traducción (TIR) y secuencias señal para optimizar la expresión y secreción, incorporándose estas patentes aquí como referencia. Después de la expresión, el anticuerpo se aísla de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar mediante, *por ejemplo*, una columna de proteína A o G, dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de forma similar al procedimiento para purificar anticuerpo expresado en células adecuadas (*por ejemplo*, células CHO).

Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedantes adecuados de clonación o expresión para vectores que codifican polipéptidos de hedgehog. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedante eucariota inferior usado habitualmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; documento EP 139.383, publicado el 2 de mayo de 1985); hospedantes de *Kluyveromyces* (patente U.S. nº 4.943.529; Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)), tales como, *por ejemplo*, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, *J. Bacteriol.*, 154 (2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii*

(ATCC 56,500), *K. drosophilorum* (ATCC 36,906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28: 265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538 publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, *por ejemplo*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357. publicado el 10 de enero de 1991), y hospedantes de *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilbum et al., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilotrópicas son adecuadas aquí, e incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz de crecer en metanol, seleccionada del género que consiste en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. En C. Anthony, The Biochemistry of Methylophs, 269 (1982) se puede encontrar una lista de especies específicas que son ejemplares de esta clase de levaduras.

Las células hospedantes adecuadas para la expresión de la producción de polipéptido de hedgehog cinasa glucosilado derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insectos tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales, tales como cultivos celulares de algodón, maíz, patata, haba de soja, petunia, tomate, y tabaco. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas, y células hospedantes de insectos permisivas correspondientes, a partir de hospedantes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Existe públicamente una variedad de 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 tales virus se pueden usar como el virus aquí según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento normal. Los ejemplos de estirpes celulares hospedantes de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de bebé de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino /-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CVI ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino 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 N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y la línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedantes se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos anteriormente para la producción del polipéptido de hedgehog, y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

40 3. Selección y uso de un vector replicable

El ácido nucleico (*por ejemplo*, ADNc o ADN genómico) que codifica el polipéptido de hedgehog respectivo se puede insertar en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Existen públicamente diversos vectores. El vector puede estar, *por ejemplo*, en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica, o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada se puede insertar en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasas de restricción apropiados, usando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, una o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transfección. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligamiento estándar que son conocidas por el experto.

El polipéptido de hedgehog se puede producir de forma recombinante no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el término N de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica la secuencia madura que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota, seleccionada, *por ejemplo*, del grupo de los líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o enterotoxina II termoestable. Para la secreción por levaduras, la secuencia señal puede ser, *por ejemplo*, el líder de invertasa de levadura, el líder del factor alfa (incluyendo líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, describiéndose este último en la patente U.S. n° 5.010.182), o un líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179, publicado el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en el documento WO 90/13646, publicado el 15 de noviembre de

1990. En la expresión en células de mamífero, las secuencias señal de mamíferos se pueden usar para la secreción directa de la proteína, tal como secuencia señal de polipéptidos segregados de la misma especie o una especie relacionada, así como líderes secretorios víricos.

5 Tanto los vectores de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedantes seleccionadas. Tales secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras, y virus. El origen de replicación a partir del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras, y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero.

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

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

25 Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor enlazado operablemente a la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos deseada, a fin de dirigir la síntesis del ARNm. Los promotores reconocidos por una variedad de células hospedantes potenciales son bien conocidos. Los promotores adecuados para uso con hospedantes procariotas incluyen los sistemas de promotores de β -lactamasa y de lactosa [Chang et al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)], el sistema del promotor de fosfatasa alcalina, un sistema del promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); documento EP 36.776], y promotores híbridos tales como el promotor *tac* [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25
30 (1983)]. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.), enlazado operablemente al ADN que codifica la secuencia proteica deseada.

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

40 Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. En el documento EP 73.657 se describen adicionalmente vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levaduras.

45 La transcripción del ADN en células hospedantes de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus de polioma, el virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504, publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B, y el virus 40 de simios (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, *por ejemplo* el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, con la condición de que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedantes.
50

La transcripción de un ADN que codifica el polipéptido de hedgehog se puede incrementar insertando en el vector una secuencia potenciadora. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en *cis*, habitualmente de alrededor de 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras procedentes de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores
55

adenovíricos. El potenciador se puede empalmar en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia codificante de las secuencias de aminoácidos precedentes, pero está situado preferiblemente en un sitio 5' a partir del promotor.

Los vectores de expresión usados en células hospedantes eucariotas (células de levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están disponibles habitualmente a partir de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3' de ADN eucariotas o víricos o ADNc. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo, polipéptido u oligopéptido respectivo descrito en esta sección.

En Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); documento EP 117.060; y documento EP 117.058 se describen aún otros métodos, vectores y células hospedantes adecuados para la adaptación a la síntesis del anticuerpo, polipéptido u oligopéptido respectivo en cultivo celular de vertebrados recombinante.

4. Cultivo de las células hospedantes

Las células hospedantes usadas para producir los polipéptidos de hedgehog se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como Ham's F10 (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle Modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma), son adecuados para el cultivo de las células hospedantes. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patentes U.S. Pat. n^{os} 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o patente U.S. Re. 30.985, se pueden usar como medios de cultivo para las células hospedantes. Cualquiera de estos medios se puede suplementar 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 el fármaco GENTAMYCINTM), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente en concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o cualquier fuente equivalente de energía. También se pueden incluir cualesquiera otros suplementos necesarios en concentraciones apropiadas que serán conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son aquellas usadas previamente con la célula hospedante seleccionada para la expresión, y serán manifiestas para el experto normal.

5. Detección de la amplificación/expresión génica

La amplificación y/o expresión génica se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5201-5205 (1980)], transferencia de punto (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada apropiadamente, basándose en las secuencias proporcionadas aquí. Como alternativa, se pueden emplear anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN, y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. A su vez, los anticuerpos se pueden marcar, y se puede llevar a cabo el ensayo, en el que el dúplex se une a una superficie, de manera que, con la formación del dúplex en la superficie, se puede detectar la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

Como alternativa, la expresión génica se puede medir por métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones tisulares, y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestras pueden ser monoclonales o policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos adecuados para el presente método se pueden preparar frente a un polipéptido u oligopéptido de secuencia nativa, o frente a una secuencia exógena fusionada a ADN y que codifica un epítipo de anticuerpo específico de tal polipéptido u oligopéptido.

6. Purificación de proteína

Los polipéptidos de hedgehog se pueden recuperar del medio de cultivo o a partir de lisados de células hospedantes. Si está unido a la membrana, se puede liberar de la membrana usando una disolución detergente adecuada (*por ejemplo* Triton-X 100), o mediante escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión de lo anterior se pueden destruir por diversos medios físicos o químicos, tales como un ciclo de congelación-descongelación, ultrasonidos, destrucción mecánica, o agentes que destruyen las células.

Puede ser deseable purificar lo anterior de proteínas o polipéptidos celulares recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplares de los procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación por sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A-Sepharose, para eliminar

contaminantes tales como IgG; y columnas que quelan metales, para unir formas etiquetadas con epítipo de las moléculas deseadas. Se pueden emplear diversos métodos de purificación de proteínas, y tales métodos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción usado y del anticuerpo, polipéptido u oligopéptido particular producido para los métodos reivindicados.

Cuando se usan técnicas recombinantes, el polipéptido de hedgehog se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o se puede segregar directamente en el medio. Si tales moléculas se producen intracelularmente, como una primera etapa se elimina el desecho en partículas, ya sea células hospedantes o fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son segregados al espacio periplásmico de *E. coli*. De forma breve, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante alrededor de 30 minutos. El desecho celular se puede eliminar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo es segregado al medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se concentran generalmente en primer lugar usando un filtro para la concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasas, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores, para inhibir la proteólisis, y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes inesperados.

La purificación se puede producir usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc inmunoglobulínico que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al., *EMBO J.* 5:15671575 (1986)). La matriz a la que se fija el ligando de afinidad es muy a menudo agarosa, pero existen otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benzeno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr 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 están disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía en heparina, cromatografía SEPHAROSE™ sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poliácido aspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo a recuperar.

Tras cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes se puede someter a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre alrededor de 2,5-4,5, preferiblemente llevada a cabo a concentraciones salinas bajas (*por ejemplo*, de alrededor de 0-0,25 M de sal).

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los antagonistas de hedgehog cinasa ("agente terapéutico") usadas según la presente invención se pueden preparar para almacenamiento mezclando el agente o agentes terapéuticos que tienen el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington: *The Science of Practice of Pharmacy*, 20ª edición, Gennaro, A. et al., Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000)), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleados, e incluyen tampones tales como acetato, Tris, fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; 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 (menores que alrededor de 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono, incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; tonificantes 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 sodio; complejos metálicos (*por ejemplo*, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG). El anticuerpo comprende preferiblemente el anticuerpo a una concentración entre 5-200 mg/ml, preferiblemente entre 10-100 mg/ml.

Las formulaciones aquí también pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trate, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten de forma adversa entre sí. Por ejemplo, además del agente o agentes terapéuticos anteriores, puede ser deseable

5 incluir en la formulación un anticuerpo adicional, *por ejemplo* un segundo agente terapéutico, o un anticuerpo para alguna otra diana, tal como un factor de crecimiento que afecta al crecimiento del glioma. Como alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, una citocina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antihormonal, y/o un cardioprotector. Tales moléculas se presentan de forma adecuada en combinación en cantidades que son efectivas para el fin pretendido.

10 Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas, preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, *más arriba*.

15 Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices las cuales están en forma de artículos conformados, *por ejemplo* películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (Por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente U.S. n° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -L-glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico, tales como el LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poliácido D-(-)-3-hidroxitúrico.

20 Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Diagnóstico y tratamiento con antagonistas de hedgehog cinasa

25 Para determinar la expresión de hedgehog cinasa en tumor o cáncer, existen diversos ensayos de diagnóstico. En una realización, la sobreexpresión del polipéptido de hedgehog y/o la sobreexpresión del polipéptido se puede analizar mediante inmunohistoquímica (IHC). Las secciones tisulares embebidas en parafina procedentes de una biopsia tumoral se pueden someter a un ensayo de IHC y se puede conceder un criterio de intensidad de tinción del polipéptido de hedgehog cinasa según lo siguiente:

Puntuación 0 – no se observa tinción, o se observa tinción de la membrana en menos de 10% de células tumorales.

30 Puntuación 1+ - se detecta una tinción débil/apenas perceptible de la membrana en más de 10% de las células tumorales. Las células sólo se tiñen en una parte de su membrana.

Puntuación 2+ - se observa una tinción completa débil a moderada de la membrana en más de 10% de las células tumorales.

35 Puntuación 3+ - se observa una tinción completa moderada a fuerte de la membrana en más de 10% de las células tumorales.

Aquellos tumores con puntuaciones de 0 ó 1+ para la expresión de hedgehog cinasa se pueden caracterizar como que no sobreexpresan hedgehog cinasa, respectivamente, mientras que aquellos tumores con puntuaciones de 2+ o 3+ se pueden caracterizar como que sobreexpresan hedgehog cinasa, respectivamente.

40 Como alternativa, o adicionalmente, se pueden llevar a cabo ensayos de FISH, tales como el INFORM® (vendido por Ventana, Arizona) o PATHVISION® (Vysis, Illinois), en tejido tumoral fijado en formalina y embebido en parafina, para determinar el grado (si lo hay) de sobreexpresión de hedgehog cinasa en el tumor.

45 La sobreexpresión o amplificación de hedgehog cinasa se puede evaluar usando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, *por ejemplo* administrando una molécula (tal como un anticuerpo, oligopéptido, molécula orgánica, ARNi, constructo de ARNi, oligonucleótido antisentido) que se une a la molécula a detectar, y que está etiquetada con un marcador detectable (*por ejemplo*, un isótopo radioactivo o un marcador fluorescente), y haciendo un barrido externo del paciente para la localización del marcador.

50 Actualmente, dependiendo de la etapa del cáncer, el tratamiento del cáncer implica una o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para eliminar el tejido canceroso, terapia de radiación, y quimioterapia. La terapia que comprende administrar antagonistas de hedgehog cinasa puede ser especialmente deseable en pacientes ancianos que no toleran bien la toxicidad ni los efectos secundarios de la quimioterapia, y en enfermedad metastásica en la que la terapia de radiación tiene una utilidad limitada. Los antagonistas de hedgehog cinasa dirigidos contra tumores del presente método inventivo también se pueden usar para aliviar cánceres que sobreexpresan hedgehog cinasa con el diagnóstico inicial de la enfermedad o durante la recaída. Para aplicaciones terapéuticas, tales antagonistas

de hedgehog cinasa se pueden usar en combinación con, antes o después de la aplicación de otros agentes convencionales y/o métodos para el tratamiento de glioma, *por ejemplo* hormonas, antiangiógenos, o compuestos radiomarcados, o con cirugía, crioterapia, radioterapia y/o quimioterapia. Los fármacos quimioterapéuticos tales como TAXOTERE® (docetaxel), TAXOL® (paclitaxel), estramustina y mitoxantrona se usan para tratar cáncer, en particular, en pacientes con riesgo muy elevado.

En particular, se contempla la terapia de combinación con paclitaxel y derivados modificados (véase, *por ejemplo*, el documento EP 0600517). El anticuerpo, polipéptido, oligopéptido o molécula orgánica anterior se administrará con una dosis terapéuticamente efectiva del agente quimioterapéutico. En otra realización, tal anticuerpo, polipéptido, oligopéptido o molécula orgánica se administra conjuntamente con quimioterapia para potenciar la actividad y eficacia del agente quimioterapéutico, *por ejemplo* paclitaxel. El Physicians Desk Reference (PDR) describe las dosis de estos agentes que se han usado en el tratamiento de diversos cánceres. El régimen de dosificación y las dosis de estos fármacos quimioterapéuticos mencionados anteriormente que son terapéuticamente efectivos dependerán del cáncer particular que se esté tratando, el grado de la enfermedad y otros factores familiares para el médico de pericia en la técnica, y se pueden administrar por el médico.

En una realización particular, se administra al paciente un inmunoconjugado que comprende tal antagonista de hedgehog cinasa conjugado con un agente citotóxico. Preferiblemente, tal inmunoconjugado es internalizado por la célula, dando como resultado una eficacia terapéutica mayor del inmunoconjugado a la hora de exterminar la célula cancerosa a la que se une. En una realización preferida, el agente citotóxico se dirige o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Los ejemplos de tales agentes citotóxicos se describen anteriormente, e incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y endonucleasas de ADN.

Los antagonistas de hedgehog cinasa anteriores, o sus conjugados con toxinas, se administran a un paciente humano según métodos conocidos, tales como administración intravenosa, *por ejemplo* como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, mediante vías intracraneal, intracerebroespinal, intraarticular, intratecal, intravenosa, intraarterial, subcutánea, oral, tópica, o por inhalación.

Otros regímenes terapéuticos se pueden combinar con la administración de los antagonistas de hedgehog cinasa anteriores. La administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la coadministración consecutiva en cualquier orden, en el que preferiblemente hay un período de tiempo durante el cual ambos (o todos) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Preferiblemente, tal terapia combinada da como resultado un efecto terapéutico sinérgico.

En otra realización, el uso de un medicamento según la presente invención implica la administración combinada de uno o más de los antagonistas de hedgehog cinasa anteriores y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos ejemplares se han proporcionado previamente. Los calendarios de preparación y de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos se pueden usar según las instrucciones de los fabricantes, o como se determina empíricamente por el médico experto. Los calendarios de preparación y de dosificación para tal quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service Ed.*, M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis y modo de administración se escogerán por el médico según criterios conocidos. La dosis apropiada de antagonistas de hedgehog cinasa dependerá del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y curso de la enfermedad, si la administración es con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa (incluyendo) la anamnesis del paciente y la respuesta, y el buen juicio del médico. Los antagonistas de hedgehog cinasa anteriores se pueden administrar de forma adecuada al paciente de una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos. La administración se puede producir mediante infusión intravenosa o mediante inyecciones subcutáneas. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosis candidata inicial para administración al paciente puede ser alrededor de 1 µg/kg a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal (*por ejemplo*, alrededor de 0,1-15 mg/kg/dosis) de antagonista de hedgehog cinasa, ya sea por ejemplo mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial de alrededor de 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de alrededor de 2 mg/kg de tal antagonista de hedgehog cinasa. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. Una dosis diaria típica puede oscilar de alrededor de 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se sostiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. El progreso de esta terapia se puede monitorizar fácilmente por métodos y ensayos convencionales y basado en criterios conocidos por el médico u otras personas de pericia en la técnica.

Además de la administración de la proteína de anticuerpo en paciente, la presente solicitud describe la administración del anticuerpo mediante terapia génica. Tal administración de ácido nucleico que codifica los antagonistas del polipéptido de hedgehog cinasa está englobada por la expresión "administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo". Véase, por ejemplo, el documento WO 96/07321, publicado el 14 de

marzo de 1996, que se refiere al uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

Hay dos enfoques principales para introducir tal ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células del paciente: *in vivo* y *ex vivo*. Para el suministro *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, habitualmente en el sitio en el que es necesario el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, se retiran las células del paciente, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas, y las células modificadas se administran al paciente ya sea directamente o, por ejemplo, encapsuladas en membranas porosas que se implantan en el paciente (véanse, *por ejemplo*, las patentes U.S. n^{os} 4.892.538 y 5.283.187). Existe una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Estas técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del hospedante pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Un vector usado habitualmente para el suministro *ex vivo* del gen es un vector retroviral.

Las técnicas de transferencia de ácido nucleico *in vivo* actualmente preferidas incluyen la transfección con vectores víricos (tales como adenovirus, virus del herpes simple I, o virus adenoasociados) y sistemas a base de lípidos (los lípidos útiles para la transferencia del gen mediada por lípidos son, por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Chol). Para un repaso de los protocolos de marcaje génico y terapia génica actualmente conocidos, véase Anderson et al., *Science* 256:808-813 (1992). Véase también el documento WO 93/25673, y las referencias citadas allí.

H. Artículos de fabricación y kits

Para aplicaciones terapéuticas, el artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o inserto de envase en o asociado con el recipiente, que indica un uso para la inhibición en todo o en parte de la señalización de hedgehog, o como alternativa para el tratamiento de un trastorno o afección que resulta de la activación de la ruta de señalización de hedgehog. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es efectiva para tratar la afección cancerosa, y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede estar en una bolsa de disolución intravenosa o en un vial que tiene un tapón taladrable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un antagonista de hedgehog cinasa. La etiqueta o inserto de envase indica que la composición se usa para tratar glioma. La etiqueta o inserto de envase comprenderá además instrucciones para administrar el antagonista de hedgehog cinasa. Adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), disolución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Además, puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial o del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringuillas.

También se pueden proporcionar kits que son útiles para otros diversos fines, *por ejemplo* para ensayos de exterminio de células que expresan hedgehog cinasa, para la purificación o inmunoprecipitación de hedgehog cinasa a partir de células. Para el aislamiento y purificación del polipéptido de hedgehog cinasa, el kit puede contener el reactivo de unión a hedgehog cinasa respectivo acoplado a perlas (*por ejemplo*, perlas de Sepharose). Se pueden proporcionar kits que contienen tales moléculas para la detección y cuantificación del polipéptido de hedgehog cinasa *in vitro*, *por ejemplo* en un ELISA o una transferencia Western. En cuanto al artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta de inserto o envase en o asociado con el recipiente. El recipiente contiene una composición que comprende al menos uno de tal anticuerpo de unión a hedgehog cinasa, oligopéptido, ARNi, constructo de ARNi o molécula orgánica utilizable con la invención. Se pueden incluir recipientes adicionales que contienen, *por ejemplo*, diluyentes y tampones, anticuerpos de control. La etiqueta o inserto de envase puede proporcionar una descripción de la composición así como instrucciones para el uso *in vitro* o de diagnóstico pretendido.

I. Ácidos nucleicos sentido y antisentido que codifican hedgehog cinasa

Las moléculas que sería de esperar que inhibieran hedgehog cinasa, y por lo tanto activasen o amplificasen la señalización de hedgehog, incluyen fragmentos de los ácidos nucleicos que codifican hedgehog cinasa, tales como oligonucleótidos antisentido o sentido, que comprenden una secuencia de ácido nucleico monocatenaria (ya sea ARN o ADN) capaz de unirse a secuencias de ARNm de hedgehog cinasa diana (sentido) o de ADN de hedgehog cinasa diana (antisentido). Los oligonucleótidos antisentido o sentido descritos aquí comprenden un fragmento de la región codificante del ADN de hedgehog cinasa respectivo. La capacidad para derivar un oligonucleótido antisentido o sentido, basándose en una secuencia de ADNc que codifica una proteína dada, se describe en, por ejemplo, Stein y Cohen (*Cancer Res.* 48:2659, 1988) y van der Krol et al. (*BioTechniques* 6:958, 1988).

La unión de oligonucleótidos antisentido o sentido a secuencias de ácidos nucleicos diana da como resultado la formación de dúplex que bloquean la transcripción o traducción de la secuencia diana por uno de varios medios, incluyendo la degradación potenciada de los dúplex, terminación prematura de la transcripción o traducción, o por

5 otros medios. Tales métodos están englobados por la presente invención. Los oligonucleótidos antisentido se pueden usar así para bloquear la expresión de proteínas de hedgehog cinasa, en la que esas proteínas de hedgehog cinasa pueden desempeñar un papel en la inhibición o atenuación de la señalización de hedgehog. Los oligonucleótidos antisentido o sentido comprenden además oligonucleótidos que tienen cadenas principales de fosfodiéster de azúcar modificadas (u otros enlaces de azúcar, tales como los descritos en el documento WO 91/06629), y en los que tales enlaces de azúcar son resistentes a nucleasas endógenas. Tales oligonucleótidos con enlaces de azúcar resistentes son estables *in vivo* (es decir, son capaces de resistir la degradación enzimática), pero retienen especificidad de secuencia para ser capaces de unirse a secuencias nucleotídicas diana.

10 Los compuestos antisentido usados como se describe aquí se pueden obtener conveniente y normalmente a través de la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para tal síntesis es vendido por varios proveedores, incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Adicionalmente, o como alternativa, se pueden emplear cualesquiera otros medios para tales síntesis conocidos en la técnica. Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y los derivados alquilados. Los compuestos de la invención también se pueden mezclar, encapsular, conjugar o de otro modo asociar con otras moléculas, 15 estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo liposomas, moléculas dirigidas a receptores, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras formulaciones, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes que enseñan la preparación de tales formulaciones que ayudan a la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes U.S. n^{os} 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; 20 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.

25 Otros ejemplos de oligonucleótidos sentido o antisentido incluyen aquellos oligonucleótidos que están enlazados covalentemente a restos orgánicos, tales como los descritos en el documento WO 90/10048, y otros restos que incrementan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácido nucleico diana, tal como poli(L-lisina). Todavía más, los agentes intercalantes, tales como elipticina, y los agentes alquilantes o complejos metálicos se pueden unir a oligonucleótidos sentido o antisentido para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido antisentido o sentido por la secuencia nucleotídica diana.

30 Los oligonucleótidos antisentido o sentido se pueden introducir en una célula y contienen la secuencia de ácido nucleico diana mediante cualquier método de transferencia génica, incluyendo, por ejemplo, la transfección de ADN mediada por CaPO₄, electroporación, o usando vectores de transferencia génica tales como el virus de Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, un oligonucleótido antisentido o sentido 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 doble copia designados DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase el documento WO 90/13641).

40 Los oligonucleótidos sentido o antisentido también se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia nucleotídica diana mediante formación de un conjugado con una molécula de unión a ligandos, como se describe en el documento WO 91/04753. Las moléculas adecuadas de unión a ligandos 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. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de unión a ligandos no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión a ligandos para unirse a su molécula o receptor correspondiente, o bloquear la entrada del oligonucleótido sentido o antisentido, o su versión conjugada, en la célula.

45 Como alternativa, un oligonucleótido sentido o antisentido se puede introducir en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana mediante formación de un complejo de oligonucleótido-lípido, como se describe en el documento WO 90/10448. El complejo de oligonucleótido sentido o antisentido con lípido se disocia preferiblemente en la célula mediante una lipasa endógena.

50 Las moléculas de ARN o ADN antisentido o sentido tienen generalmente al menos alrededor de 5 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos alrededor de 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, ó 1000 nucleótidos de longitud, en las que en este contexto la expresión "alrededor de" significa la longitud de la 55 secuencia nucleotídica citada más o menos 10% de esa longitud citada.

J. Otros antagonistas de hedgehog cinasa

Los antagonistas de hedgehog cinasa descritos aquí pueden ser una ribozima. Las ribozimas son una forma de

oligonucleótidos antisentido en los que las moléculas de ARN catalítico con actividad de ribonucleasa son capaces de escindir un ácido nucleico monocatenario, tal como un ARNm, con el cual tienen una región complementaria (para repasar sobre ribozimas véanse, por ejemplo, Ohkawa, J. et al. (1995) *J. Biochem* 118:251-258; Sigurdsson, S. T. y Eckstein, F. (1995) *Trends Biotechnol* 13: 286-289; Rossi, J. J. (1995) *Trends Biotechnol.* 13:301-306; Kiehnopf, M. et al. (1995) *J. Mol. Med.* 73:65-71). Una ribozima que tiene especificidad por ARNm de hedgehog cinasa humana se puede diseñar basándose en la secuencia nucleotídica del ADNc de hedgehog cinasa humana. Por ejemplo, se puede construir un derivado de un ARN de *Tetrahymena* L-19 IVS, en el que la secuencia de bases del sitio activo es complementaria a la secuencia de bases a escindir en un ARNm de hedgehog cinasa humana. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n^{os} 4.987.071 y 5.116.742, ambas de Cech et al. Como alternativa, el ARNm de hedgehog cinasa humana se puede usar para seleccionar un ARN catalítico que tiene una actividad de ribonucleasa específica a partir de un conjunto de moléculas de ARN. Véase, por ejemplo, Bartel, D. y Szostak, J. W. (1993) *Science* 261: 1411-1418.

Otro tipo de agente inhibidor que se puede usar para inhibir la expresión y/o actividad de hedgehog cinasa humana en una célula es un anticuerpo intracelular específico para la proteína de hedgehog cinasa humana. El uso de anticuerpos intracelulares para inhibir la función proteica en una célula es conocido en la técnica (véanse, por ejemplo, Carlson, J. R. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:2638-2646; Biocca, S. et al. (1990) *EMBO J.* 9:101-108; Werge, T. M. et al. (1990) *FEBS Letters* 274:193-198; Carlson, J. R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7427-7428; Marasco, W. A. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7889-7893; Biocca, S. et al. (1994) *Bio/Technology* 12:396-399; Chen, S.-Y. et al. (1994) *Human Gene Therapy* 5:595-601; Duan, L. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5075-5079; Chen, S.-Y. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5932-5936; Beerli, R. R. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:23931-23936; Beerli, R. R. et al. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204:666-672. Mhashilkar, A. M. et al. (1995) *EMBO J.* 14:1542-1551; Richardson, J. H. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3137-3141; la Publicación PCT n^o WO 94/02610 de Marasco et al.; y la Publicación PCT n^o WO 95/03832 de Duan et al.).

Para inhibir la actividad proteica usando un anticuerpo intracelular, se prepara un vector de expresión recombinante que codifica las cadenas de anticuerpo en una forma tal que, con la introducción del vector en una célula, las cadenas de anticuerpo son expresadas como un anticuerpo funcional en un compartimiento intracelular de la célula. Para la inhibición de la actividad de hedgehog cinasa humana según los métodos inhibidores de la invención, un anticuerpo intracelular que se une específicamente a la proteína de hedgehog cinasa humana es expresado en el citoplasma de la célula. Para preparar un vector de expresión de un anticuerpo intracelular, se aíslan ADNc de cadenas pesada y ligera del anticuerpo que codifican cadenas de anticuerpo específicas para la proteína diana de interés, por ejemplo hedgehog cinasa humana, típicamente de un híbrido que segrega un anticuerpo monoclonal específico para la proteína de hedgehog cinasa humana. Los híbridos que segregan anticuerpos monoclonales anti-hedgehog cinasa humana, o anticuerpos monoclonales recombinantes anti-hedgehog cinasa humana, se pueden preparar como se describe anteriormente. Una vez que se ha identificado un anticuerpo monoclonal específico para la proteína de hedgehog cinasa humana (*por ejemplo*, ya sea un anticuerpo monoclonal derivado de híbrido o un anticuerpo recombinante de una librería combinatoria), se aíslan mediante técnicas de biología molecular estándar los ADN que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal. Para anticuerpos derivados de híbridos, los ADNc de cadenas ligera y pesada se pueden obtener, por ejemplo, mediante amplificación por PCR o cribado de librerías de ADNc. Para anticuerpos recombinantes, tales como los procedentes de una librería de presentación de fagos, el ADNc que codifica las cadenas ligera y pesada se puede recuperar del paquete de presentación (*por ejemplo*, fago) aislado durante el proceso de cribado de la librería. Las secuencias nucleotídicas de los genes de cadenas ligera y pesada del anticuerpo, a partir de los que se pueden preparar los cebadores de PCR o las sondas de la librería de ADNc, son conocidas en la técnica. Por ejemplo, muchas de tales secuencias se describen en Kabat, E. A., et al (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH n^o 91-3242, y en la base de datos de secuencias de líneas germinales humanas "Vbase".

Una vez obtenidas, las secuencias de cadenas ligera y pesada del anticuerpo se clonan en un vector de expresión recombinante usando métodos estándar. Para permitir la expresión citoplásmica de las cadenas ligera y pesada, se eliminan las secuencias nucleotídicas que codifican los líderes hidrófobos de las cadenas ligera y pesada. Un vector de expresión de anticuerpo intracelular puede codificar un anticuerpo intracelular en una de varias formas diferentes. Por ejemplo, en una realización, el vector codifica cadenas ligeras y pesadas de anticuerpo de longitud completa de manera que se exprese intracelularmente un anticuerpo de longitud completa. En otra realización, el vector codifica una cadena ligera de longitud completa, pero sólo se expresa intracelularmente la región VH/CH1 de la cadena pesada, tal como un fragmento Fab. En la realización más preferida, el vector codifica un anticuerpo de una sola cadena (scFv), en el que las regiones variables de las cadenas ligera y pesada están enlazadas mediante un ligador peptídico flexible (*por ejemplo*, (Gly₄Ser)₃), y es expresado como una molécula de una sola cadena. Para inhibir la actividad de hedgehog cinasa humana en una célula, el vector de expresión que codifica el anticuerpo intracelular anti-hedgehog cinasa humana se introduce en la célula mediante métodos de transfección estándar, como se explican aquí anteriormente.

Aún otra forma de un antagonista de hedgehog cinasa descrito es una forma inhibidora de hedgehog cinasa humana, también denominada aquí como inhibidor negativo dominante. Se sabe que las proteínas de hedgehog

cinasa modulan la actividad de las moléculas diana componentes de la señalización de hedgehog, particularmente modulando el estado de fosforilación de la molécula diana componente de la señalización de hedgehog. Otro medio para inhibir la actividad de la molécula que tiene una actividad enzimática es a través del uso de un inhibidor negativo dominante, que tiene la capacidad para interactuar con la molécula diana pero que carece de actividad enzimática. Interaccionando con la molécula diana, tales inhibidores negativos dominantes pueden inhibir la acción de la molécula diana. Este proceso puede ocurrir de forma natural, como un medio para regular la actividad enzimática de una molécula de la transducción de la señal celular.

En consecuencia, un agente inhibidor descrito aquí puede ser una forma de una proteína de hedgehog cinasa humana que tiene la capacidad para interactuar con otras proteínas, pero que carece de actividad enzimática. Esta forma negativa dominante de una proteína de hedgehog cinasa humana puede ser, por ejemplo, una forma mutada de hedgehog cinasa humana, en la que se ha alterado una secuencia de consenso de *cinasa*. Tales proteínas de hedgehog cinasa humanas negativas dominantes se pueden expresar en células que usan un vector de expresión recombinante que codifica la proteína de hedgehog cinasa humana, que es introducido en la célula mediante métodos de transfección estándar. El ADN mutante se inserta en un vector de expresión recombinante, que entonces se introduce en una célula para permitir la expresión de la hedgehog cinasa humana mutada, que carece de actividad enzimática.

Otros agentes inhibidores que se pueden usar para inhibir la actividad de una proteína de hedgehog cinasa humana son compuestos químicos que inhiben directamente la actividad de hedgehog cinasa humana o inhiben la interacción entre hedgehog cinasa humana y moléculas diana. Tales compuestos se pueden identificar usando ensayos de cribado que seleccionan tales compuestos, como se describe con detalle anteriormente.

K. Ensayos de cribado para uso en la identificación de antagonistas de hedgehog cinasa:

Los ensayos se pueden llevar a cabo en una variedad de formatos, ensayos de cribado bioquímicos, ensayos a base de células, y ensayos de cinasas que están bien caracterizados en la técnica.

Todos los ensayos para los antagonistas son habituales por cuanto requieren poner en contacto el fármaco candidato con un polipéptido de hedgehog cinasa (en lo sucesivo "molécula diana"), en condiciones aquí y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen.

En ensayos de unión, la interacción es la unión entre el compuesto candidato y la molécula diana, y el complejo formado se puede aislar o detectar en la mezcla de reacción. En una realización particular, la molécula diana codificada por el gen identificado aquí, o el fármaco candidato, se inmoviliza en una fase sólida, por ejemplo en una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente se logra generalmente revistiendo la superficie sólida con una disolución de la molécula diana, y secando. Como alternativa, se puede usar un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo un anticuerpo monoclonal, específico para la molécula diana a inmovilizar, para anclarla a una superficie sólida. El ensayo se lleva a cabo añadiendo el componente no inmovilizado, que se puede marcar mediante un marcador detectable, al componente inmovilizado. Por ejemplo la superficie revestida que contiene el componente anclado. Cuando la reacción está terminada, los componentes que no han reaccionado se eliminan, por ejemplo mediante lavado, y se detectan los complejos anclados sobre la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado posee un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que se ha producido el complejamiento. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no posee un marcador, la complejación se puede detectar, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado, que se une específicamente al complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato interactúa con pero no se une a una molécula diana particular codificada por un gen identificado aquí, su interacción con ese polipéptido se puede evaluar mediante métodos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Tales ensayos incluyen enfoques tradicionales, tales como, *por ejemplo*, reticulación, coimmunoprecipitación, y copurificación mediante gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína se pueden monitorizar usando un sistema genético a base de levaduras, 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 describe por Chevray y Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, actuando uno como el dominio de unión a ADN, y funcionando el otro como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de levadura descrito en las publicaciones anteriores (denominado generalmente como el "sistema de dos híbridos") aprovecha esta propiedad, y emplea dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana está fusionada al dominio de unión a ADN de GAL4, y la otra, en la que las proteínas activantes candidatas se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen informador de GAL1-*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 vía la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interactúan se detectan con un sustrato cromógeno para β -galactosidasa. Existe comercialmente de Clontech un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones de proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica de dos híbridos. Este sistema también se puede extender a dominios de proteína de cartografía, implicados en interacciones proteicas

específicas, así como a restos de aminoácidos precisos que son cruciales para estas interacciones. Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica una molécula diana identificada aquí y otros componentes intra- o extracelulares se pueden ensayar según lo siguiente: habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra- o extracelular en condiciones y durante un tiempo que permitan la interacción y la unión de los dos productos. Para ensayar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se ejecuta en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción, para que sirva como control positivo. La unión (formación de complejo) entre el compuesto de ensayo y el componente intra- o extracelular presente en la mezcla se monitoriza como se describe aquí anteriormente. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo, indica que el compuesto de ensayo interfiere con la interacción del compuesto de ensayo y su pareja de reacción. Para evaluar candidatos farmacéuticos adecuados, la molécula diana se puede añadir a una célula junto con el compuesto a cribar para una actividad particular (por ejemplo, activación o inhibición de la señalización de hedgehog), y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia de una molécula diana indica que el compuesto de ensayo es un antagonista para la molécula diana. Como alternativa, los antagonistas se pueden detectar combinando la molécula diana y un antagonista potencial con una molécula diana unida a una membrana o con receptores recombinantes en condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitiva. La molécula diana se puede marcar, tal como mediante radioactividad, de manera que el número de moléculas diana unidas al receptor se puede usar para determinar la eficacia del antagonista potencial. El gen que codifica el receptor se puede identificar mediante numerosos métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo cribado mediante inmunoadsorción de ligandos y clasificación mediante FACS. Coligan et al., *Current Protocols in Immun.*, 1(2): Capítulo 5 (1991). Preferiblemente, se emplea la clonación de la expresión, en la que se prepara ARN poliadenilado a partir de una célula sensible a la molécula diana, y la librería de ADNc creada a partir de este ARN se divide en conjuntos y se usa para transfectar células COS u otras células que no son sensibles a la molécula diana. Las células transfectadas que se hacen crecer en portaobjetos de vidrio se exponen a la molécula diana marcada. La molécula diana se puede marcar mediante una variedad de medios, incluyendo yodación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína cinasa específica del sitio. Tras la fijación y la incubación, los portaobjetos se someten a análisis autorradiográfico. Los conjuntos positivos se identifican, y se preparan y se vuelven a transfectar los subconjuntos usando un proceso de formación de subconjuntos y recibado interactivo, produciendo eventualmente un único clon que codifica el receptor putativo. Como enfoque alternativo para la identificación de receptores, la molécula diana marcada se puede enlazar mediante fotoafinidad con la membrana celular o preparaciones de extracto que expresan la molécula receptora. El material reticulado se resuelve mediante PAGE, y se expone a película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor se puede separar por corte, se puede resolver en fragmentos peptídicos, y se puede someter a microsecuenciación proteica. La secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la microsecuenciación se usaría para diseñar un conjunto de sondas oligonucleotídicas degeneradas para cribar una librería de ADNc para identificar el gen que codifica el receptor putativo. En otro ensayo para antagonistas, las células de mamífero que expresan la señalización de hedgehog activa se pueden incubar con la molécula diana marcada, en presencia del compuesto candidato. La capacidad del compuesto para potenciar o bloquear tal señalización de hedgehog se podría medir entonces (*por ejemplo*, midiendo el nivel de activación de *Gli* aguas abajo). Ejemplos más específicos de antagonistas potenciales incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con molécula diana, y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos poli- y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos antiidiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de tales anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Como alternativa, un antagonista potencial puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo una forma mutada de la molécula diana que reconoce el receptor pero que no proporciona ningún efecto, inhibiendo de ese modo competitivamente la acción de la molécula diana. Otro antagonista de hedgehog cinasa potencial es un constructo de ARN o ADN antisentido preparado usando tecnología antisentido, en el que, por ejemplo, una molécula de ARN o ADN antisentido actúa bloqueando directamente la traducción de ARNm al hibridarse a ARNm seleccionado como diana, y evitando la traducción de una proteína. Antagonistas de hedgehog cinasa potenciales adicionales incluyen pequeñas moléculas que se unen al sitio activo, el sitio de unión al receptor, o el sitio de unión al factor de crecimiento u otro sitio de unión relevante del polipéptido de hedgehog cinasa, bloqueando de ese modo la actividad biológica normal del polipéptido de hedgehog cinasa. Los ejemplos de pequeñas moléculas incluyen, pero no se limitan a, péptidos y moléculas semejantes a péptidos pequeños, preferiblemente péptidos solubles, y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos. Los ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de ARN. Los ribozimas actúan mediante hibridación, específica de la secuencia, al ARN diana complementario, seguido de la escisión endonucleolítica. Los sitios de escisión de la ribozima específicos en una diana de ARN potencial se pueden identificar mediante técnicas conocidas. Para otros detalles, véanse, *por ejemplo*, Rossi, *Current Biology*, 4:469-471 (1994), y la publicación PCT n° WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997). Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice usadas para inhibir la transcripción deberían ser monocatenarias, y deberían de estar compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseñan de manera que promueva la formación de triple hélice vía las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, que requieren generalmente tramos considerables de purinas o pirimidinas en una hebra de un dúplex. Para más detalles, véase, *por ejemplo*, la publicación PCT n° WO 97/33551 *más arriba*. Estas pequeñas moléculas se pueden

identificar mediante uno cualquiera o más de los ensayos de cribado explicados aquí anteriormente, y/o mediante cualesquiera otras técnicas de cribado bien conocidas por los expertos en la técnica. Cuando los métodos de cribado se llevan a cabo como un ensayo *ex vivo*, la molécula diana (*por ejemplo*, hedgehog cinasa) puede ser un polipéptido sustancialmente purificado. El sustrato de cinasa (*por ejemplo*, MBP, *Gli*) es un sustrato sustancialmente purificado, en el que el ensayo se fosforila en una reacción con una fuente de fosfato sustancialmente pura que es catalizada por la cinasa. El grado de fosforilación se determina midiendo la cantidad de sustrato fosforilado en la reacción. Se puede usar una variedad de sustratos posibles, incluyendo la propia cinasa, en cuyo caso la reacción de fosforilación medida en el ensayo es una autofosforilación. También se pueden usar sustratos exógenos, incluyendo sustratos proteicos estándar tales como la proteína básica de mielina (MBP); sustratos proteicos de levaduras; sustratos peptídicos sintéticos, y sustratos poliméricos. De estos, MBP y otros sustratos proteicos estándar pueden ser considerados como preferidos (véase el Ejemplo 10). Sin embargo, se pueden identificar otros sustratos que son superiores, mediante afinidad por la cinasa, perturbación mínima de la cinética de reacción, posesión de sitios de reacción individuales únicos u homogéneos, facilidad de manipulación y recuperación después de la reacción, potencial de generación de una señal fuerte, y resistencia o inercia a los compuestos de ensayo. La medida de la cantidad de sustrato fosforilado en el ensayo *ex vivo* anterior de la invención se puede llevar a cabo por medio de inmunoensayo, radioensayo u otros métodos bien conocidos. En una medida por inmunoensayo, se puede usar un anticuerpo (tal como un anticuerpo anti-fosfoserina/treonina de cabra o de ratón) que es específico para restos fosforilados formados durante la reacción. Usando técnicas de ELISA bien conocidas, el propio complejo de anticuerpo anti-fosfoserina/treonina se podría detectar mediante un anticuerpo adicional enlazado a un marcador capaz de desarrollar una señal medible (como *por ejemplo* un marcador fluorescente o radioactivo). Adicionalmente, para ensayar sustratos purificados, se pueden usar ensayos de tipo ELISA en placas de microtitulación. Peraldi et al., *J. Biochem.* 285: 71-78 (1992); Schraag et al., *Anal. Biochem.* 211: 233-239 (1993); Cleavland, *Anal. Biochem.* 190: 249-253 (1990); Farley, *Anal. Biochem.* 203: 151-157 (1992) y Lozaro, *Anal. Biochem.* 192: 257-261 (1991). *Por ejemplo*, los esquemas de detección pueden medir el agotamiento del sustrato durante la reacción de cinasa. Inicialmente, la fuente de sustrato se puede radiomarcarse con un isótopo tal como ^{32}P o ^{33}P , y la cantidad de fosforilación del sustrato se puede medir determinando la cantidad de radiomarcador incorporado en el sustrato durante la reacción. La detección se puede lograr mediante:

(a) placas o perlas que contienen líquido de centelleo comercialmente disponibles usando un contador beta, después de la adsorción a un filtro o a una superficie de un pocillo de microtitulación, o (b) medios fotométricos, después de la unión a una perla o placa de centelleo del ensayo de proximidad por centelleo. Weernink y Kijken, *J. Biochem. Biophys. Methods* 31: 49, 1996; Braunwalder et al., *Anal. Biochem.* 234: 23 (1996); Kentrup et al., *J. Biol. Chem.* 271: 3488 (1996) y Rusken et al., *Meth. Enzymol.* 200: 98 (1991).

Preferiblemente, el sustrato se fija a una superficie de soporte sólido por medio de una unión no específica o, preferiblemente, específica. Tal fijación permite la separación del sustrato fosforilado de la fuente de fosfato marcado no incorporado (tal como trifosfato de adenosina), antes de la detección de la señal. En una realización, el sustrato se puede inmovilizar físicamente antes de la reacción, como mediante el uso de la placa de unión proteica elevada Nunc™ (Hanke et al., *J. Biol. Chem.* 271: 695 (1996)) o las placas de Wallac ScintiStrip™ (Braunwalder et al., *Anal. Biochem.* 234: 23 (1996)). El sustrato también se puede inmovilizar después de la reacción mediante captura en, *por ejemplo*, fosfocelulosa P81 (para péptidos básicos), resina de molibdato ácido/PEI o DEAE, o precipitación con TCA sobre papel Whatman™ 3M, Tiganis et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 325: 289 (1996); Morawetz et al., *Mol. Gen. Genet.* 250: 17 (1996); Budde et al., *Int J. Pharmacognosy* 33: 27 (1995) y Casnellie, *Meth. Enz.* 200: 115 (1991). Todavía otra posibilidad es la fijación del sustrato a la superficie del soporte, tal como mediante conjugación con parejas de unión tal como glutatióna y estreptavidina (en el caso de GST y biotina, respectivamente) que se han fijado al soporte, o vía anticuerpos específicos para las etiquetas que igualmente se fijan al soporte.

Se pueden desarrollar otros métodos de detección que son preferidos a los descritos anteriormente. Especialmente para uso en relación con un cribado de alto rendimiento, se espera que tales métodos muestren una buena sensibilidad y especificidad, un intervalo lineal prolongado, una baja señal del fondo, fluctuación mínima, compatibilidad con otros reactivos y compatibilidad con sistemas de manipulación automatizados.

La eficacia *in vivo* del tratamiento de la presente invención se puede estudiar frente a tumores inducidos clínicamente en diversos modelos de roedor. Las estirpes de células tumorales propagadas en cultivos de células *in vitro* se pueden introducir en roedores experimentales, *por ejemplo* ratones, mediante inyección, *por ejemplo*, mediante la vía subcutánea. Las técnicas para la inducción química de tumores en animales experimentales son bien conocidas en la técnica.

L. Preparación de ARNi

Una "región que codifica ARN" es un ácido nucleico que puede servir como un molde para la síntesis de una molécula de ARN, tal como un complejo de ARN bicatenario. Preferiblemente, la región codificante de ARN es una secuencia de ADN.

La región codificante de ARN codifica preferiblemente un complejo de ARN bicatenario (*por ejemplo*, ARNiP, miARN,

ARNhp) que es capaz de reducir la expresión de un gen o genes particulares. En algunas realizaciones, un complejo de ARN bicatenario se expresa en forma de una molécula de ARN que tiene una estructura de tallo-bucle o una estructura denominada “horquilla de pelo”. Como se usa aquí, estructura de “horquilla de pelo” engloba ARNhp y miARN. En algunas realizaciones, un complejo de ARN bicatenario se expresa en forma de hebras de ARN complementarias o parcialmente complementarias separadas.

Los métodos son bien conocidos en la técnica para el diseño de complejos de ARN bicatenarios, por ejemplo ARNip, miARN, y ARNhp. Por ejemplo, las fuentes y citas que describen el diseño de ARNhp y ARNip efectivos se encuentran en Sandy et al, *BioTechniques* 39:215-224 (2005). Se entiende que las secuencias de un complejo de ARN bicatenario pueden ser de origen natural, o pueden ser sintéticas. Por ejemplo, el Ejemplo 13 describe un miARN híbrido que comprende una porción bicatenaria sintética embebida en la cadena principal de un microARN de origen natural.

El complejo de ARN comprende una región bicatenaria que corresponde a una región de un gen a disminuir expresado en la célula. Una hebra de la región bicatenaria de ARN es sustancialmente idéntica (típicamente, al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idéntica) en secuencia a la secuencia de la región codificante seleccionada para la disminución. La otra hebra de la región bicatenaria (denominada de forma intercambiable “región bicatenaria de ARN”) es complementaria a la secuencia de la región codificante seleccionada para la disminución, o parcialmente complementaria a la región codificante seleccionada para la disminución (típicamente, al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idéntica al complemento de la región codificante seleccionada como diana). Se entiende que la región bicatenaria se puede formar mediante dos ARN separados encadenados, o mediante las porciones autocomplementarias de un ARN individual que tiene una estructura de horquilla de pelo. La región bicatenaria tiene una longitud de al menos alrededor de 15 nucleótidos, y, en algunas realizaciones, tiene una longitud de alrededor de 15 a alrededor de 30 nucleótidos. Sin embargo, en algunos organismos se puede usar efectivamente una región bicatenaria significativamente más larga. En una realización preferida, la región bicatenaria tiene una longitud entre alrededor de 19 y 22 nucleótidos. La región bicatenaria es preferiblemente idéntica a la secuencia nucleotídica diana a lo largo de esta región.

Cuando la región a disminuir está en una familia de genes muy conservados, la secuencia de la región bicatenaria de ARN se puede escoger con la ayuda de una comparación de secuencias, para seleccionar sólo el gen deseado. Por otro lado, si hay una identidad suficiente entre una familia de genes homólogos dentro de un organismo, se puede diseñar una molécula bicatenaria que disminuiría una pluralidad de genes simultáneamente.

En algunas realizaciones, una región codificante de ARN individual en el constructo sirve como un molde para la expresión de ARN de horquilla autocomplementario, que comprende una región sentido, una región de bucle y una región antisentido. Las regiones sentido y antisentido tienen cada una preferiblemente una longitud de alrededor de 15 a alrededor de 30 nucleótidos. La región de bucle tiene preferiblemente una longitud de alrededor de 2 a alrededor de 15 nucleótidos, más preferiblemente una longitud de alrededor de 4 a alrededor de 9 nucleótidos. Tras la expresión, las regiones sentido y antisentido forman un dúplex.

En otra realización, el vector comprende dos regiones codificantes de ARN. La primera región codificante es un molde para la expresión del primer ARN, y la segunda región codificante es un molde para la expresión de un segundo ARN. Tras la expresión, los ARN primero y segundo forman un dúplex. El constructo retroviral también comprende preferiblemente un primer promotor Pol III enlazado operablemente a la primera región codificante de ARN, y un segundo promotor Pol III enlazado operablemente a la segunda región codificante de ARN.

Se entiende que, en ciertas realizaciones, un vector de la invención puede englobar secuencias de ácido nucleico suficientes para formar más de una región codificante de ARN que inhibe la expresión de genes diana distintos. En esta realización, la inhibición simultánea de genes diana distintos se puede lograr con un único vector de la invención. El número de diferentes transcritos de complejo de ARN que se pueden expresar simultáneamente está limitado sólo por la capacidad de empaquetamiento del vector (si se usa un vector vírico), y promotores adyacentes, incluyendo cualquiera de los promotores descritos más abajo, se pueden seleccionar para eliminar o minimizar interferencia y permitir la inhibición simultánea eficiente de múltiples genes diana. La inhibición de múltiples transcritos del constructo de ARN de promotores adyacentes, por ejemplo 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, o 10 o más promotores adyacentes, permite al usuario generar un fenotipo deseado que se desarrolla sólo cuando se seleccionan varias regiones codificantes (por ejemplo, genes) simultáneamente, y permite la manipulación y elucidación de sistemas genéticos complejos.

Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos solamente, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

Los reactivos comercialmente disponibles citados en los ejemplos se usaron según las instrucciones del fabricante, excepto que se indique de otro modo. La fuente de esas células identificadas en los siguientes ejemplos, y en toda la

memoria descriptiva, mediante números de acceso ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA. La presente invención se refiere a CSNK1A1, GYK y PRKRA. Todas las otras cinasas se presentan con fines ilustrativos solamente.

EJEMPLO 1: Un cribado de ARNip de cinasa identifica reguladores de la señalización de hedgehog

Lista de Genes Validados	Ref. Sec. Murina	Ref. Sec. Humana	ID de UNQ	ID de PRO Murino	ID de ADN Murino	ID de PRO Humano	ID de ADN Humano
CDC2L1 *	NM_007661	NM_024011	UNQ7109	PRO22118	DNA188786	PRO111470	DNA363066
CSNK1A1 invención	NM_146087	NM_001892	UNQ3289	PRO22429	DNA188624	PRO100386	DNA254256
GYK invención	NM_008194	NM_000167	UNQ7640	PRO22649	DNA189856	PRO119056	DNA370652
NEK1 *	XM_620663	NM_012224	UNQ10553	PRO44282	DNA245262	PRO113385	DNA364981
PLK1*	NM_011121	NM_005030	UNQ3368	PRO39145	DNA238060	PRO37960	DNA227497
PRKAR1A *	NM_021880	NM_002734	UNQ11001	PRO45644	DNA245338	PRO105508	DNA357103
PRKRA invención	NM_011871	NM_003690	UNQ14535	PRO137956	DNA390234	PRO102445	DNA354038
TTBK2*	NM_080788	NM_173500	UNQ29308	PRO143411	DNA395917	PRO128708	DNA380434
TTK*	NM_009445	NM_003318	UNQ13762	PRO42503	DNA243238	PRO58276	DNA269878
* sólo para comparación							

5

Métodos:

Estirpes celulares

Las células S12 en el cribado de ARNi derivan de células C3H10T1/2 (ATCC) integradas de forma estable con un informador de luciferasa para Hh como se describe en Frank-Kamenetsky et al., J Biol. 1: 10 (2002), y mantenidas según las directrices de ATCC. Las células SV40, usadas para determinar la especificidad de candidatos de Hh, derivan de células C3H10T1/2 integradas de forma estable con el promotor de SV40, que dirige la expresión de luciferasa.

10

Librería de ARNip y controles

Se adquirió de Dharmacon una librería de ARNip de cinasas murinas que contiene 3248 ARNip. La librería contenía cuatro ARNip únicos por gen, con un total de 812 genes consistiendo en todas las cinasas murinas conocidas, y proteínas reguladoras de cinasas. Como control negativo, se usó ARNip no buscador de dianas de Dharmacon (Dharmacon D001210-01), mientras que, como control positivo, se usó ARNip de Smo (Dharmacon M-041026).

15

Cribado mediante ARNip de alto rendimiento de reguladores de Hedgehog

Las librerías de Dharmacon se disolvieron en tampón de ARNip de Dharmacon, y se repartieron en alícuotas en placas hijas, a una concentración de 0,5 uM, y se almacenaron a -80°C. Las placas hijas se descongelaron subsiguientemente el día de la transfección, y se transfirieron 7 µl de cada ARNip a una nueva placa de 96 pocillos con 7 µl de OptiMax® (Gibco). Entonces se añadió al ARNip una mezcla que consiste en 0,3 µl de reactivo Dharmafect #3 con 13,7 µl de OptiMax®, y se incubó durante 20 minutos. Las células S12 se colocaron en placas, a una densidad de 11.000 células/pocillo. Sesenta y cuatro horas después de la transfección, se añadieron 200 ng/ml de Sonic Hedgehog modificada con octilo (O-Shh, Frank-Kamenetsky et al., *mas arriba*) a las células. El sustrato de luciferasa se añadió 24 horas después, usando Steady Lite® según el protocolo del fabricante, y los recuentos se midieron usando el luminómetro Top Count®. El ensayo se realizó por triplicado para cada condición (-/+ 200 ng/ml O-Shh), con una concentración final de 25 nM de ARNip. Se reservó un conjunto separado de placas transfectadas con ARNip, y se usó para medir la viabilidad celular (Promega CellTiter-Glo) según las instrucciones del fabricante. Antes de llevar a cabo el cribado mediante ARNip, se optimizaron varios parámetros para uso en el formato de 96 pocillos, incluyendo el tipo de reactivo de transfección usado, el número de células sembradas, y la concentración de

20

25

30

ARNip. Por ejemplo, las células S12 responden de forma máxima a Hh cuando son confluentes, y se encontró que la siembra de células a alrededor de 80% de confluencia en el momento de la transfección de ARNip dio una respuesta máxima a Hh. Después de la optimización, el cálculo de la puntuación Z de 0,61 indicó que nuestro ensayo fue robusto; Figura 8A.

5 Análisis de los datos

Las medidas de luciferasa se convirtieron en valores de logaritmo natural (LN) y se normalizaron frente a una referencia de placa (control no seleccionador de dianas de Dharmacon, D001210-01). Los valores normalizados triplicados se promediaron, y se calculó para cada ARNip una puntuación de “tratamiento de hedgehog” menos “tratamiento sin hedgehog”. Los genes se consideraron aciertos potenciales si dos o más ARNip frente al gen correspondiente cayeron fuera de 1,5 desviaciones estándar de la media de todos los ARNip en la librería.

10

qRT-PCR

Se recogió ARN de células S12 88 horas después de la transfección de ARNip, para determinar la desactivación del transcrito (iguales condiciones que el cribado), o de células S12 transfectadas con ARNip durante 64 horas y estimuladas después con Hh durante 24 horas, para determinar los efectos sobre genes diana de Hh (*Gli1* y *Ptch1*) usando el RNeasy Mini kit (Qiagen). Las muestras se sometieron entonces a tratamiento con ADNasa I (Invitrogen) durante la purificación, para eliminar la contaminación por ADN genómico. Para los ensayos de qRT-PCR en tiempo real, se usaron 100 ng/pocillo de ARN total como molde, usando el kit One-Step qRT-PCR (Qiagen). Las sondas consistieron en un informador 5'-FAM y un extintor 3'-Tamra. Pocillos por duplicado se ensayaron para determinar la expresión del gen de interés (*Gli-1*, *Ptch1*, y *Rpl19* (control)) usando SDS7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). La abundancia relativa del transcrito se normalizó hasta niveles de RPL19, usando el método 2-Ct. Al correlacionar el fenotipo con la desactivación de ARNm, se encontró que un gen no estaba expresado en nuestra estirpe celular, puesto que el valor de CT fue 40. Esto no fue debido al conjunto de la sonda qRT, puesto que el mismo conjunto dio un valor CT de 23 usando ARNm de testículo.

15

20

El análisis se realizó usando el software SDS (versión 1.7; Applied Biosystems).

Nombre del oligo	Secuencia del cebador de qRT-PCR
mCDC2L1_Directo	GCTGAGCCATGCTGGCA
mCDC2L1_Inverso	GTGAACCATACTCCCGAGCC
mCDC2L1_Sonda	TCTCAAGGTGGGCGACTTTGGGC
mCSNK1A1_Directo	GGC TCC AAG GCC GAA TTT AT
mCSNK1A1_Inverso	CGA AAG AGC CAG ATC CGA TC
mCSNK1A1_Sonda	TCG GTG GAA AAT ACA AAC TGG TGC GG
mGYK_Directo	CAC GTA TGG AAC AGG GTG CTT
mGYK_Inverso	CAG GAG GCC ATG TTC AGA AAA
mGYK_Sonda	TTG TGC AAC ACG GGC CAT AAG TGT G
mNEK1_Directo	GAG GGT AAA AAG CTC AGA TGT TCC
mNEK1_Inverso	AAT GAC AGG CTT CAC CTG CTG
mNEK1_Sonda	TGC CTT TGG AAC TTC TTG AAA CAG GTG GTT
mPLK1_Directo	GGGAGAAAGAGGAACCGGTG
mPLK1_Inverso	AGGTGGCACTCAATGGCC
mPLK1_Sonda	TCCGGGAGACAAATG
mPRKAR1A_Directo	TTTGAACGCGTCCTTGGC
mPRKAR1A_Inverso	TGCTGGATGTTCCGCTTGA
mPRKAR1A_Sonda	CGTGCTCAGACATC

Nombre del oligo	Secuencia del cebador de qRT-PCR
mPRKRA_Directo	CAC CAG TCC TAT CAC CGT GTG T
mPRKRA_Inverso	AGC AGC GTC ACT CTG TGC AT
mPRKRA_Sonda	ACG GCT CAG GCA TCT CCT GTG GC
mTTBK2_Directo	AGT TCA TCA CAG TGA CTC CCA CA
mTTBK2_Inverso	GGA ATT GTA ATC GCA GTC AGGG
mTTBK2_Sonda	TCC CAT GGA GGC ACA AGC AGA AGG
mTTK_Directo	TACCCTTGCCGTACGTAACCTG
mTTK_Inverso	CCCTTTGCCAAGCCTGC
mTTK_Sonda	CCTGCACTTACAGCTGCTGGCGC
Gli1_Directo	GCA GTG GGT AAC ATG AGT GTCT
Gli1_Inverso	AGG CAC TAG AGT TGA GGA ATT GT
Gli1_Sonda	CTC TCC AGG CAG AGA CCC CAGC
Ptch1_Directo	CAG CTC TGT GCC CAG CTA
Ptch1_Inverso	GCA ACA GTC ACC GAA GCA
Ptch1_Sonda	CCC ATC ACC ACT GTG ACG GCTT
Smo_Directo	CCC GGG CCA GGA GCT
Smo_Inverso	AAC CCG CAA CAG GTC CATC
Smo_Sonda	TGG GAG ACA GTG TGC ATG CTG AAGGA
RPL19_Directo	AGA AGG TGA CCT GGA TGA GAA
RPL19_Inverso	TGA TAC ATA TGG CGG TCA ATCT
RPL19_Sonda	CTT CTC AGG AGA TAC CGG GAA TCC AAG

Experimentos de epistasia

5 Se llevaron a cabo experimentos de sobreexpresión de GLI1 y SMO2 por triplicado en formato de 6 pocillos usando 100 nM de ARNip reunidos y reactivo de transfección Dharmafect #3 (Dharmacon). Después de 24 horas, las células se tripsinizaron y se volvieron a colocar en placas sobre placas de 12 pocillos. Al día siguiente (alrededor de 48 horas después de la transfección de ARNip), las células se transfectaron con 400 ng de vector de control, SMOM2, o GLI1, 200 ng de informador de luciferasa para Hh, y 100 ng de TK-Renilla usando Gene Juice (stratagene). El medio se reemplazó después de 6 horas. Después de 48 horas adicionales, las lecturas de luciferasa se midieron usando Dual-Glo Luciferase (Promega), según el protocolo del fabricante. También se midieron los recuentos de Renilla, para normalizar la eficiencia de la transfección plasmídica. Los experimentos se realizaron por triplicado.

15 Para experimentos de ARNip dobles, las células se transfectaron en formato de 96 pocillos con 50 nM de ARNip de Gli3 junto con 50 nM de ARNip candidato (ARNip total de concentración final 100 nM) y reactivo de transfección Dharmafect #4. Se encontró que aunque el reactivo de transfección Dharmafect #4 fue ligeramente más tóxico para las células que Dharmafect #3, las eficiencias de la transfección fueron mucho mayores, como se indica por el nivel de activación de Hh para células tratadas con ARNip de Gli3 (inducción de la ruta de Gli3 Hh de 2 veces para Dharmafect #3 en comparación con 5 veces para Dharmafect #4). Después de 88 horas, los ensayos de luciferasa se realizaron usando Steady Lite® como se describe previamente. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Experimentos con cilios

20 Células IMCD3 (ATCC) murinas se transfectaron usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) con pSuper (Oligoengine) o pSuper-shNek1, y se seleccionaron en medio que contiene 2 µg/ml de puromicina. Después de 3 semanas, el

conjunto que queda de células transfectadas de forma estable se cosechó y se colocó en portaobjetos de cámara de 2 pocillos LabTek, y se hicieron crecer durante 7 días. Las células se fijaron en 4% de formaldehído durante 10 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con disolución salina tamponada con Tris con suero de burro al 10%, 0,5% de Triton X-100. Se incubó anticuerpo anti-tubulina acetilada (1:5000) durante 50 minutos, y se lavó con TBS con 0,1% de Tween-20. Para visualizar la tubulina acetilada, se usó anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Cy3. Para contar la tinción de los núcleos, las células se montaron con medio de montaje Vectorshield DAPI (Vector Laboratories). Para células IMCD3 marcadas con cilios, se usó un microscopio confocal de barrido de láser en posición vertical Zeiss 9LSM 510 Meta/NLO equipado con un objetivo 63X, de inmersión en agua 09-NA, y un Chameleon multi-photon Excitation (650-950 nm) y Ar (488-nm) y dos láseres de He/Ne (543 y 633 nm), para obtener secciones ópticas de 0,5 μm de grosor, que representan alrededor de 15-18 μm de altura z. Para el recuento de células con cilios, se realizaron tres experimentos independientes, con $n = 300$ para cada experimento.

Resultados:

Para llevar a cabo el cribado de ARNi, se usó una librería de ARNip del cinoma dirigida a 812 genes y que consiste en 4 ARNip por gen que suman en total 3248 ARNip únicos (Figura 5C). 64 horas después de la transfección de ARNip, se añadió al medio, para inducir la ruta de Hh Sonic hedgehog (Shh) bacteriamente expresada y purificada. Los ensayos para la actividad de luciferasa se llevaron a cabo después de otras 24 horas. El cribado se llevó a cabo por triplicado para cada tratamiento (con y sin Shh), y un cribado paralelo para medir la viabilidad celular en más de 20% se eliminaron del cribado.

Para analizar los datos, los valores en bruto se transformaron en el logaritmo natural (LN), y después se normalizaron frente a los ARNip de control no seleccionadores de diana promediados dentro de la misma placa (por triplicado en cada placa experimental). El análisis de los datos normalizados mostró coeficientes de correlación entre réplicas que oscilan desde $r = 0,71-0,82$, indicando que el ensayo fue muy reproducible (Figura 5D). Para determinar cuáles ARNip afectaron a la inducción de la ruta de Hh, se determinó para cada ARNip la diferencia entre "tratamiento de Hh" y "tratamiento sin Hh" a partir de los valores triplicados promediados (Figura 5E). Sólo los genes que contuvieron 2 o más ARNip independientes que puntuaron fuera de 1,5 desviaciones estándar de la media de todos los ARNip en la librería se consideraron aciertos potenciales. Usando este criterio, se escogieron 30 cinasas para caracterización posterior.

Para validar los 30 aciertos se repitió el ensayo de luciferasa para Hh con cada uno de los 4 ARNip que seleccionan como dianas a los 30 aciertos, y se encontró que los mismos ARNip frente a 29 de los 30 genes fueron capaces de reducir de forma reproducible la señalización de Hh. (Datos no mostrados). En segundo lugar, mediante RT-PCR cuantitativa, se determinó si la desactivación del informador de luciferasa para Hh se correlacionó con la desactivación de ARNm para cada uno de los 4 ARNip que seleccionan como dianas a los 29 genes (Figura 6A). De los 29 genes, no se pudo detectar la expresión de 1 gen en las células S12, y por lo tanto sólo se pudo hacer una correlación del informador de luciferasa para Hh y la desactivación de ARNm para los 28 genes restantes. Sorprendentemente, muchos de los genes que redujeron la señalización de Hh con sólo 2 de 4 ARNip (Figura 6A, categoría de "2 Aciertos"), carecieron de correlación entre el informador de luciferasa de Hh y la desactivación de ARNm, sugiriendo que la mayoría de los aciertos en esta categoría fueron falsos positivos. De hecho, sólo 2 de los 19 genes (alrededor de 11%) en la categoría de "2 Aciertos" mostraron una correlación entre el informador de luciferasa para Hh y la desactivación del transcrito. Por el contrario, los genes que redujeron la señalización de Hh con al menos 3 ARNip (Figura 6A, categoría " ≥ 3 Aciertos") tuvieron una alta correlación entre el informador de luciferasa para Hh y la desactivación de ARNm. En esta categoría, 9 de 9 genes (100%) mostraron correlación entre la actividad del informador de luciferasa para Hh y la desactivación del transcrito (Figura 6A, categoría " ≥ 3 Aciertos"). De este modo, todavía se observa una tasa significativa de falsos positivos (89%) con 2 ARNip/gen en contraste con 3 ó 4 ARNip/gen.

Números cada vez más crecientes de informes que muestran que los ARNip tienen efectos fuera de diana significativos han generado escepticismo sobre datos producidos por cribados de ARNi de alto rendimiento, enfatizando la necesidad de ensayos secundarios para validar cualesquiera aciertos. Aunque se vio que la correlación del fenotipo con la desactivación del transcrito filtró la mayoría de los falsos positivos, se deseó evaluar adicionalmente si los efectos sobre la señalización de Hh fueron debidos a la desactivación específica del gen o a efectos fuera de diana. Los genes fuera de diana resultantes de la incorporación de una hebra sentido en el complejo de RISC y la inhibición traduccional o "efecto de microARN" que resulta de la similitud de la hebra antisentido con dianas no específicas. Lin et al., *Nucleic Acid Res.* 33: 4527 (2005); Jackson et al., *RNA* 12: 1197 (2006); Birmingham et al., *Nat. Methods* 3: 199 (2006); Fedorov et al., *RNA* 12: 1188 (2006).

Se ha demostrado que la reunión de los ARNip reduce significativamente los efectos fuera de diana a la vez que mantiene la desactivación en la diana. Fedorov et al., *más arriba*. Para distinguir entre fenotipos provocados por un silenciamiento génico en la diana del fuera de diana, se volvieron a sintetizar y se reunieron ARNip correspondientes a cada uno de los cuatro ARNip originales o cada acierto, y se repitió el ensayo de luciferasa para Hh. Como se muestra en la Figura 6B, 9 de los 11 aciertos fueron necesarios para la señalización de Hh. Los 2 aciertos que no se repitieron (Pak6 y Scyll) en este ensayo son probablemente falsos positivos, puesto que la desactivación del

transcrito usando los ARNip reunidos fue igual, si no mejor que, los ARNip individuales, a pesar de la disminución no significativa en la señalización de luciferasa para Hh (compárense las Figuras 6A y 6B).

La tabla en el Ejemplo 1 muestra los 9 aciertos validados del cribado de cinasas. Se buscó después de terminar si los 9 genes se necesitaron específicamente para la señalización de Hh, pero quizás no afectan a la viabilidad o transcripción celular general, ensayando los ARNip reunidos correspondientes para determinar su capacidad para reducir luciferasa expresada a partir de un promotor constitutivo SV40 (luciferasa para SV40). Como se muestra en la Figura 2C, ninguno de los aciertos tuvo un efecto significativo sobre el informador de luciferasa para SV40, sugiriendo que los 9 aciertos son específicamente, aunque a lo mejor no exclusivamente, necesarios para la señalización de Hh (Figura 6C). También se razonó que si los genes candidatos fueron esenciales para la señalización de Hh, serían necesarios para la activación de genes de diana de Hh endógenos, Gli1 y Ptch1. Cuando se estimulan con el ligando Hh, las células tratadas con ARNip de Smo sólo pueden inducir Gli1 y Ptch1 hasta alrededor de 20% del nivel de las células transfectadas con ARNip de control (Figura 6D). Similar a las células tratadas con ARNip de Smo, ARNip que seleccionan a los 9 candidatos condujo a una reducción drástica de la activación de Gli1 y Ptch1 inducida por Hh (Figura 6D). De este modo, los candidatos son necesarios para la señalización de Hh y la activación de genes diana de Hh endógenos.

Para colocar los candidatos en la ruta de Hh, se realizaron experimentos de epistasia usando constructos que sobreexpresan SMO o GLI1 humanos, reguladores positivos conocidos de la ruta, o ARNip frente a Gli3, un regulador negativo conocido de la ruta de Hh. SMO es necesario para transmitir la señal desde Hh hasta los factores de transcripción de GLI, y las mutaciones en SMO humano, que codifica SMOM2 (W535L), conducen a la activación constitutiva de la ruta de Hh [Xie et al., *Nature* 391:90 (1998)]. En células C3H10T1/2, la transfección de SMOM2 puede activar la ruta de una manera independiente del ligando. Murone et al., *Curr. Biol.* 9: 76 (1999). Se razonó que si los genes candidatos actúan aguas arriba de Smo, la desactivación del gen diana no afectaría a la activación de la ruta de Hh mediada por SMOM2. Por el contrario, si los aciertos actuaron aguas abajo de Smo, la desactivación de su expresión evitaría la activación de la ruta mediada por SMOM2. Para evaluar si los aciertos actuaron aguas arriba o aguas abajo de Smo, se transformaron células C3H10T1/2 con los ARNip candidatos y, 48 horas después de la transfección con ARNip, las células se transfectaron con el vector de control de SMOM2 humano, el informador de luciferasa para Hh, y un informador de Renilla para normalizar la eficiencia de la transfección plasmídica. Como control positivo, las células se transfectaron con un control de ARNip no seleccionador de diana y con ARNip de Smo, los cuales no deberían afectar a la capacidad de SMOM2 para activar la ruta (Figura 7A). La sobreexpresión de SMOM2 fue capaz de activar la ruta en células tratadas con ARNip dirigidas a Csnkla1, Gyk, Hek1 y Ttk, sugiriendo que probablemente estos genes actúan aguas arriba de o en paralelo de Smo (Figuras 7A y 7D). Por el contrario, la sobreexpresión de SMOM2 no fue capaz o sólo pudo activar parcialmente la ruta en células tratadas con ARNip dirigidas a CDC2L1, Plk1, Prkarla, Prkra y Ttbk2, sugiriendo que probablemente estos genes actúan aguas abajo de Smo (Figuras 7A y 7B).

La sobreexpresión de Gli1 es también suficiente para activar la ruta de Hh de una manera independiente del ligando, pero actúa aguas abajo de Smo. Para colocar los aciertos con relación a Gli1, se repitió el ensayo de epistasia descrito anteriormente, pero se sustituyó SMOM2 humano por GLI1. Ninguno de los ARNip fue capaz de reducir la activación de la ruta de Hh de GLI1, indicando que Gli1 actúa probablemente aguas abajo de los 4 aciertos (Figuras 7B y 7D).

Contrariamente a Gli1, Gli3 actúa casi mayoritariamente como un represor de la ruta de Hh, y las células informadoras tratadas con ARNip de Gli3 muestran una mayor actividad de luciferasa para Hh de una manera independiente del ligando (Figura 5A). Para colocar los candidatos con relación a Gli3, se transfectaron células con ARNip dirigidos a Gli3 y cada uno de los genes candidatos. En comparación con las células del control, las células tratadas con ARNip de Gli3 muestran un incremento de cinco veces en la activación de Hh, según se mide en el ensayo de luciferasa para Hh. Las células tratadas tanto con ARNip de Gli3 como de Smo también activan la ruta similar a Gli3, consistente con Smo que actúa aguas arriba de Gli3 (Figura 7C). Cuando Gli3 se combinó con cada uno de los ARNip que corresponden a los 9 aciertos, no se observó reducción en la activación, dependiente de Gli3, de la ruta de Hh (Figura 7C). De este modo, parece que los nueve candidatos actúan aguas arriba de Gli3 (Figura 7D). En la Figura 7D se muestra un sumario de dónde actúan los aciertos en la ruta de Hh.

En los últimos pocos años, se ha demostrado que el transporte intraflagelar (IFT) en los cilios es crítico para la señalización de Hh. Huangfu et al., (2003), *más arriba*; Huangfu et al., (2005), *más arriba*; May et al. *más arriba*, Corbit et al., *más arriba*, Haycraft et al., *más arriba*. Nek1 pertenece a la familia NIMA de cinasas y, en *Tetrahymena* y *Chlamydomonas*, cinasas relacionadas con NIMA que son necesarias para la función ciliar. Mahjoub et al., *Mol. Biol. Cell* 15: 5172 (2004), Wloga et al., *Mol. Biol. Cell* 17: 2799 (2006). NEK1 humana se ha visto implicada en la enfermedad renal policística (PKD), un síndrome que se piensa que surge de defectos ciliares dentro del riñón. Upadhyay et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 217 (2000). Nek1 también se ha localizado en el centrosoma [Mahjoub et al., *J Am. Soc. Nephrol.* 16: 3485 (2005)], y se ha demostrado que interacciona con la proteína motora anterógrada de IFT, Kif3a [Surpili et al., *Biochemistry* 42: 15369 (2003)]. Debido a que se aisló Nek1 en el cribado de ARNi, nos preguntamos si puede tener un papel principal en el transporte y/o estructura de los cilios. Para resolver esta cuestión, se manipularon células IMCD3 murinas, que se ha demostrado que forman cilios *in vitro*, para que

expresen de forma estable ARNi de horquilla pequeño (ARNhp) frente a Nek1. En contraste con las células de control, en las que alrededor de 40% de las células están ciliadas, las células IMCD3 que expresan ARNhp de Nek1 muestran una drástica reducción en la formación de cilios, estando ciliadas sólo alrededor de 1% de las células. Figuras 7E y 8B. De este modo, se propone que Nek1 de mamífero impacta sobre la señalización de Hh a través de su papel en la ciliogénesis.

Según nuestro conocimiento, éste es el primer cribado de ARNi que intenta correlacionar fenotipo con desactivación de transcrito de todos los candidatos primarios aislados de un cribado de ARNi. Dado el número reciente de publicaciones que plantean inquietud sobre las tasas elevadas de falsos positivos en cribados de ARNi [Echeverri et al., Nat. Methods 3: 777 (2006), Ma et al., Nature 443: 359 (2006)], sentimos que esta etapa de validación fue necesaria y probablemente eliminó la mayoría de los falsos positivos. Sorprendentemente, la identificación de dos ARNip independientes, que se han sugerido como un estándar para cribados de ARNi, todavía produjo un gran número de falsos positivos. En nuestra experiencia, la identificación de 3 o más ARNip independientes produjo un mayor porcentaje de aciertos validados, y se debería usar como el criterio para seleccionar aciertos para estudios de seguimiento. Sin embargo, no se puede concluir que una falta de correlación entre el fenotipo y la desactivación de ARNm para un acierto de gen dado se debe de considerar siempre falso positivo. A partir de los 9 aciertos validados en nuestro cribado, CDC2L1, Csnkla1 y Prkarla están conservadas en moscas. Se piensa que Prkarla regula negativamente Pka, un inhibidor conocido de la señalización de Hh en moscas y vertebrados. Chen et al., (1998) *más arriba*, Price et al., (1999), *más arriba*; Wang et al., Genes Dev. 13: 2838 (1999); Huang et al., J. Biol. Chem 277: 19889 (2002). Los experimentos de epistasia colocaron a Prkarla aguas abajo de Smo, consistente con un papel para Prkar1a y Pka en la fosforilación y regulación de proteínas Gli en ausencia de señalización de Hh. Nuestro cribado también identificó que Csnk1a1 (CK1 α) tiene un papel positivo en la señalización de Hh. En moscas, se ha demostrado previamente también que Csnk1a1 desempeña tanto un papel regulador negativo a través de la fosforilación de Ci (el homólogo de la mosca de Gli) en ausencia de Hh [Price et al., 2002, *más arriba*; Jia et al., Dev Cell. 9: 819 (2005); Lum et al., Science 299: 2039 (2003)], y un papel positivo en presencia de la señalización de Hh a través de la fosforilación de Smo. Jia et al., Nature 432: 1045 (2004); Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 17900 (2004); Apionishev et al., Nat. Cell Biol. 7: 86 (2005). La identificación de Csnk1a1 en nuestro cribado de ARNip sugiere que Csnk1a1 también puede desempeñar un papel positivo en la señalización de Hh de mamíferos. Puesto que Smo de mamífero carece de cualquier sitio de fosforilación de Csnk1a putativos, probablemente Csnk1a1 actúa en otros componentes necesarios para la activación de Hh. En apoyo de un papel positivo para Csnk1a1 en la señalización de Hh de mamífero, los experimentos de epistasia colocaron a Csnk1a1 aguas arriba de, o al mismo nivel que, Smo. Finalmente, CDC2L1 es el ortólogo de Drosophila de Pitsre, aislado recientemente en un cribado de ARNi de todo el genoma para identificar reguladores de Hh en moscas. Nybakken et al., Nat. Genet. 37: 1323 (2005). Debido a que se aisló el homólogo de mamífero de Pitsre (Cdc2L1), probablemente esta proteína desempeña un papel conservado aunque desconocido en la señalización de Hh.

Nuestro cribado también aisló 6 cinasas potencialmente nuevas en la ruta de Hh, incluyendo Gyk1, Nek1, Plk1, Prkra, Ttbk2 y Ttk. De forma interesante, un número de ellas, incluyendo Nek1, Plk1 y Ttk, se localizan en el centrosoma, y se piensa que regulan el ciclo celular. Varios modelos pueden explicar cómo estos genes centrosómicos específicos pueden afectar a la señalización de Hh. La primera posibilidad es que ARNip frente a estos componentes centrosómicos puede impactar en la proliferación celular de la viabilidad, y por lo tanto afectar indirectamente a la señalización de Hh. Sin embargo, probablemente este no es el caso, puesto que ninguno de los aciertos de thr tuvo un efecto drástico sobre la viabilidad celular, como se juzga en los ensayos de ATP, ni tuvieron un efecto sobre el informador de luciferasa para SV40. Además, mediante análisis de FACs, las células tratadas con ARNip de Nek1 y Ttk no mostraron un defecto del ciclo celular, y las células tratadas con ARNip de Plk1 sólo mostraron un ligero defecto del ciclo celular (datos no mostrados). Además, se piensa que estos reguladores del ciclo celular son necesarios para la mitosis pero, puesto que los ensayos se realizaron usando células a una confluencia del 80%, en los que la mayoría de las células estaban en detención G1, el gen que funciona sólo en la mitosis no se habría aislado en el cribado. Para apoyar esto, no se aisló el basto número de reguladores del ciclo celular presentes en nuestra librería.

Otra posibilidad puede ser que estos genes centrosómicos específicos afecten a una función distinta del centrosoma, tal como la formación de cilios. De hecho, tal como es el caso para Nek1, es posible que Plk1 y Ttk también tengan un papel específico en la ciliogénesis. De forma interesante, Plk1 se ha relacionado con la ciliogénesis a través de su interacción con Cenexina (Odf2), puesto que se ha demostrado recientemente que la Cenexina es necesaria para dirigir Plk1 a los centrosomas. Soung et al., Mol. Cell Biol. 26: 8316-8335 (2006). Además, el análisis de ratones que carecen de Cenexina muestra que la Cenexina es indispensable para la generación de cilios primarios, pero no para otras funciones centriolares relacionadas con el ciclo celular. Ishikawa et al., Nat. Cell Biol. 7: 517 (2005). De este modo, la Cenexina puede ejercer su efecto sobre la formación de cilios vía la interacción con Plk1, y puede existir un papel específico para Plk1 en la formación de cilios, que es distinto de su papel en la regulación de la mitosis.

Una tercera posibilidad es que estas cinasas fosforilen directamente componentes de la ruta de Hh. De hecho, el análisis de secuencia de Smo, Sufu, y Gli-2, -2 y -3 identifica múltiples sitios de fosforilación candidatos con notables consecuencias para Plk1, sugiriendo que al menos esta cinasa puede estar fosforilando directamente componentes

de Hh.

Basándose en el análisis de nuestros aciertos validados, hemos supuesto esa función identificada más abajo para la hedgehog cinasa identificada en nuestro cribado:

Gen	Función
Cdc211 *	Ciclo celular
Csnkla1 de la invención	Señalización
Gyk de la invención	Osmolaridad
Nek1 *	Cilios
Plk1 *	Ciclo celular
Prkarla *	Señalización
Prkra de la invención	Silenciamiento de ARNi
Ttbk2*	Unión de microtúbulos
Ttk *	Ciclo celular
* para comparación	

5 EJEMPLO 2: Análisis de micromatriz para detectar aumento de polipéptidos de hedgehog cinasa en cáncer o tumores

Las micromatrices de ácido nucleico, que contienen a menudo miles de secuencias génicas, son útiles para identificar genes expresados diferencialmente en tejidos enfermos en comparación con sus contrapartes normales. Usando micromatrices de ácido nucleico, se transcriben de forma inversa y se marcan muestras de ARNm de ensayo y de control, procedentes de muestras de tejido de ensayo y de control, para generar sondas de ADNc. Las sondas de ADNc se hibridan entonces a una matriz de ácidos nucleicos inmovilizados sobre un soporte sólido. La matriz se configura de manera que la secuencia y la posición de cada miembro de la matriz son conocidas. Por ejemplo, se puede disponer sobre un soporte sólido una selección de genes que se sabe que son expresados en ciertos estados mórbidos. La hibridación de una sonda marcada con un miembro de matriz particular indica que la muestra de la que deriva la sonda expresa ese gen. Si la señal de hibridación de una sonda procedente de una muestra de ensayo (tejido enfermo) es mayor que la señal de hibridación de una sonda procedente de una muestra de control (tejido normal), el gen o genes sobreexpresados en el tejido enfermo son identificados. La implicación de este resultado es que una proteína sobreexpresada en un tejido enfermo es útil no sólo como un marcador de diagnóstico para determinar la presencia de la condición mórbida, sino también como una diana terapéutica para el tratamiento de la condición mórbida.

La metodología de hibridación de ácidos nucleicos y la tecnología de micromatrices son bien conocidas en la técnica. En el presente ejemplo, la preparación específica de ácidos nucleicos para la hibridación, y las sondas, portaobjetos, y condiciones de hibridación, se detallan todos ellos en la Solicitud de Patente PCT Serie nº PCT/US01/10482, presentada el 30 de marzo de 2001.

25 EJEMPLO 3: Análisis cuantitativo de la expresión de ARNm de hedgehog cinasa

En este ensayo, se usó un ensayo de nucleasa 5' (por ejemplo, TaqMan®) y una PCR cuantitativa en tiempo real (por ejemplo, ABI Prizm 7700 Sequence Detection System® (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA)), para encontrar genes que están sobreexpresados significativamente en un tumor o tumores de glioma canceroso, en comparación con otros tumores cancerosos o tejido no canceroso normal. La reacción del ensayo de nucleasa de 5' es una técnica fluorescente a base de PCR, que hace uso de la actividad de exonucleasa de 5' de la enzima de Taq ADN polimerasa para monitorizar la expresión génica en tiempo real. Se usan dos cebadores oligonucleotídicos (cuyas secuencias se basan en la secuencia génica o EST de interés) para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Un tercer oligonucleótido, o sonda, se diseña para detectar la secuencia nucleotídica localizada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no es extensible mediante la enzima de Taq ADN polimerasa, y está marcada con un colorante fluorescente informador y un colorante fluorescente extintor. Cualquier emisión inducida por láser desde el colorante informador es extinguida por el colorante extintor cuando los dos colorantes están localizados próximos entre sí como lo están en la sonda. Durante la reacción de amplificación de PCR, la enzima de Taq ADN polimerasa escinde la sonda de una manera dependiente del molde. Los fragmentos de sonda

resultantes se disocian en la disolución, y la señal del colorante informador liberado está libre del efecto extintor del segundo fluoróforo. Se libera una molécula del colorante informador por cada nueva molécula sintetizada, y la detección del colorante informador no extinguido proporciona la base para la interpretación cuantitativa y cuantitativa de los datos. Este ensayo es bien conocido, y se usa habitualmente en la técnica para identificar cuantitativamente diferencias de expresión génica entre dos muestras de tejido humano diferentes; véanse, *por ejemplo*, Higuchi et al., *Biotechnology* 10:413-417 (1992); Livak et al., *PCR Methods Appl.*, 4:357-362 (1995); Heid et al., *Genome Res.* 6:986-994 (1996); Pennica et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (25):14717-14722 (1998); Pitti et al., *Nature* 396 (6712):699-703 (1998) y Bieche et al., *Int. J. Cancer* 78:661-666 (1998).

El procedimiento de nucleasa de 5' se realiza en un dispositivo de PCR cuantitativa en tiempo real, tal como el ABI Prism 7700TM Sequence Detection. El sistema consiste en un termociclador, un láser, una cámara de dispositivo acoplado a carga (CCD), y un ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por el láser es recogida en tiempo real a través de cables de fibra óptica para todos los 96 pocillos, y se detecta en el CCD. El sistema incluye software para poner en marcha el instrumento y para analizar los datos.

El material de partida para el cribado es ARNm, aislado de una variedad de diferentes tejidos cancerosos. El ARNm se cuantifica de forma precisa, por ejemplo fluorométricamente. Como control negativo, se aísla ARN de diversos tejidos normales del mismo tipo de tejido que los tejidos cancerosos ensayados. Frecuentemente, las muestras tumorales se comparan directamente con muestras normales "emparejadas" del mismo tipo tisular, queriendo decir que las muestras de tumor y normal se obtienen del mismo individuo.

Los datos del ensayo de nucleasa de 5' se expresan inicialmente como Ct, o el ciclo umbral. Este se define como el ciclo en el que la señal del informador se acumula por encima del nivel de fondo de la fluorescencia. Los valores ΔCt se usan como una medida cuantitativa del número relativo de copias de partida de una secuencia diana particular en una muestra de ácido nucleico cuando se comparan los resultados de ARNm de cáncer con resultados de ARNm humano normal. Puesto que una unidad de Ct corresponde a un ciclo de PCR o aproximadamente un incremento relativo de 2 veces con relación al normal, dos unidades corresponden a un incremento relativo de 4 veces, 3 unidades corresponden a un incremento relativo de 8 veces, etc., se puede medir cuantitativa y cuantitativamente el número de veces de incremento relativo en la expresión de ARNm entre dos o más tejidos diferentes. A este respecto, está bien aceptado en la técnica que este ensayo es suficientemente sensible de forma técnica para detectar reproduciblemente un incremento de al menos 2 veces en la expresión de ARNm en una muestra de tumor humano, con relación a un control normal.

EJEMPLO 4: Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* es una técnica poderosa y versátil para la detección y localización de secuencias de ácidos nucleicos en preparaciones celulares o tisulares. Puede ser útil, por ejemplo, para identificar sitios de expresión génica, analizar la distribución tisular de la transcripción, identificar y localizar infección vírica, seguir cambios en la síntesis de ARNm específica, y ayudar en el cartografiado cromosómico.

La hibridación *in situ* se lleva a cabo siguiendo una versión optimizada del protocolo de Lu y Gillett, *Cell Vision* 1:169-176 (1994), usando ribosondas marcadas con ^{33}P generadas mediante PCR. De forma breve, los tejidos humanos fijados en formalina y embebidos en parafina se seccionan, se desparafinan, se desproteínan en proteinasa K (20 g/ml) durante 15 minutos a 37°C, y se procesan posteriormente para la hibridación *in situ* como se describe por Lu y Gillett, *más arriba*. Una ribosonda antisentido marcada con [^{33}P] UTP se genera a partir de un producto de PCR, y se hibrida a 55°C toda la noche. Los portaobjetos se sumergen en emulsión de seguimiento nuclear Kodak NTB2, y se exponen durante 4 semanas.

Síntesis de ^{33}P -ribosonda

6,0 μl (125 mCi) de ^{33}P -UTP (Amersham BF 1002, SA<2000 Ci/mmol) se concentraron de forma centrífuga. A cada tubo que contiene ^{33}P -UTP seco, se añadieron los siguientes ingredientes:

2,0 μl de tampón de transcripción 5x

1,0 μl de DTT (100 mM)

2,0 μl de mezcla NTP (2,5 mM: 10 μl ; cada uno de 10 mM de GTP, CTP y ATP + 10 μl de H₂O)

1,0 μl de UTP (50 μM)

1,0 μl de Rnasin

1,0 μl de molde de ADN (1 μg)

1,0 µl de H₂O

1,0 µl de ARN polimerasa (para productos de PCR T3 = AS, T7 = S, habitualmente)

5 Los tubos se incubaron a 37°C durante una hora. Se añadió 1,0 µl de RQ1 DNase, seguido de incubación a 37°C durante 15 minutos. Se añadieron 90 µl de TE (10 mM de Tris pH 7,6/1 mM de EDTA pH 8,0), y la mezcla se pipeteó sobre papel DE81. La disolución que queda se cargó en una unidad de ultrafiltración Microcon-50, y se hizo girar usando un programa 10 (6 minutos). La unidad de filtración se vertió sobre un segundo tubo y se hizo girar usando un programa 2 (3 minutos). Después del giro de recuperación final, se añadieron 100 µl de TE. Se pipeteó 1 µl del producto final sobre papel DE81, y se contó en 6 ml de Biofluor II.

10 La sonda se hace correr en un gel de TBE/urea. Se añaden 1-3 µl de la sonda o 5 µl de RNA Mrk III a 3 µl de tampón de carga. Después de calentar en un bloque de calentamiento a 95°C durante tres minutos, la sonda se coloca inmediatamente en hielo. Los pocillos de gel se enjuagan, la muestra se carga, y se hace correr a 180-250 voltios durante 45 minutos. El gel se envuelve en un envoltorio saran y se expone a una película XAR con una pantalla intensificadora en un congelador a -70°C una hora toda la noche.

Hibridación de ³³P

15 A. Pretratamiento de secciones congeladas

20 Los portaobjetos se retiraron del congelador, se colocaron en bandejas de aluminio, y se descongelaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las bandejas se colocan en una incubadora a 55°C durante cinco minutos, para reducir la condensación. Los portaobjetos se fijan durante 10 minutos en paraformaldehído al 4% sobre hielo en la campana extractora, y se lavaron 0,5 x SSC durante 5 minutos, a temperatura ambiente (25 ml de 20 x SSC + 975 ml de SQ H₂O). Después de la desproteínación en 0,5 µg/ml de proteinasa K durante 10 minutos a 37°C (12,5 µl de disolución madre 10 mg/ml en 250 ml de tampón de ARNasa precalentado libre de ARNasa), las secciones se lavaron en 0,5 x SSC durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se deshidrataron en etanol al 70%, 95%, 100%, 2 minutos cada uno.

B. Pretratamiento de secciones en bebidas en parafina

25 Los portaobjetos se desparafinaron, se colocaron en SQ H₂O, y se aclararon dos veces en 2 x SSC a temperatura ambiente, durante 5 minutos cada vez. Las secciones se desproteínaron en 20 µg/ml de proteinasa K (500 µl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de ARNasa libre de ARNasa; 37°C, 15 minutos) – embrión humano, u 8 x proteinasa K (100 µl en 250 ml de tampón de ARNasa, 37°C, 30 minutos) – tejidos en formalina. El aclarado subsiguiente en 0,5 x SSC y la deshidratación se llevaron a cabo como se describe anteriormente.

30 C. Prehibridación

Los portaobjetos se colocaron en una caja de plástico forrada con tampón de Caja (4 x SSC, 50% de formamida) – papel de filtro saturado.

D. Hibridación

35 1,0 x 10⁶ cpm de sonda y 1,0 µl de ARNt (50 mg/ml de disolución madre) por portaobjetos se calentaron a 95°C durante 3 minutos. Los portaobjetos se enfriaron en hielo, y se añadieron 48 µl de tampón de hibridación por portaobjetos. Después de someter a vórtice, se añadieron 50 µl de mezcla de ³³P a 50 µl de prehibridación en el portaobjetos. Los portaobjetos se incubaron toda la noche a 55°C.

E. Lavados

40 El lavado se realizó 2 x 10 minutos con 2xSSC, EDTA a temperatura ambiente (400 ml de 20 x SSC + 16 ml de 0,25M EDTA, V_f=4L), seguido de tratamiento con ARNasa a 37°C durante 30 minutos (500 µl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón ARNasa = 20 µg/ml). Los portaobjetos se lavaron 2 x 10 minutos con 2 x SSC, EDTA a temperatura ambiente. Las condiciones de restricción de lavado pueden ser las siguientes: 2 horas a 55°C, 0,1 x SSC, EDTA (20 ml de 20 x SSC + 16 ml de EDTA, V_f=4L).

F. Oligonucleóticos

45 El análisis *in situ* se llevó a cabo en una variedad de secuencias de ADN descritas aquí. Los oligonucleótidos empleados para esos análisis se obtienen para que sean complementarios a los ácidos nucleicos (o sus complementos) como se muestra en las figuras que se acompañan.

EJEMPLO 5: Preparación de anticuerpos que se unen a hedgehog cinasa

Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales son conocidas en la técnica, y se describen, por ejemplo, en

Coding, más arriba. Los inmunógenos que se pueden emplear incluyen polipéptidos de hedgehog cinasa purificados, proteínas de fusión que contienen polipéptidos de hedgehog cinasa, y célula que expresa sobre la superficie celular los polipéptidos de hedgehog cinasa recombinantes. La selección del inmunógeno se puede hacer por un experto sin experimentación innecesaria.

- 5 Se inmunizaron ratones, tales como Balb/c, con el inmunógeno anterior emulsionado en adyuvante completo de Freund, y se les inyectó subcutánea o intraperitonealmente en una cantidad de 1-100 microgramos. Como alternativa, el inmunógeno se emulsionó en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyectó en las almohadillas plantares posteriores de los animales. Los ratones inmunizados se revacunaron entonces 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. Después, durante varias semanas, los ratones también se pueden revacunar con inyecciones de inmunización adicionales. Se pueden obtener periódicamente muestras de suero de los ratones mediante sangrado retro-orbital para las evaluaciones en ensayos de ELISA, para detectar anticuerpos anti-hedgehog cinasa.

- 15 Después de que se ha detectado un título de anticuerpos adecuado, los animales "positivos" para los anticuerpos se pueden inyectar con una inyección intravenosa final de polipéptido de hedgehog cinasa. Tres a cuatro días después, los ratones se sacrifican, y se cosechan las células del bazo. Las células del bazo se fusionan entonces (usando polietilenglicol al 35%) a una extirpe de célula de mieloma murino seleccionada, tal como P3X63AgU.1, disponible de ATCC nº CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que se pueden colocar entonces en placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina, y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma, e híbridos de células de bazo.

- 20 Las células de hibridoma se criban en un ELISA para determinar la reactividad frente a hedgehog cinasa. La determinación de células de hibridoma "positivas" que segregan los anticuerpos monoclonales deseados frente a hedgehog cinasa está dentro de la pericia en la técnica.

- 25 Las células de hibridoma positivas se pueden inyectar intraperitonealmente en ratones Balb/c singénicos para producir ascitis que contiene los anticuerpos monoclonales anti-hedgehog cinasa. Como alternativa, las células de hibridoma se pueden hacer crecer en matraces de cultivo tisular o en botellas giratorias. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en el ascitis se puede lograr usando precipitación con sulfato de amonio, seguido de cromatografía de exclusión en gel. Como alternativa, se puede emplear cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o a la proteína G.

EJEMPLO 6: Preparación de anticuerpos conjugados a toxina que se unen a hedgehog cinasa.

- 30 El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), es decir, inmunoconjugados, para el suministro local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para exterminar o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer (Payne (2003) Cancer Cell 3:207-212; Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172; US 4,975,278) permiten el suministro dirigido del resto farmacéutico a tumores, y la acumulación intracelular allí, en el que la administración sistémica de estos agentes farmacéuticos no conjugados puede dar como resultado niveles in aceptables de toxicidad para células normales así como para las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin et al., (1986) Lancet (Mar. 15, 1986) pp. 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506). De ese modo, se busca la máxima eficacia con toxicidad mínima. Los esfuerzos para diseñar y refinar ADC se han centrado en la selectividad de los anticuerpos monoclonales (mAbs) así como en las propiedades enlazantes al fármaco y de liberación del fármaco. Se ha dado a conocer que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland et al., (1986) *más arriba*). Las toxinas usadas en conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como la toxina de la difteria, toxinas vegetales tales como ricina, toxinas de pequeñas moléculas tales como geldanamicina (Mandler et al. (2000) J. of the 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 calicheamicina (Lode et al. (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342).

- 50 Las técnicas para producir conjugados de anticuerpo-fármaco enlazando toxinas a anticuerpos purificados son bien conocidas y se emplean habitualmente en la técnica. Por ejemplo, la conjugación de un anticuerpo monoclonal purificado a la toxina DM1 se puede lograr como sigue. El anticuerpo purificado se derivatiza con n-succinimidil-4-(2-piridiltio)-pentanoato, para introducir grupos ditiopiridilo. El anticuerpo (376,0 mg, 8 mg/ml) en 44,7 ml de tampón de fosfato potásico 50 mM (pH 6,5) que contiene NaCl (50 mM) y EDTA (1 mM) se trata con SPP (5,3 equivalentes molares en 2,3 ml de etanol). Después de incubar durante 90 minutos en argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra en gel a través de una columna Sephadex G25 equilibrada con 35 mM de citrato de sodio, 154 mM de NaCl y 2 mM de EDTA. Las fracciones que contienen el anticuerpo se reúnen entonces y se ensayan. El anticuerpo-SPP-Py (337,0 mg con grupos 2-tiopiridina liberables) se diluye con el tampón de citrato de sodio 35 mM

anterior, pH 6,5, hasta una concentración final de 2,5 mg/ml. Entonces se añadió DM1 (1,7 equivalentes, 16,1 moles) en 3,0 mM de dimetilacetamida (DMA, 3% v/v en la mezcla de reacción final) a la disolución de anticuerpo. La reacción se permite transcurrir a temperatura ambiente en argón durante 20 horas. La reacción se carga en una columna de filtración en gel Sephacryl S300 (5,0 cm x 90,0 cm, 1.77 L) equilibrada con 35 mM de citrato de sodio, 154 mM de NaCl, pH 6,5. El caudal es 5,0 ml/min, y se recogen 65 fracciones (20,0 ml cada uno). Las fracciones se agrupan y se ensayan, en las que el número de moléculas de fármaco DM1 enlazadas por molécula de anticuerpo (p') se determina midiendo la absorbancia a 252 nm y 280 nm.

Con fines ilustrativos, la conjugación de un anticuerpo monoclonal purificado a la toxina DM1 I también se puede lograr según lo siguiente. El anticuerpo purificado se derivatiza con (4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC, Pierce Biotechnology, Inc) para introducir el ligador de SMCC. El anticuerpo se trata a 20 mg/ml en 50 mM de fosfato potásico/50 mM de cloruro de sodio/2mM de EDTA, pH 6,5, con 7,5 equivalentes molares de SMCC (20 mM en DMSO, 6,7 mg/ml). Después de agitar durante 2 horas en argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró a través de una columna Sephadex G25 equilibrada con 50 mM de fosfato potásico/50 mM de cloruro de sodio/2 mM de EDTA, pH 6,5. Las fracciones que contienen el anticuerpo se reúnen y se ensayan. El anticuerpo-SMCC se diluye entonces con 50 mM de fosfato potásico/50 mM de cloruro de sodio/2 mM de EDTA, pH 6,5, hasta una concentración final de 10 mg/ml, y se hace reaccionar con una disolución 10 mM de DM1 (1,7 equivalentes suponiendo 5 SMCC/anticuerpo, 7,37 mg/ml) en dimetilacetamida. La reacción se agitó a temperatura ambiente en argón 16,5 horas. La mezcla de reacción de conjugación se filtró entonces a través de una columna de filtración en gel Sephadex G25 (1,5 x 4,9 cm) con 1 x PBS a pH 6,5. Entonces se mide la relación DM1/anticuerpo (p) mediante la absorbancia a 252 nm y a 280 nm.

Los fármacos citotóxicos se han conjugado típicamente a anticuerpos a través de los numerosos restos de lisina del anticuerpo. También se ha logrado la conjugación a través de grupos tiol presentes, o manipulados en, el anticuerpo de interés. Por ejemplo, se han introducido restos de cisteína en proteínas mediante técnicas de ingeniería genética para formar sitios de fijación covalente para ligandos (Better et al. (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650; Bernhard et al. (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; Greenwood et al. (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255; Tu et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867; Kanno et al. (2000) J. of Biotechnology. 76:207-214; Chmura et al. (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484; patente U.S. nº 6.248.564). Una vez que existe un resto de cisteína libre en el anticuerpo de interés, las toxinas se pueden enlazar a ese sitio. Como ejemplo, los reactivos ligadores de fármaco, maleimidocaproil-monometil auristatina E (MMAE), es decir, MC-MAE, maleimidocaproil-monometil auristatina F (MMAF), es decir, MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE o MC-val-cit-PAB-MMAF, disueltos en DMSO, se diluyen en acetonitrilo y agua a concentración conocida, y se añaden a anticuerpo derivatizado con cisteína enfriado en disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de alrededor de una hora, se añade un exceso de maleimida para paralizar la reacción y bloquear cualesquiera grupos tiol del anticuerpo que no han reaccionado. La mezcla de reacción se concentra mediante ultracentrifugación, y el anticuerpo conjugado con la toxina se purifica y se desala mediante elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 m en condiciones estériles, y se congela para el almacenamiento.

Además, una cisteína libre en un anticuerpo de elección se puede modificar mediante el reactivo de bis-maleinido BM(PEO)4 (Pierce Chemical), dejando un grupo maleinido sin reaccionar sobre la superficie del anticuerpo. Esto se puede lograr disolviendo BM(PEO)4 en una mezcla al 50% de etanol/agua hasta una concentración de 10 mM, y añadiendo un exceso molar de diez veces a una disolución que contiene el anticuerpo en disolución salina tamponada con fosfato a una concentración de aproximadamente 1,6 mg/ml (10 micromolar), y permitiéndolo reaccionar durante 1 hora. El BM(PEO)4 en exceso se elimina mediante filtración en gel en tampón de 30 mM de citrato, pH 6 con 150 mM de NaCl. Se disuelve un exceso molar de aproximadamente vez de DM1 en dimetil acetamida (DMA), y se añade al intermedio de anticuerpo-BMPEO. La dimetilformamida (DMF) también se puede emplear para disolver el reactivo del resto farmacéutico. La mezcla de reacción se permite reaccionar toda la noche antes de la filtración en gel o diálisis en PBS para eliminar el fármaco sin reaccionar. La filtración en gel en columnas S200 en PBS se usa para eliminar agregados de peso molecular elevado, y lograr un conjugado de anticuerpo-BMPEO-DM1 purificado.

EJEMPLO 7: Ensayos de exterminio celular *in vitro*

Las células de mamífero que expresan una ruta de señalización de hedgehog activa se pueden obtener usando un vector de expresión y técnicas de clonación estándar. Como alternativa, muchas extirpes de células tumorales que expresan activamente una ruta de señalización de hedgehog están públicamente disponibles, por ejemplo mediante la ATCC, y se pueden identificar normalmente usando análisis de ELISA o FACS estándar. Entonces se pueden emplear anticuerpos monoclonales anti-polipéptidos de la ruta de hedgehog (y sus derivados conjugados con toxinas) en ensayos para determinar la capacidad del anticuerpo para exterminar la célula *in vitro* que expresa una ruta de señalización de hedgehog activa.

Con respecto específico a la presente invención, un extirpe celular derivada de PC3, que expresa de forma estable el polipéptido de hedgehog cinasa sobre su superficie celular (denominada aquí PC3-gD-MDP), se puede manipular mediante ingeniería usando técnicas estándar, y la expresión del polipéptido de hedgehog cinasa mediante las

células the PC3-gD-MDP se puede confirmar usando clasificación celular FACS, análisis de ELISA y de inmunohistoquímica estándar. La capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-hedgehog cinasa conjugado a MMAE para provocar la muerte de las células que expresan la hedgehog cinasa respectivas se puede determinar usando un ensayo de exterminio celular *in vitro* empleando el siguiente protocolo (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Mendoza et al (2002) Cancer Res. 62:5485-5488):

1. Una alícuota de 50 μ l de cultivo celular que contiene alrededor de 10^4 células (células PC3-gD-MDP o células PC3 sin transfectar, que no expresan hedgehog cinasa) en medio de crecimiento se deposita en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, de paredes opacas. Se montan pocillos de control adicionales, que contienen 50 μ l de medio de crecimiento sin células.
2. El anticuerpo conjugado con MMAE anti-hedgehog cinasa, o un anticuerpo monoclonal de control conjugado a MMAE que no se une a hedgehog cinasa, se añade a cada pocillo en un volumen de 50 μ l y diversas concentraciones que oscilan desde 0,001 a 100 μ g/ml, y las placas se incuban a 37°C y 5% CO₂ durante 2-5 días.
3. Las placas se equilibran hasta la temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.
4. Se añade un volumen del reactivo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo de Promega Corp. igual al volumen de medio de cultivo celular, y las placas se agitan durante dos minutos en un agitador orbital, para inducir la lisis celular.
5. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos, para estabilizar la señal de luminiscencia.
6. La luminiscencia se registra en un luminómetro con el programa de Tropic Winglow, y se da como RLU = unidades de luminiscencia relativas.

Los resultados obtenidos del ensayo descrito anteriormente pueden demostrar que el anticuerpo de hedgehog cinasa-MMAE es capaz de inducir la muerte de células que expresan el polipéptido de hedgehog cinasa correspondiente de una manera dependiente del anticuerpo. Esto es, ni hedgehog cinasa-MMAE ni el control conjugado a MMAE pueden inducir muerte significativa de células PC3 sin transfectar a una concentración de anticuerpo de 1 μ g/ml e inferior. A concentraciones de anticuerpo por encima de 1 μ g/ml, la cantidad de muerte de células PC3 sin transfectar puede aumentar linealmente con la concentración del anticuerpo de una manera independiente del anticuerpo. Por lo tanto, parece que la muerte de las células PC3 sin transfectar a concentraciones de anticuerpo por encima de 1 μ g/ml es un resultado no específico de los niveles crecientes de la toxina MMAE presente en la mezcla de reacción, y no es una función de la especificidad de unión del anticuerpo empleado.

Con respecto a las células PC3-gD-MDP que expresan de forma estable el polipéptido de hedgehog cinasa, sin embargo, mientras que el control conjugado con MMAE induce muerte celular con un patrón que es idéntico a la capacidad del anticuerpo para exterminar células PC3 sin transfectar, la hedgehog cinasa-MMAE inducirá un exterminio celular significativo a concentraciones de anticuerpo significativamente por debajo de este nivel (*por ejemplo*, tan bajas como 0,001 μ g/ml). De hecho, a una concentración de anticuerpo de 1 μ g/ml (a la que el anticuerpo de control conjugado con MMAE específico para cinasa no hedgehog no muestra exterminio celular significativo), virtualmente todas las células PC3-gD-MDP serán exterminadas por hedgehog-MMAE. Como tal, dichos datos demostrarán que los anticuerpos monoclonales específicos de hedgehog cinasa se unen al polipéptido de hedgehog cinasa a medida que es expresado en la superficie de las células, y es capaz de inducir la muerte de aquellas células a las que se une.

EJEMPLO 8: Ensayo de exterminio de células tumorales *in vivo*

Para ensayar la eficacia de anticuerpos monoclonales anti-polipéptido de hedgehog cinasa conjugados o no conjugados con toxina para determinar la capacidad para inducir la muerte de células tumorales *in vivo*, se puede emplear el siguiente protocolo.

Inocúlese a un grupo de ratones atímicos con 5×10^6 de las células promotoras de tumores que expresan el polipéptido de hedgehog cinasa, subcutáneamente en el flanco. Cuando los tumores alcanzan un volumen medio tumoral entre 100-200 mm³, los ratones se agrupan por igual en 5 grupos y se tratan según lo siguiente:

- Grupo 1 - vehículo de control de PBS, administrado una vez por semana durante 4 semanas;
- Grupo 2 - anticuerpo de control no específico, administrado a 1 mg/kg, una vez por semana durante 4 semanas;
- Grupo 3 - anticuerpo de control no específico, administrado a 3 mg/kg, una vez por semana durante 4 semanas;
- Grupo 4 - anticuerpo específico anti-polipéptido de hedgehog cinasa, administrado a 1 mg/kg, una vez por

semana durante 4 semanas;

Grupo 5 - anticuerpo específico anti-polipéptido de hedgehog cinasa, administrado a 3 mg/kg, una vez por semana durante 4 semanas;

5 El volumen medio tumoral se puede determinar entonces en los ratones de cada grupo de tratamiento a intervalos periódicos, y se puede determinar la eficacia de los anticuerpos.

EJEMPLO 9: Uso de hedgehog cinasa como sonda de hibridación

El siguiente método describe el uso de una secuencia nucleotídica que codifica polipéptido de hedgehog cinasa como una sonda de hibridación para, es decir, el diagnóstico de la presencia de un tumor en un mamífero.

10 También se puede emplear ADN, que comprende la secuencia codificante del polipéptido de hedgehog cinasa de longitud completa o maduro como se describe aquí, como una sonda para cribar ADN homólogos (tales como aquellos que codifican variantes de origen natural de hedgehog cinasa) en librerías de ADNc de tejidos humanos o genotecas de tejidos humanos.

15 La hibridación y lavado de los filtros que contienen cualquiera de los ADN de las librerías se lleva a cabo en las siguientes condiciones de restricción elevada. La hibridación de la sonda de hedgehog cinasa marcada radiactivamente a los filtros se lleva a cabo en una disolución de 50% de formamida, 5x SSC, 0,1% de SDS, 0,1% de pirofosfato de sodio, 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,8, 2x de disolución de Denhardt y 10% de sulfato de dextrano, a 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se lleva a cabo en una disolución acuosa de 0,1x SSC y 0,1% de SDS a 42°C.

20 Los ADN que tienen una identidad de secuencia deseada con el ADN que codifica el polipéptido de hedgehog cinasa de secuencia nativa de longitud completa se pueden identificar entonces usando técnicas estándar conocidas en la técnica.

EJEMPLO 10: Expresión de hedgehog cinasa en *E. coli*

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glucosilada de hedgehog cinasa mediante expresión recombinante en *E. coli*.

25 La secuencia de ADN que codifica las secuencias del polipéptido de hedgehog cinasa anteriores se amplifica inicialmente usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deberían contener sitios de enzimas de restricción que corresponden a los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Se puede emplear una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es pBR322 (derivado de *E. coli*; véase Bolivar et al., Gene, 2:95 (1977)), que contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina. El vector se digiere con enzima de restricción y se desfosforila. Las secuencias amplificadas mediante PCR se ligan entonces en el vector. El vector incluirá preferiblemente secuencias que codifican un gen de resistencia a antibióticos, un promotor trp, un líder polihis (que incluye los primeros seis codones STII, secuencia polihis, y sitio de escisión de enterocinasa), la región codificante de hedgehog cinasa, el terminador transcripcional lambda, y un gen argU.

35 La mezcla de ligamiento se usó entonces para transformar una cepa seleccionada de *E. coli* usando los métodos descritos en Sambrook et al., más arriba. Los transformantes se identificaron por su capacidad para crecer en placas de LB, y entonces se seleccionaron colonias resistentes a antibióticos. El ADN plasmídico se puede aislar y confirmar mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN.

40 Los clones seleccionados se pueden hacer crecer toda la noche en medio de cultivo líquido, tal como caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo nocturno se puede usar subsiguientemente para inocular un cultivo a escala más grande. Las células se hacen crecer entonces hasta una densidad óptica deseada, durante la cual se enciende el promotor de expresión.

45 Tras cultivar las células durante varias horas más, las células se pueden cosechar mediante centrifugación. El pelete celular obtenido mediante la centrifugación se puede solubilizar usando diversos agentes conocidos en la técnica, y el polipéptido de hedgehog cinasa solubilizado se puede purificar entonces usando una columna quelante de metal en condiciones que permiten la unión fuerte de la proteína.

50 Las secuencias del polipéptido de hedgehog cinasa anteriores se pueden expresar en *E. coli* en una forma etiquetada con poli-His, usando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica hedgehog cinasa se amplifica inicialmente usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios de enzimas de restricción que corresponden a los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionan la iniciación eficiente y fiable de la traducción, la purificación rápida en una columna de quelación de metal, y la eliminación proteolítica con enterocinasa. Las secuencias etiquetadas con poli-His, amplificadas mediante PCR, se ligan entonces en un vector de expresión, que se usa para transformar un hospedante de *E. coli* basada en la cepa 52 (W3110 fuhA (tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Los

transformantes se hacen crecer en primer lugar en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30°C con agitación, hasta que se alcanza una O.D.600 de 3-5. Los cultivos se diluyen entonces 50-100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato de sodio·2H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Sheffield hicasa SF en 500 ml de agua, así como 110 mM de MPOS, pH 7,3, 0,55% (p/v) de glucosa y 7 mM de MgSO₄) y se hicieron crecer durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C con agitación. Las muestras se retiraron para verificar la expresión mediante análisis de SDS-PAGE, y el cultivo en bruto se centrifugó para peletizar las células. Los peletes celulares se congelan hasta la purificación y replegamiento.

La pasta de *E. coli* de fermentaciones de 0,5 a 1 l (peletes de 6-10 g) se resuspende en 10 volúmenes (p/v) en 7 M de guanidina, 20 mM de tampón Tris, pH 8. Se añaden sulfito de sodio sólido y tetratiónato de sodio hasta obtener concentraciones finales de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y la disolución se agita toda la noche a 4°C. Esta etapa da como resultado una proteína desnaturalizada con todos los restos de cisteína bloqueados mediante sulfitolización. La disolución se centrifugó a 40.000 rpm en una ultracentrifugadora Beckman, durante 30 min. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón de columna de quelato de metal (6 M de guanidina, 20 mM de Tris, pH 7,4), y se filtró a través de filtros de 0,22 micrómetros para su aclaración. El extracto aclarado se cargó en una columna de quelato de metal Ni-NTA de Qiagen de 5 ml equilibrada en el tampón de columna de quelato de metal. La columna se lavó con tampón adicional que contiene 50 mM de imidazol (carbiochem, grado utrol), pH 7,4. La proteína se eluye con tampón que contiene 250 mM de imidazol. Las fracciones que contienen la proteína deseada se reúnen y se almacenan a 4°C. La concentración de proteína se estima mediante su absorbancia a 280 nm usando el coeficiente de extinción calculado basándose en su secuencia de aminoácidos.

Las proteínas se repliegan diluyendo lentamente la muestra en tampón de replegamiento recientemente preparado que consiste: en 20 mM de Tris, pH 8,6, 0,3 M de NaCl, 2,5 M de urea, 5 mM de cisteína, 20 mM de glicina y 1 mM de EDTA. Los volúmenes de replegamiento se escogen de manera que la concentración final de proteína está entre 50 y 100 microgramos/ml. La disolución de replegamiento se agita suavemente a 4°C durante 12-36 horas. La reacción de replegamiento se paraliza mediante adición de TFA hasta una concentración final de 0,4% (pH de aproximadamente 3). Antes de la purificación posterior de la proteína, la disolución se filtra a través de un filtro de 0,22 micrómetros, y se añade acetonitrilo hasta una concentración final de 2-10%. La proteína replegada se cromatografía en una columna de fase inversa Poros R1/H usando un tampón móvil de 0,1% de TFA con elución con un gradiente de acetonitrilo de 10 a 80%. Alícuotas de fracciones con absorbancia A280 se analizan en geles de poliacrilamida con SDS, y las fracciones que contienen proteína replegada homogénea se reúnen. Generalmente, las especies apropiadamente replegadas de la mayoría de las proteínas se eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo, puesto que esas especies son las más compactas con sus interiores hidrófobos blindados de la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas se eluyen habitualmente a concentraciones de acetonitrilo más altas. Además de resolver las formas de proteínas incorrectamente plegadas de la forma deseada, la etapa de fase inversa también elimina endotoxina de las muestras.

Las fracciones que contienen la proteína plegada deseada se reúnen, y el acetonitrilo se elimina usando una corriente suave de nitrógeno dirigida a la disolución. Las proteínas se formulan en 20 mM de Hepes, pH 6,8 con 0,14 M de cloruro de sodio y 4% de manitol mediante diálisis o mediante filtración en gel usando resinas G25 Superfine (Phannacia) equilibradas en el tampón de formulación y filtradas de forma estéril.

EJEMPLO 11: Expresión de polipéptido de hedgehog cinasa en células de mamífero

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glucosilada de polipéptido de hedgehog cinasa mediante expresión recombinante en células de mamífero.

Como vector de expresión, se emplea el vector pRK5 (véase el documento EP 307. 247, publicado el 15 de marzo de 1989). Opcionalmente, el ADN que codifica los polipéptidos de hedgehog cinasa descritos aquí se liga en pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción de tal ADN usando métodos de ligamiento tales como se describen en Sambrook *et al.*, más arriba. El vector resultante se denomina HK-DNA.

En una realización, las células prosperantes seleccionadas pueden ser células 293. Se hacen crecer células 293 humanas (ATCC CCL 1573) hasta confluencia en placas de cultivo tisular en medio tal como DMEM suplementado con suero fetal de ternera, y opcionalmente componentes nutrientes y/o antibióticos. Se mezclan alrededor de 10 µg de pRK5-HK DNA con alrededor de 1 µg de ADN que codifica el gen de VA RNA [Thimmappaya *et al.*, Cell, 31:543 (1982)], y se disuelve en 500 µl de 1 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, 0,227 M de CaCl₂. A esta mezcla se añadió, gota a gota, 500 µl de 50 mM de HEPES (pH 7,35), 280 mM de NaCl, 1,5 mM de NaPO₄, y se dejó que se formase un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspendió y se añadió a las células 293, y se dejó sedimentar durante alrededor de cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se separó por aspiración, y se añadieron 2 ml de 20% de glicerol en PBS durante 30 segundos. Las células 293 se lavaron entonces con medio libre de suero, se añadió medio reciente, y las células se incubaron durante alrededor de cinco días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se eliminó y se sustituyó por medio de cultivo (sólo) o medio de cultivo que contiene 200 µCi/ml de ³⁵S-cisteína y 200 µCi/ml de ³⁵S-metionina. Después

de una incubación de 12 horas, el medio acondicionado se recogió, se concentró en un filtro giratorio, y se cargó en gel con SDS al 15%. El gel procesado se puede secar y exponer a película durante un período seleccionado de tiempo para revelar la presencia de los polipéptidos de hedgehog cinasa. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden sufrir incubación adicional (en medio libre de suero), y el medio se ensaya en bioensayos seleccionados.

En una técnica alternativa, el ADN que codifica los polipéptidos de hedgehog cinasa se puede introducir transitoriamente en células 293 usando el método de sulfato de dextrano descrito por Sompanyrac et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). Se hicieron crecer células 293 hasta densidad máxima en un matraz de centrifugación, y se añadieron 700 µg de pRK5-HK DNA. Las células se concentraron primero a partir del matraz de centrifugación mediante centrifugación, y se lavaron con PBS. El precipitado de ADN-dextrano se incubó en el pelete celular durante 4 horas. Las células se trataron con 20% de glicerol durante 90 segundos, se lavaron con medio de cultivo tisular, y se volvieron a introducir en el matraz de centrifugación que contiene medio de cultivo tisular, 5 µg/ml de insulina bovina y 0,1 µg/ml de transferrina bovina. Después de alrededor de cuatro días, los medios acondicionados se centrifugaron y se filtraron para eliminar células y desecho. La muestra que contiene hedgehog cinasa expresada se puede concentrar entonces y purificar mediante cualquier método seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, el polipéptido de hedgehog cinasa se puede expresar en células CHO. El pRK5-HK se puede transfectar en células CHO usando reactivos conocidos tales como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Como se describe anteriormente, los cultivos celulares se pueden incubar, y el medio se puede sustituir por medio de cultivo (sólo) o medio que contiene un radiomarcador tal como ³⁵S-metionina. Después de determinar la presencia de la hedgehog cinasa, el medio de cultivo se puede sustituir por medio libre de suero. Preferiblemente, los cultivos se incuban durante alrededor de 6 días, y después se cosecha el medio acondicionado. El medio que contiene el polipéptido de hedgehog cinasa expresado se puede concentrar entonces y purificar mediante cualquier método seleccionado.

El polipéptido de hedgehog cinasa etiquetado con epitopo también se puede expresar en células hospedantes CHO. La secuencia que codifica la porción de hedgehog cinasa se puede subclonar fuera del vector pRK5. El inserto del subclon puede sufrir una PCR para fusionarse en el marco con una etiqueta epitópica seleccionada, tal como una etiqueta poli-his en un vector de expresión de baculovirus. Este inserto de hedgehog cinasa etiquetado con poli-his se puede subclonar entonces en un vector conducido por SV40 que contiene un marcador de selección, tal como DHFR, para la selección de clones estables. Finalmente, las células CHO se pueden transfectar (como se describe anteriormente) con el vector conducido por SV40. El marcaje se puede llevar a cabo, como se describe anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene la hedgehog cinasa etiquetada con poli-His expresada se puede concentrar entonces y purificar mediante cualquier método seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad de Ni²⁺-quelato.

El polipéptido de hedgehog cinasa también se puede expresar en células CHO y/o COS mediante un procedimiento de expresión transitoria, o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

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

Tras la amplificación mediante PCR, los ADN respectivos se subclonan en un vector de expresión de CHO usando técnicas estándar como se describe en Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para tener sitios de restricción compatibles 5' y 3' del ADN de interés para permitir el lanzamiento conveniente del ADNc. El vector de expresión usado en células CHO es como se describe en Lucas et al., Nucl. Acids Res. 24:9 (1774-1779 (1996), y usa el promotor temprano/potenciador de SV40 para conducir la expresión del ADNc de interés y dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido después de la transfección.

Se introducen 12 microgramos del ADN plasmídico deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO usando reactivos de transfección comercialmente disponibles SUPERFECT® (Quiagen), DOSPER® o FUGENE® (Boehringer, Mannheim). Las células se hacen crecer como se describe en Lucas *et al.*, más arriba. Se congelan aproximadamente 3 x 10⁷ células en una ampolla para el crecimiento y producción posterior como se describe más abajo.

Las ampollas que contienen el ADN plasmídico se descongelan colocándolas en un baño de agua, y se mezclan mediante vórtice. Los contenidos se pipetean en un tubo de centrifugadora que contiene 10 ml de medios, y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira, y las células se resuspenden en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado con filtro de 0,2 µm con 5% de suero fetal bovino diafiltrado con filtro 0,2 µm). Las células se dividen entonces en alícuotas en un molinillo de 100 ml que contiene 90 ml de medio selectivo. Después

de 1-2 días, las células se transfieren a un molinillo de 250 ml lleno con 150 ml de medio de crecimiento selectivo, y se incuban a 37°C. Después de otros 2-3 días, los molinillos de 250 ml, 500 ml y 2000 ml se siembran con 3×10^5 células/ml. El medio celular se intercambia con medio reciente mediante centrifugación y resuspensión en medio de producción. Aunque se puede emplear cualquier medio de CHO adecuado, actualmente se puede usar un medio de producción descrito en la patente U.S. n° 5.122.469, expedida el 16 de junio de 1992. Un molinillo de producción de 3 l se siembra a $1,2 \times 10^6$ células/ml. En el día 0, se determina el pH y el número celular. En el día 1, el molinillo se muestrea y se comienza el rociado con aire filtrado. En el día 2, el molinillo se muestrea, la temperatura se desplaza hasta 33°C, y se toman 300 ml de glucosa 500 g/l y 0,6 ml de 10% de antiespumante (por ejemplo, emulsión al 35% de polidimetilsiloxano, emulsión de grado médico Dow Corning 365). Durante la producción, el pH se ajusta según sea necesario para mantenerlo a alrededor de 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad cayó por debajo de 70%, el cultivo celular se cosecha mediante centrifugación y se filtra a través de un filtro de 0,22 μm . El filtrado se almacenó a 4°C, o se cargó inmediatamente en columnas para purificación.

Para los constructos etiquetados con poli-his, las proteínas se purifican usando una columna Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio acondicionado, hasta una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombea sobre una columna de Ni-NTA de 6 ml equilibrada en tampón de Hepes 20 mM, pH 7,4, que contiene 0,3 M de NaCl y 5 mM de imidazol a un caudal de 4-5 ml/min a 4°C. Después de cargarla, la columna se lava con tampón de equilibrado adicional, y la proteína se eluye con tampón de equilibrado que contiene 0,25 M de imidazol. La proteína altamente purificada se desala subsiguientemente en un tampón de almacenamiento que contiene 10 mM de Hepes, 0,14 M de NaCl y 4% de manitol, pH 6,8, con una columna de 25 ml G25 superfine (Pharmacia), y se almacenó a -80°C.

Los constructos (que contienen Fc) de inmunoadhesina se purifican a partir de los medios acondicionados según lo siguiente. El medio acondicionado se bombea en una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se ha equilibrado en tampón de fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Después de cargarla, la columna se lava extensamente con tampón de equilibrado antes de la elución con 100 mM de ácido cítrico, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 μl de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desala subsiguientemente en tampón de almacenamiento como se describe anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-His. La homogeneidad se evalúa mediante geles de poliacrilamida con SDS y mediante secuenciación de aminoácidos N-terminales mediante degradación de Edman.

EJEMPLO 12: Expresión de hedgehog cinasa en levadura

El siguiente método describe la expresión recombinante de polipéptido de hedgehog cinasa en levadura.

En primer lugar, se construyeron vectores de expresión de levadura para la producción o secreción intracelular de las secuencias de hedgehog cinasa anteriores a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica tales secuencias de hedgehog cinasa y el promotor se insertan en sitios de enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado, para dirigir la expresión intracelular de hedgehog cinasa. Para la secreción, el ADN que codifica tales secuencias de hedgehog cinasa se puede clonar en el plásmido seleccionado, junto con ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal de hedgehog cinasa nativo u otro péptido señal de mamífero, o, por ejemplo, una secuencia señal/líder secretora de factor alfa de levadura o invertasa, y secuencias ligadoras (si es necesario) para la expresión de hedgehog cinasa.

Las células de levadura, tales como la cepa AB110 de levadura, se pueden transformar entonces con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y se pueden cultivar en medios de fermentación seleccionados. Los sobrenanantes de levadura transformados se pueden analizar mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y separación mediante SDS-PAGE, seguido de la tinción de los geles con tinte de Azul de Coomassie.

La hedgehog cinasa recombinante se puede aislar y purificar subsiguientemente eliminando las células de levadura del medio de fermentación mediante centrifugación, y concentrando después el medio usando filtros de cartucho seleccionados. El concentrado que contiene hedgehog cinasa se puede purificar adicionalmente usando resinas de cromatografía en columna seleccionadas.

EJEMPLO 13: Expresión de hedgehog cinasa en células de insecto infectadas con baculovirus

El siguiente método describe la expresión recombinante del polipéptido de hedgehog cinasa en células de insecto infectadas con baculovirus.

La secuencia que codifica la secuencia de hedgehog cinasa anterior se fusiona en dirección 5' de una etiqueta epitópica contenida en un vector de expresión de baculovirus. Tales etiquetas epitópicas incluyen etiquetas de poli-his y etiquetas inmunoglobulínicas (como regiones Fc de IgG). Se puede emplear una variedad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de plásmidos comercialmente disponibles tales como Pvl 1393 (Novagen). De forma breve, la secuencia que codifica la secuencia de hedgehog cinasa anterior o la porción deseada de la secuencia codificante de tal, *por ejemplo* la secuencia que codifica un dominio extracelular de una proteína transmembránica o la secuencia que codifica la proteína madura si la proteína es extracelular, se amplifica mediante PCR con

cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador de 5' puede incorporar sitios de enzimas de restricción (seleccionadas) de flaqueo. El producto se digiere entonces con aquellas enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

5 El baculovirus recombinante se genera cotransfectando el plásmido anterior y ADN de virus BACULOGOLD™ (Pharming) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) usando lipofectina (comercialmente disponible de GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se cosechan y se usan para amplificaciones posteriores. La infección vírica y la expresión proteica se llevan a cabo como se describe por O'Reilley et al., *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994).

10 El polipéptido de hedgehog cinasa etiquetado con poli-his expresado se puede purificar entonces, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad de quelato de Ni²⁺ según lo siguiente. Los extractos se preparan a partir de células Sf9 infectadas con virus recombinante como se describe mediante Rupert et al., *Nature*, 362:175-179 (1993). De forma breve, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en tampón de ultrasonidos (25 ml de Hepes, pH 7,9; 12,5 mM de MgCl₂; 0,1 mM de EDTA; 10% de glicerol; 0,1% de NP-40; 0,4 M de KCl), y se sometieron a ultrasonidos dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se clarifican mediante centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en tampón de carga (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, 10% de glicerol, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 μm. Se preparó una columna de agarosa de Ni²⁺-NTA (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lavó con 25 ml de agua y se equilibró con 25 ml de tampón de carga. El extracto celular filtrado se cargó en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lavó hasta A₂₈₀ inicial con tampón de carga, en cuyo punto se comenzó la recogida de las fracciones. A continuación, la columna se lavó con un
15
20 tampón de lavado secundario (50 mM de fosfato; 300 mM de NaCl, 10% de glicerol, pH 6,0), que eluye proteína no unida específicamente. Después de alcanzar nuevamente el valor inicial de A₂₈₀, la columna se desarrolló con un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM en el tampón de lavado secundario. Se recogieron fracciones de 1 ml y se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con plata o transferencia Western con Ni²⁺-NAT conjugado a fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen el polipéptido de hedgehog cinasa eluido etiquetado con His₁₀ se reunieron y se dializaron frente a tampón de carga.

25 Como alternativa, la purificación del polipéptido de hedgehog cinasa etiquetado con IgG (o etiquetado con Fc) se puede llevar a cabo usando técnicas de cromatografía, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna de Proteína A o proteína G.

EJEMPLO 14: Purificación de polipéptido de hedgehog cinasa usando anticuerpos específicos.

30 Los polipéptidos de hedgehog cinasa nativos o recombinantes se pueden purificar mediante una variedad de técnicas estándar en la técnica de purificación de proteínas. Por ejemplo, las variantes pro-, maduras o prepolipeptídicas de las secuencias de hedgehog cinasa anteriores se purifican mediante cromatografía de inmutofinidad usando anticuerpos específicos para tales secuencias. En general, una columna de inmutofinidad se construye acoplando covalentemente el anticuerpo anti-hedgehog cinasa a una resina cromatográfica activada.

35 Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de sueros inmunitarios mediante precipitación con sulfato de amonio o mediante purificación en Proteína A inmovilizada Phannacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Igualmente, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de líquido ascítico de ratón mediante precipitación con sulfato de amonio o cromatografía en Proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se une covalentemente a una resina cromatográfica tal como SEPHAROSE™ activada con CnBr (Phannacia LKB
40 Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea, y la resina derivada se lava según las instrucciones del fabricante.

45 Tal columna de afinidad se utiliza en la purificación de las secuencias de hedgehog cinasa anteriores preparando una fracción de células que contienen tales secuencias en forma soluble. Esta preparación se deriva mediante solubilización de la célula completa o de una fracción subcelular obtenida vía centrifugación diferencial mediante adición de detergente o mediante otros métodos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, el polipéptido de hedgehog cinasa soluble que contiene una secuencia señal se puede segregar en cantidad útil en el medio en el que se hacen crecer las células.

50 Una preparación que contiene polipéptido de hedgehog cinasa soluble se hace pasar a lo largo de la columna de inmutofinidad, y la columna se lava en condiciones que permitan la adsorbancia preferencial de tales secuencias (*por ejemplo*, tampones de fuerza iónica elevada en presencia de detergente). Después, la columna se eluye en condiciones que interrumpen la unión entre el anticuerpo/sustrato (*por ejemplo*, un tampón de pH bajo tal como aproximadamente pH 2-3, o una concentración elevada de caótropro, tal como urea o ión tiocianato), y se recoge el polipéptido de hedgehog cinasa, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un antagonista de hedgehog cinasa CSNK1A1, GYK o PRKRA para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir un trastorno proliferativo celular, un tumor en un mamífero y/o cáncer, en el que el antagonista de hedgehog cinasa CSNK1A1, GYK o PRKRA es una molécula de ARNi.
- 5 2. El uso de la reivindicación 1, en el que antagonista de hedgehog cinasa es el antagonista de hedgehog cinasa GYK.
3. El uso de la reivindicación 2, en el que antagonista de hedgehog cinasa es el antagonista de hedgehog cinasa PRKRA.
- 10 4. El uso de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de CSNK1A1, GYK o PRKRA, que es inhibido por el antagonista de CSNK1A1, GYK o PRKRA, respectivamente, comprende la secuencia de la Figura 1B, 1C o 1G, respectivamente.
5. El uso de la reivindicación 1, en el que el antagonista de hedgehog cinasa CSNK1A1, GYK o PRKRA, se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento o a un agente citotóxico.
- 15 6. Un método *in vitro* para diagnosticar la presencia de un trastorno proliferativo celular, que comprende comparar el nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido de hedgehog cinasa CSNK1A1, GYK o PRKRA: (a) en una muestra de ensayo de tejido o células obtenida de dicho mamífero, y (b) en una muestra de control de tejido o células no cancerosas normales del mismo origen o tipo tisular; en el que un mayor nivel de expresión del polipéptido de CSNK1A1, GYK o PRKRA en la muestra de ensayo, en comparación con la muestra de control, es indicativo de la presencia de un trastorno proliferativo celular en el mamífero del que se obtiene la muestra de ensayo.
- 20 7. Un método *in vitro* para modular la proliferación, diferenciación o supervivencia de células madre no comprometidas en cultivo, que comprende poner en contacto tales células con una cantidad efectiva de un antagonista de hedgehog cinasa CSNK1A1, GYK o PRKRA.
- 25 8. El uso de la reivindicación 5, en el que el agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en: un maitansinoide, una calecheamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica.

Proteína CDC2L1 de ratón:

MGDEKDSWKVKTLD E ILQEKRRRKEQEKA E IKRLKNSDDRDSKRDSLEEGELRDHRMEITIRN
SPYRREDSMEDRGEEDSLAIKPPQQMSRKEKAHHRKDEKRKEKRRHRSHSAEGGKHARVKEKE
REHERRKRHREEQDKARREWERQKRREMARHSRRERDRLEQLERKRERERKLEQQKEQREQK
ERERRAEERRKEREAREVSAAHRTMREEYS DKGKVGHWRSRSPLRPPRERFEMGDNRKPVKEEK
VEERDLLSDLQDISDSERKTSSAESSAESGSGSEEEEEEEEEEEEEEGSTSESEEEEEEEEE
EEEEETGSNSEEASEQSAEEVSDEEMSEDEDRENENHILVVPESRFDRDSGDSEEGEEVGEET
POSSAPTEGDYVPDSPALSPIELKQELPKYLPALQGCRSVEEFQCLNRIIEGTYGVVYRAKDKK
TDEIVALKRLKMEKEKEGFPITSLREINTILKAQHPNIVTVREIVVGSNMDKIYIVMNYVEHDL
KSLMETMKQPFPLPGEVKTLMIQLLSGVKHLHDNWLHRDLKTSNLLLSHAGILKVGDFGLAREY
GSPLKAYTPVVVTLWYRAPELLLGAKKEYSTAVDMWVSGC IFGELLTQKPLFPKSDIDQINKIF
KDLGTPSEKIWPGYNDLPAVKKMTFSEYPYNLKRKRFGALLSDQGFDMNKFLTYYPGRRINAE
DGLKHEYFRETPLPIDPSMFPTWPAKSEQQRVKRGTSPRPPEGGLGYSQLGDDDLKETGFHLTT
TNQGASAAGPGFSLKF

FIG. 1A

Proteína CSNK1a1 de ratón:

MASSSGSKAEFIVGGKYKLVRKIGSGSFGDIYLAINITNGEEVAVKLESQKARHPQLLYESKLY
KILQGGVGIPIHRWYGQEKDYNVIVMDLLGPSLEDLNFCSRRFTMKTVMMLADQMSRIEYVH
TKNFIHRDIKPDNFMGIGRHCNKLFIDFGLAKKYRDNRTROHIPYREDKNLTGTARYASINA
HLGIEQSRDDMESLGYVLMYFNRTSLPWQGLKAATKQKYEKISEKKMSTPVEVLCKGFPAEF
AMVLYNYCRGLRFEEAPDYMYLRQLFRILFRFTLNHQVDYTFDWTMLKQKAAQQAASSSGQQAQTPTGF

FIG. 1B

Proteína GYK de ratón:

MAAAKAVLGPLVGAVDQGTSSSTRFLVFN SKTAELLSSHQVEIKQEFPREGWVEQDPKEILOSV
YECIEKTCEKLGQLNIDISNIKAIGVSNQRETTVVWDKVTGEPLYNAVVWLDLRTOSTVENLSK
RIPGNNFVKSKTGLPLSTYFSAVKLRWLLDNVKKVQEA VEENRALFGTIDSWLIWSLTGGIHG
GVHCTDVTNASRTMLFNIHSLEWDKELCEFFGIPMEILPNVRSSEIYGLMKAGALEGVPI SGC
LGDQSAALVGMCFQDQAKNTYGTGCFLLCNTGHKCVFSEHGLLTTVAYKLGRDKPVVYALEG
SVAIAGAVIRWLRDNLGIKSSEEIEKLAKEVGTSYGCFVPAFSGLYAPYWEPSARGIICGLT
QFTNKCHIAFAALEAVCFQTREILDAMNRDCGIPLSHLQVDGGMTSNKILMQLQADILYIPVVK
PSMPETTALGAAMAAGAAEGVGVSLEPEDLSAVTMERFEPQINAESEIRYSTWKKAVMKSIG
WVTTQSPESGIP

FIG. 1C

Proteína NEK1 de ratón:

MEKYVRLQKIGEGSFGKAVLVKSTEDGRHYVIKEINISRMSDKERQESRREVAVLANMKHPNIV
 QYKESFEENGSLYIVMDYCEGGDLFKRINAQKGFQEDQILDWVQICLALKHVHDKILHRD
 IKSQNIPLTKDGTVQLGDFGIARVLNSTVELARTCIGTPYYLSPEICENKPYNNKSDIWAIGCV
 LYELCTLKHAFEAGNMKNLVLKIISGSFPPVSPHYSYDLRSLLSQLFKRNPRDRPSVNSILEKG
 FIAKRIEKFLSPQLIAEEFCLKTLSKFGPQPLPGKRPASGQGVSSFPVPAQKITKPAAKYGVPLT
 YKKGDKKLEKKPPPKHKQAHQIPVKKMNSGEERKKMSEEAACKRRLEFIEKEKKQKQDQIRFL
 KAEQMKRQEKQRLERINRAREQGWRNVLRAGGSSEVKASFFGIGGAVSPSPCSPRGQYEHYHAI
 FDMQRLRAEDNEARWKGGIYGRWLPERQKGLAVERANQVEEFQORKREAMQNKARAEHVGL
 LQNLASLYGGRPSSSRGGKPRNNEEVYLARLQIRLQNFNERQIKAKLRGENKEADGKQGE
 ATEETDMRLKKMESLKAQTNARA AVLKEQLERKRKEAYEREKKVWEEHLVARVKSSDVPLPLEL
 LETGGSPSKQOVKPVISVTSALKEVGLDGLTDTQEEEMEKNSAISSKREILRRLNENLKAQE
 DEKEKQHHSGCETVGHKDEREYETENAISSDRKKWEMGGQLVIPLDAVTLDTSPSATEKHTVG
 EVIKLDSNGSPRKVWGNPTDSVLKILGEAELQLOTELLENTSFKSEVYAEENYKPLLTEEN
 LQCISKEINPSATVDSTETKSPKFTVEVSPQMSSEGNVEEPDDLETEVLQEPSSTHTDGLPPVLN
 DVWTRKEAAKETELEDKVAVQQSEVCEDRIPGNVDQSCKDQRDPAVDDSPQSGCDVEKSVQPE
 SIFQKVHSHKDLNLVQAVHCSPPEPIPIRSHSDSPPKTKSKNSLLIGLSTGLFDANNPKMLRTC
 SLPDL SKLFR TLM DVPTVGDVHQSLEIDELEDEPIKEGPSDESDTVFEETD TDLQELQASMEQ
 LLREQPGDEYSEEEESVLKSSDVEQTARGTDAPDEEDNPSSESALNEEWHSDNSDAETTSECEY
 DSVFNHLEELRLHLEQEMGFEEKFEVYEVKVAIHEDEDENIEICSTIVENILGNEHQHLYAKIL
 HLVMADGAYQEDNDE

FIG. 1D

Proteína PLK1 de ratón:

MNAVAKAGKLARAPTDLGKGGVLGDAAPSAPVAAPLAKEILEVLVDPRSRROYIRGRFLGKGGF
 AKCFEISDADTKEVFAGKIVPKSLLLKPHQKEKMSMEISIHRS LAHQHVVGPHDFFEDSDVFV
 VLELCRRRSLELHKRRKALTEPEARYYLRLQIVLGCQYLHRNQVIHRDLKLG NLFNEDLEVKI
 GDFGLATKVEYEGERKKTLCTPNYIAPVLSKKGHSFEVDVWSIGCIMYTLVVGKPPFETSCL
 KETYLRIKKNEYSIPKHINPVAASLIQKMLQDPTARPTIHELLNDEFFTSGYIPARLPITCLT
 IPRFSIAPSSLDPSSRKPLKVLNKGVENPLPDRPREKEEPVVRETNEAIECHLSDLLQQLTSV
 NASKPSEGLVRQEEAEDPACIPIFWVSKWVDYSDKYGLGYQLCDNSVGVLFNDSTRILLYNDG
 DSLQYIERDGTESYLTVSSHNSLMKKITLLNYFRNYMSEHLLKAGR NITPREGDELARLPYLR
 TWFRTSAIILHLSNGTVQINFFQDHTKILCPLMAAVTYINEKRDFQTYRLSLL EYGCCKEL
 ASRLRYARTMVDKILSSRSASNRLKAS

FIG. 1E

Proteína PRKAR1A de ratón:

MASGSMATSEEERSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTTRPERPMAFLREYFERLEKEEARQ
 IQCLQKTGIRTDSDREDEISPPPPNPVVKGRRRRGAI SAEVYTEEDAASYVRKVIPKDYKTMAAL
 AKAIEKNVLFSHLDDNERSDIFDAMFPVSFIAGETVIQQGDEGDNFYVIDOGEMDVYVNNNEWAT
 SVGEGGSFGEALAIYGTTPRAATVKAKTNVKLWGLDRDSYRRILMGSTLRKRKMYEEFVLSKVSIL
 ESLDKWERLTVADALEPVQFEDGQKIVVQGEFGDEFIILEGTA AVLQRRSENEEFVEVGR LGP
 SDYFGEIALLMNRPRAAATVVARGPLKCVKLD RPRFRFVRLGPCSDILKRN IQQYNSFVLSV

FIG. 1F

Proteína PRKRA de ratón:

MSHSRHRRAEAPPLQREDSGTFSLGKMITAKPGKTP IQVLHEYGMKTKNIPVYECERSDVQVHVP
 TFFTRVTVGDITCTGEGTSKKLAKHRAEAAAINILKANASICFAVPDPLMPDPSKQPKNQLNPI
 GSLQELAIHHGWRLPEYTLSEQEGGPAHKREYTTICRLESFMETGKGASKKQAKRNAAEKFLAKF
 SNISPENHISLTVVGHSLGCTWHSLRNSPGEKINLLKRSLLSLPNTDYIQLLSEIASEQGFNI
 TYLDIEELSANGQYQCLAELSTSPITVCHGSGISCGNAQSDAAHNALQYLKIIAERK

FIG. 1G

Proteína TTBK2 de ratón:

MGLANRRHRLGTCSPISTRGGENCKTGKIKCLLKETHSWLRREIGNRLNGIHPWELDACVAVLP
 HQGFAMSGGGEQPDILSVGILVKERWKVLRKIGGGGFGEIYDALDMLTRENVALKVESAQQPKQ
 VLKMEVAVLKKLQKDHVCRFIGCGRNDRFNVVMQLOGRNLADLRRSQSRGTFTTISTTLRLGK
 QILESIESIHSVGFHRDIKPSNFAMGRFPSTCRKCFMLDFGLARQFTNSCGDVRPPRAVAGFR
 GTVRYASINAHNRNEMGRHDDLWSLFYMLVEFVVQQLPWRKIKDKEQVGSIKERYDHRMLMKHL
 PPEFSTFLDHISSLDYFTKPDYQLLTSVFDNSIKTFGVIESDPFDWEKSGTDGSLTTTTTSATP
 QLHTRLTPAAIGIANATPIPGDLLRENTDEVFPDEQLSDGENGIPVGVSPDKLPGSLGHPRPQE
 KDVWEEMDINKNKIKLGICKAATEEENSHGQVNGIILNAPSLGSPIRVRSEITQPDRDVPVLRKL
 RSIHSFELEKRLTLEPKPDTDKFLETCEMKMQKDSAGKEPVPALPHKPCVPVVTHTDHIWHY
 DDEYLPDASKPASANTPEQADGGGSGNGFIAVNLSSCKQEVDSKEWVIVDKEQDLQDFRTNEVLG
 HKTTGSPSDEEPEVLQVLEGGSPQDEKIQVGPWTDNHHLLKESGVLALSACEPATAASELYTD
 RDLQAGAASQFITVTPSPMEAQAEGPLTAITIPRPSVASTQSTSGSFHYGPQPEKKDLQPLE
 PTVELYSPRENFSGLVVTEGELASGGSRVDLGLQIDHTGHDMLPNMRDGDTSQDLGPKDPDPHN
 RLAVKEFEHLPGETEERSLLLGSENERLSKGQHCIEVSSPGELVTAERAQLAATEPLHVSET
 QNCSVLPNQDKTHEIMKLLAVGTSEISQAIIDPHAEGQIQMAAMQKNKLFKDDGIQSESLPRQ
 QGDLAFLHQEGKREKVVPRNGELYHCVSENEHGPEPTRKDMLRSSFVTRHSRIPVLAQEI DSTF
 ESSSAISAKEKLLQKKAYQPEIVKLLVEKRFKSFGLDLSSASDKLIEEKLAAVPVVFFSEEVF
 APFSRLAADSHLSRVEDSFLSPIISQARKSKI PRPVSWSVTDQINGSASPOFLPRPPPQPKPPV
 RPGVEARLRRYKVLGSSNSDSDLFSRLAQILQNGSQKSRSTTQCKSPGSPHNPKTPPKSPVVR
 RSPSASPRSSSLPRTSSSSPSRAGRPHHDQRSSSPHLGRSKSPSPSHSGSSSSRRSCQOEHCKPS
 KNGPKGSGSLHHHSTSSKTPPGKSKPASKLSR

FIG. 1H

Proteína TTK de ratón:

MEAEELIGSSVTIDSIMSKMRDIKKNINEDCTDELSLSKICADHTETVNQIMRVGNTPENWLNLF
 LLKLEKNSSPLNDDLKLIGRYSQAEVLPDPKYQONESFARIQVRLAELKAIQEPDDARDYF
 QMARENCKKFAFVHVSFAQFELSQGNLKKSEQLLHKAVETGAVPLQMLETAMRNLHLQKKQLLP
 EEDKKSVSASTVLSAQEPFSSSLGNVQNRISCESRGQAGAARVLYGENLPPQDAEVRHQNPFK
 QTHAAKRSCPFGRVPVNLNSPDFYVKTDSAVTQLTTRLALSSVPLPYVTCLLHLQLLALAGL
 AKGSGPDRDAILPGSRPRGSDSYELRGLKPIQTIYKDSLVSNEKSSSELMSDLIALKSKTDS
 TKLEETKPEIAERRPMQWQSTRKPECVFNPAAFAPLRHVDPVTPKADKESPPISVPKWLDPKS
 ACETPSSSSLDYMKCFKTPVVKNDFPPACPSSTPYSQLARLQOQOQOGLSTPLQSLQISGSSS
 INECISVNGRIYSILKQIGSGGSSKVFQVLNEKKQINAIKYVNLEDADSQTIESYRNEIAFLNK
 LQQHSDKIIRLYDYEITEQYIYMVMCEGNIDLNSWLKKKKSINPWERKSYWKNMLEAVHIHQH
 GIVHSDLKPANFVIIVDGMKLIDFGIANQMOPDTTSIVKDSQVGTVNYMAPEAIRDMSSSRENS
 KIRTKVSPRSDVWSLGCILYMYTYGRTPFQHIINQVSKLHAIINPAHEIEFPEISEKDLRDVLK
 CCLVRNPKERISIPPELLTHPYVQIQPHPGSQMARGATDEMKYVLGQLVGLNSPNSILKTAKTLY
 ERYNCGEGQDSSSSKTFDKKRERK

FIG. 1I

ADN de CDC2L1 de ratón:

```

1   atgggtgatg aaaaggactc ttggaaagtg aaaacgttag atgaaattct ccaggaaaag
61  aaacgaagga aagaacaaga ggagaaaagca gagataaaaac gcttaaaaaa ttctgatgac
121 cgcgattcca aaagggattc ccttgaggag ggggagctga gagatcaccg aatggagatc
181 acaatcagga actcaccata tagaagagag gattctatgg aagacagagg agaggaggat
241 gattctctgg ccatcaaacc accccagcaa atgtctcggg aagaaaaggc tcatcacaga
301 aaagacgaga aaagaaaaga gaaacgtcga catcgtagcc attcagcaga gggagggaaa
361 catgccagag tgaagagaa agaaagggag cacgaacgcc ggaaacgcc a ccgagaagaa
421 caagataaag ctcgaagggg gtgggaaaga cagaagagga gggaaatggc gagagaacat
481 tccagaagag agagggaccg cctggagcag ttagaaaagg agagggagcg ggagcgcaag
541 ctgagggagc agcagaagga gcagcgggag cagaagagc yggaaacggag ggcagaggag
601 cgccgcaaag agagagaagc gcgtagggaa gtctctgcac atcaccgtac catgagggag
661 gagtacagtg ataaggggaa ggttggccac tggagccgca gccctctgag gccaccaaga
721 gagcgctttg agatgggaga caaccggaag ccagtaaaag aagagaaggt ggaagagaga
781 gacttggtgt cagacctcca agacatcagt gacagcgaga ggaaaaccag ctcagctgag
841 tcttcatcag cagaatcagg ctcaggttct gaagaggagg aggaggaaga agaagaggaa
901 gaagaagaag aagggagcac cagtgaagaa tcagaggaag aagaggaaga agaagaggag
961 gaggaagaag aggagactgg gagcaactct gaggaggcct ctgaacagtc cgcagaagaa
1021 gtcagtgatg aggaaatgag tgaagatgaa gacagagaaa acgagaacca catcttgggt
1081 gttccagagt cacgatttga ccgagattct ggggacagtg aagaagggga ggaagaagtt
1141 ggtgaagggg ctccacagag cagtgcctcc accgaaggag actatgttcc tgactctcca
1201 gcaactgtcac ctattgagct aaaacaagaa ctgcccacaa acctgccagc cctgcagggg
1261 tgcaggagtg tagaggagtt tcagtgtctg aacaggattg aagaaggcac ctatggggtg
1321 gtctacagag caaaggacaa gaaaacagat gaaattgttg ctctgaagcg gttaaagatg
1381 gagaaggaga aggaaggcct cccaatcacg tcgctgaggg aatcaacac catcctcaag
1441 gccagcacc ccaacatcgt caccgtcagg gaaattgttg tgggaagtaa catggacaag
1501 atctacattg tgatgaacta cgtggaacat gacctcaaga gcctaattga gaccatgaag
1561 cagcccttcc tgcaggggga ggtgaagacc ctgatgatcc agctgctgag tggggtaaag
1621 cacctccatg acaattggat cctacaccgt gacctgaaga cctctaacct cctgctgagc
1681 catgctggca ttctcaaggt gggcgacttt gggetggctc gggagtatgg ttcaccctta
1741 aaggcctaca ctccagttgt tgtaaccctg tggatcctg cccagaact actgcttggg
1801 gctaaggaat actccacagc tgtggacatg tggtcggtag gctgcatatt tggagaactg
1861 ctgacacaga aacctctggt ccttgggaag tcagatattg atcagattaa caagatttct
1921 aaggacctgg gtactcctag tgagaaaatc tggcctggct ataatgacct cccagccgtc
1981 aagaagatga ccttcagcga gtatccctat aacaacctcc gcaagagatt tggggctttg
2041 ttatcagatc aaggctttga tctcatgaac aagttcctga catactacc tggcagaggg
2101 atcaacgcag aagatggcct caagcacgaa tatttccgag agactccct ccccatcgac
2161 ceatccatgt tccccagtg gctgccaag agtgagcagc agagagtgaa gcgagccagc
2221 agtccacggc ctcttgaggg cggtctgggc tacagccagc tgggtgatga tgacctgaag
2281 gagacgggct tccacctcac caccaccaac cagggagcct cagctgcagg ccttggcttc
2341 agcctcaagt tctga

```

FIG. 2A

ADN de CSNK1A1 de ratón:

```

1   atggcgagca gcagcggctc caagggcgaa tttatcgtcg gtggaaaata caaactggtg
61  cggaagatcg gatctggctc ttctggggac atttatctag cgatcaacat caccaatggc
121 gaggaagtgg cagtgaaact agaatccag aaggccaggc atccccagtt gctgtacgag
181 agcaaactgt ataagattct tcaaggtggg gttggcatcc ctcacatacg gtggatggg
241 caagaaaaag actataatgt actagtcatg gatctcctgg gacccagcct tgaagacctc
301 ttcaacttct gttcaaggag gttcactatg aagaccgtac ttatgttagc tgaccagatg
361 atcagtagaa ttgaatatgt gcatacaaa aattttatac acagagacat taaaccagat
421 aacttcctaa tgggtattgg gcgtcactgt aataagttat tcottattga ttttggtttg
481 gccaaaaagt acagagacaa caggacaagg caacacatac catacagaga agataaaaac
541 ctcactggca ctgcccgata cgccagcacc aatgcacatc ttgggtattga gcagagtcgc
601 cgagatgaca tggaatcttt aggatattgt ttgatgtatt ttaatagaac cagtctgccg
661 tggcaaggac tgaaggctgc aacaaagaaa caaaaatatg aaaagattag tgaagaagag
721 atgtccactc ctggtgaggt gttgtgtaag gggtttctcg cagaatttgc catgtactta
781 aattactgtc gtgggctgcg ctttgaggaa gctccggatt acatgtatct gaggcagcta
841 ttccgcatec ttttcaggac cctgaaccac caatatgact acacatttga ttggacgatg
901 ttaaagcaga aagcagccca gcaggcagcc tcttccagtg ggcagggta gcaggcccaa
961 acccccacag gtttctaa

```

FIG. 2B

ADN de GYK de ratón:

```

1   atggcagccg cgaagaaagc agttctgggg ccattgggtg gagcagtgga ccagggtacc
61  agctcgacac gtttttgggt tttcaattca aaaacagctg aacttcttag tcatcatcaa
121 gttagaaataa aacaggaatt cccaagagaa ggatgggtag aacaagacc gaaggaaatt
181 ctgcagtcgt tttatgagtg tatagagaaa acgtgtgaga aacttggaca gctcaatatt
241 gatatttcca acatcaaagc cattgggtgc agcaaccaga gggaaaccac agtagtctgg
301 gacaaggtea ccggagagcc tctctataat gccgtgggtg ggcttgacct aagaaccag
361 tctactgttg agaaccttag taaaagaatt ccaggaaata ataacttigt caagtccaag
421 acaggccttc cacttagcac gtatttcagt gcagtgaaac ttcgttggct ccttgacaac
481 gtgaaaaagg tccaagaggc ttttgaagaa aatagagctc ttttgggac cattgattca
541 tggcttattt ggagttaac aggaggaatc catgggggtg tccactgtac agatgtaaca
601 aatgcaagca ggacgatgct ttttaacatt cattcttggg aatgggataa agagctctgc
661 gaattttttg gaattccaat ggaaattctt cccaacgttc ggagttcttc tgagatctat
721 ggcctaataa aagctggggc cttggaaggt gtaccaatat ctgggtgttt gggggaccag
781 tctgctgctt tgggtggaca aatgtgcttc caggatggac aggccaaaaa cacgtatgga
841 acagggtgct tcttattgtg caacacgggc cataagtgtg tattttctga acatggcctc
901 ctgacaaccg tagcatataa acttggcaga gacaaacctg tgtattatgc gttggaaggt
961 tccgtggcta tagctggtgc tgaatccgc tggctaagag acaaccttgg aattattaag
1021 tctctgagg aaattgaaa acttgcctag gaagtaggta cttcttatgg ctgctacttc
1081 gttccagcat tttcagggtt atatgcgctt tattgggagc ccagtgcaag agggatcctc
1141 tgtggactca ctcagttcac caataaatgt catatcgctt ttgctgcact agaagctgtt
1201 tgtttccaaa cccgagagat tttggatgcc atgaaatcgg actgtggaat tccactcagt
1261 catttacagg tagatggagg aatgaccagc aataaaattc ttatgcagct acaagcagac
1321 attctgtata ttccagtagt gaaacctcc atgctgaaa caactgcact aggcgctgcc
1381 atggcagctg gggctgcaga gggggttggg gtgtggagtc ttgaacctga ggatttgtca
1441 getgtcacia tggagcgggt tgaacctcag atcaatgctg aagaagcga aatccgttac
1501 tccacatgga agaaagctgt gatgaagtca attggttggg ttacaactca gtctccagaa
1561 agtggtatcc cataa

```

FIG. 2C

ADN de NEK1 de ratón:

```

1   atggagaagt atgtgagact gcagaagatt ggagaagggt catttgaaa agctgttctt
61  gttaaatega cagaggatgg cagacattat gtcatacaagg aaattaacat ctcaagaatg
121 tctgataaag aaaggcaaga atcaaggaga gaagttgctg tattggcaaa catgaagcat
181 ccaaatattg tccaatataa agaatcattt gaagaaaatg gctctctcta catagtaatg
241 gattactgtg aaggaggtga tttgtttaaa cgaataaatg ctcagaaagg cgctctgttt
301 caagaagacc agatthttgga ctggthttgtg cagatatgth ttgctctgaa gcatgtacat
361 gatagaaaaa ttcttcaccg agacataaag tcacagaaca tatttctaac caaagatggg
421 acagtgcagc ttggagatth ttggaattgct cgagthctta atagthactgt agagctggct
481 cgaacttgca taggcactcc atactacttg tcacctgaaa tctgtgaaaa caagccttat
541 aacaataaaa gtgacatthg ggctthgggc tgtgtcctth atgagthtggt tacacttaaa
601 catgcaththg aagctggaaa catgaaaaac ctggtactga agataatctc cggatcctth
661 cctccagthgt cctccacatta ctctatgcat ctccgcagct tgcctgtctca gthatttaaa
721 agaaatccta gggatagacc atcagthcaac tccataththg agaaaggtht tatagctaaa
781 cgaatcgaaa agthtctctc cctcagctt atthgcagaag aaththgtct aaaaacactt
841 tcaaagththg gaccacagcc tctcccaggt aaaagaccag catcaggaca aggtgtcagth
901 tctththgtcc ctgctcagaa aatcacaaaag cctgtctgta aatacggagth gctthtaaca
961 tataagaagth atggagataa aaagthactt gagaaaaaac ccccccaaa acataaacag
1021 gcccatcaaa ttcccgtgaa gaaaatgaaat tctggagaag aaaggaaagaa aatgtctgag
1081 gaagcagcaa aaaaaagaag gththgaaath atthgagaag aaaaagaagca aaaggatcag
1141 attagththcc tgaaggtgca gcagatgaaag cggcaagaga agcagcggtht ggagaggata
1201 aatagggcca gggacaaggt atggaggaaat gththtaagggt ctggtggaag cggthgaagta
1261 aaggttctct tththggcat tggaggggct gthctctccat caccgtgthc tctctgagge
1321 cagthtgaac attaccatgc cathththgac caaatgcagc ggctaagagc agaagataat
1381 gaagcaagat ggaagggggg aatctatggt cgatggctcc cagaaaggca aaaaggacac
1441 ttagctgtag agagagccaa ccaagthgaa gaathctctac agcgtaaacg agaagctatg
1501 cagaataaag cccgagccga aggacacgtg ggaactctgc aaaaactggc atctctgtat
1561 ggaggcaggc ccagctcttc aagaggagggt aagccaagga acaatgagga agaggttht
1621 ttggcaagac tgaagcaaat aagactaca aaththtaatg agcgcacaac gattaaagcc
1681 aaactctgtg gtgagaataa agaagctgat ggtaccaaaag gacaagaagc aactgaagag
1741 actgacatga ggtcaaaaa gatggagthca cttaaggcgc aaacaaatgc acgtgctgct
1801 gthactaaaag aacagctgga gcgaaaaaga aaggaaagctt atgaaagaga aaagaaagta
1861 tgggaagaac atththgtggc gagggtaaaa agctcagatg thctctgccc ththgaaactt
1921 cthgaaacag gthgthctctc atcaaaagcag caggtgaaagc ctgthcaththc ththgactthca
1981 gctththgaaag aagthggcct ggatggaagth ttaactgata cccaggaaga agaaatggaa
2041 aagagthaca gthgctaththc aagthaaagca gaaathctctgc gthaggctaaa thgaaathctt
2101 aaagctcaag aggatgaaaa ggaaaagcag catcactcag gthctththgga gaccgththgt
2161 cacaaagatg agagagagta thgagacagaa aatgccathth cctctgatcg caagaagthg
2221 gagatgggag gthcagctthgt gathctctctc gatgcagthga cactggatac atctctctct
2281 gcaaccgaaa aacatactgt gggagaggtt athaaaththg atthtaaththg ctctccaaga
2341 aaagthctggg ggaaaaacc lacagathct gtgctgaaaga tactthggaga agctgaatha
2401 cagctacaga cagaactact agaaaacaca thththtaaaa gthgagththta thgctgaaagag
2461 gagaactaca aacctthact thactgaagaa gagaathctgc agthgcaththc aaaaagaaata
2521 aatccatcag ctactgthga thctactgaa acgaaaagthc caaagththac thgaggtgct
2581 ccacaaatgt cagaaggaaa thgtggaagaa cctgatgath thggaacaga agthctcaaa
2641 gagccaagth gcacacacac agatgggagth thgccacctg thctthaatga thgtgthgact
2701 agagagaaggt aagcagctaa ggaaactgag ththgaaagata aggtthgctgt gcagcagagth
2761 gaagthththg aagatagaat thcagggaac gththgaccaat cctgthaaagga thcagagagat
2821 octgcagthg acgathctctc gcagthctggc ththgatgthg agaagthcagth acagccagaa

```

FIG. 2D-1

```

2881 tcgattttcc agaaagtggg tcatttctaag gacttgaact tagttcaggc agttcattgc
2941 tcaccagaag aaccaattcc aattogatot cactctgatt ctccaccaa aactaagagc
3001 aagaattcct tactgattgg actttcaact ggtctgttg atgcaaaca tccaagatg
3061 ctgaggacct gctcacttcc agatctttcc aagctgttca gaaccctaat ggacgttccc
3121 actgtggggg acgttcatca agacagtctt gaaatcgatg agctggaaga tgaaccaatt
3181 aaagaagggc cttctgattc cgaagacact gtatttgaag aaactgacac agatttaciaa
3241 gagcttcagg cctcaatgga gcagctgctt agggagcaac caggtgacga atacagtgag
3301 gaggaagagt ctgttttaaa aagcagcgat gtggagcaga cagcaagagg gacagatgcc
3361 ccagacgagg aggacaaccc cagcagcgaa agcgcctga acgaggaatg gcactcagat
3421 aatagtgcag ctgagaccac tagtgaatgt gaatatgaca gtgtctttaa ccatttagag
3481 gaactaagac ttcacttggg gcaagaaatg ggctttgaaa agttctttga ggtttatgag
3541 aaagtaaagg ctattcatga ggatgaagat gaaaatattg aaatttgttc aacaatagtt
3601 gagaatattt tgggcaatga gcaccagcat ctctatgcca agattctgca tttagtcatg
3661 gcagatggag cctatcagga agataatgat gaataa

```

FIG. 2D-2

ADN de PLK1 de ratón:

```

1 atgaatgcag tggccaaagc tggaaagctg gctcagcac caaccgacct cgggaaaggt
61 ggggtcctgg gagatgcagc tcccagtgcc ccagtggtg ccccactggc gaaagaaatt
121 ctggaggctc tagtggaccc acgcagccgg cggcagtata tacggggccg ctttctgggt
181 aaaggaggct tcgccaaatg cttcagagatc tcagacgcag acacaaaaga ggtgttcgca
241 ggaagatcgc tgcctaagtc tttgctgctc aagcccacc agaaggagaa gatgtctatg
301 gagatctcaa ttcaccgcag cctagcacac caacacgtcg taggcttoca tgactttttt
361 gaggacagcg actttgtatt tgtagttttg gagctctgtc gcaggaggtc cctcctggag
421 ctgcacaaga ggaggaaggc actgaccgag cctgaggccc gctactacct gcgacagata
481 gtccctgggct gccagtacct gcaaccgaat caggtcattc acagggacct caagctgggc
541 aacctcttcc tgaacgagga tctggaggtg aaaatagggg attttggctt ggcaaccaaa
601 gtggaatatg aaggggaacg aaagaagacc ttgtgtggca ctccctaacta catagctcct
661 gaggtgctga gcaagaaggg acacagtttt gaggtggatg tgtggtccat tgggtgcate
721 atgtatacct tgctagtggg caagcctccc tttgagacct cgtgcctaaa agagacctac
781 ctccggatca agaaaaatga atacagtatt cccaagcaca tcaaccaggt ggccgcctcc
841 ctcatccaga agatgcttca gacagacccc actgcccgcc ccaccattca cgagttgctc
901 aatgacgagt tcttcaactc tggctacatc cccgccgctc tccctattac ctgcctcacc
961 atcccaccaa ggttttcaat cgctcccage agcctggacc ccagcagcag gaaacctctc
1021 aaagtccca ataaagggtg ggagaacccc ctgectgacc gtccccggga gaaagaggaa
1081 ccggtggtcc gggagacaaa tgaggccatt gagtgccacc ttagtgactt gctacagcag
1141 ctgaccagtg tcaacgcctc caagcctcgt gagcgcgggc tggtgccgca agaggaggct
1201 gaggatcctg cctgcatccc catcttctgg gtccagcaag ggggggacta ttcggacaag
1261 tatggccttg ggtatcagct gtgtgacaac agtgtggggg tgctttttaa tgactcaaca
1321 cgctgattc tctacaatga cggggacagc ctgcagtaca tagagcgtga tggcacggag
1381 tcctatctca ctgtgagctc ccateccaat tccttgatga agaagatcac tctcctcaac
1441 tatttccgca attacatgag tgagcacctg ctgaaggcag gacgcaacat cacaccccgg
1501 gaaggcgacg agctggcccg gctgccctac ctacgaacgt ggttccgcac acgcagcggc
1561 atcatcctgc acctcagcaa cggcaccgtg cagattaact tcttccagga ccacacccaa
1621 cttatcctgt gccccctgat ggcagcgggtg acctacatca acgagaagag ggacttccaa
1681 acgtaccgcc tgagcctcct ggaggagtat ggctgctgca aggagctggc cagccgcctc
1741 cgctacgccc gcaccatggt agacaagctg ctgagctcgc gctccgccag caaccgcctc
1801 aaggcctcct ag

```

FIG. 2E

ADN de PRKAR1A de ratón:

```

1   atggcgtctg gcagtatggc aaccagtgag gaagagcggg gtctccggga atgcgagctc
61  tatgtgcaga agcacaatat ccaggccctg ctgaaggact ccatcgtgca gctgtgcact
121 acgcggcccq agaggcccat ggcattcctt cgggaatact ttgagagggt ggagaaggag
181 gaggcaagac agattcagtg tctacagaaa accggcatcc gtactgactc gagggaggac
241 gagatctctc ctccaccccc caatccagtg gtgaagggcc gacggcgccg aggtgctatc
301 agtgctgaag tttacactga ggaggatgct gcctcctacg ttagaaaggT tattccaaaa
361 gattataaga caatggctgc tttagccaaq gccatcgaaa agaatgtgct gttttcacac
421 cttgatgata acgagagaag tgacattttt gatgctatgt ttccagtctc ctttattgct
481 ggagagacgg ttattcagca aggtgatgaa ggggataact tctatgtgat t gatcaagga
541 gaaatggatg tctatgtcaa taatgaatgg gcaaccagtg ttggggaagg agggagcttt
601 ggagagctgg ctttgattta tggaacaccc agagcagcca ctgtcaaagc aaagacaaa
661 gtgaaactgt ggggcacgca ccgagacagc taccgaagaa tcctcattga aagcactctg
721 cgaaagactg agatgtatga agaattcctt agtaaagtgt ctattttaga ctctctggac
781 aagtgggagc gtctcacagt agccgatgca ttggagcctg tccagtttga agatggacag
841 aagatcgtgg tgcaaggaga gccgggggat gagttcttca tcattttaga gggcacagct
901 gctgtgctgc agcgtcggtc agaaaacgaa gaatttggtg aagtgggacg actggggcct
961 totgattatt ttggtgaaat tgccctgctg atgaatcgtc ctcgggctgc cactgtgggt
1021 gcccggggcc ctttgaagtg cgttaagttg gaccggcctc ggtttgaacg cgtccttggc
1081 cegtgtcag acatcctcaa gcggaacatc cagcagtaca acagcttctg gtccctgtcc
1141 gtctga

```

FIG. 2F

ADN de PRKRA de ratón:

```

1   atgtcccata gcaggcatcg tgccgaggcc ccgcccgtgc agcgcgagga cagcgggacc
61  ttcagtttgg gcaagatgat aacagctaag cctgggaaaa caccgattca ggtattgcac
121 gagtacggca tgaagaccaa gaacattcca gtttatgaat gtgaaagatc cgatgtgcaa
181 gtacacgtgc ccactttcac cttcagagta accgttggtg acataacttg cacaggtgaa
241 ggtacgagta agaagctggc gaagcacaga gctgcggagg ccgccataaa cttttgaaa
301 gccaatgcaa gtatttgctt tgcagttcct gaacccttaa tgctgatcc atccaaacag
361 ccgaagaacc agctgaatcc aattggctca ttacaggaat tagcaattca ccattgctgg
421 cgacttctcg aatataccct tcccaggaa ggaggaccgg ctcataagag ggaatacacc
481 acgatctgca ggcttgaatc attcatggaa actggaaagg gggcatcaaa aaaacaagcc
541 aagagaaatg ctgctgagaa atttctcggc aagtttagta atatttctcc agagaaccac
601 atttctctaa cgaacgtggt tggacattcc ctaggatgca cttggcactc cttgaggaat
661 tcccctggtg agaagatcaa cctcctgaaa aggagcctcc tcagtctccc gaacacagac
721 tacatccagc tgcttagtga gattgccagc gagcaaggct ttaacataac gtatttggat
781 atagaggagc tgagtgccaa cggacagtat cagtgtctcg cagagctgtc caccagt.cct
841 atcaccgtgt gtcacggctc aggcattctc tgtggcaatg cacagagtga cgctgtcac
901 aatgctctgc agtattttaa gataatagca gaaagaaagt ag

```

FIG. 2G

ADN de TTBK2 de ratón:

```

1   atgggactag ccaaccgacg ccacaggctg ggaacgtgct ctccaatcag caccgcgggc
61  ggagagaatt gtaaaaccgg taagatcaag tgccatttga aagagactca ctcttggcta
121 agaagagaaa taggaaatag gttaaatgga atccaccctt gggagctaga tgccctgtgta
181 gctgttttac ctcatcaggg ttttgcaatg agtggaggag gagagcagcc agatatcctc
241 agtgttggaa tcctgggtcaa agaaagatgg aaagtgttaa gaaagattgg aggtgggggc
301 tttggagaaa tttacgatgc cttggacatg ctcaccaggg agaatgtggc gctgaagggtg
361 gagtcagctc agcagccaaa gcaggttctg aagatggagg ttgctgtggt gaagaaactg
421 caagggaaaag accatgtttg tagatttatt ggctgtggga gaaatgatcg ttccaactac
481 gtggtcatgc aattgcaggg acggaatctg gcagatctcc gccgtagcca atcccggggc
541 acattcacta ttagcactac ccttcgtctt gggaaacaga ttctggagtc tattgaaagc
601 atacattctg tgggattcct tcacagagac atcaaaccgt caaacttcgc catggyagct
661 ttccccagta catgtaggaa atgtttcatg cttgattttg gcttggctcg acaatttact
721 aattcctgtg gtgacgtcag accacotegt gctgtggcag gctttcgagg gacagttcgt
781 tatgcatcaa tcaatgtca tcggaacagg gaaatgggaa gacatgatga cctttggtct
841 ttattctaca tgttgggtgga gtttgggtt ggccaactgc cttggagaaa aataaaggac
901 aaggagcaag taggctccat taaggagaga tatgaccaca ggctcatgtt aaaacacctc
961 cctccagaat tcagcacctt tcttgaccat atttctctt tggattatit taaaaaccg
1021 gactaccagc ttctaacatc cgtgtttgac aatagcatca agacctttg agtaattgag
1081 agtgaccctg ttgactggga gaagagtggg actgatggct ccctgacaac caccaccacc
1141 tctgccaccc ctacagctgca caccgcctg acccttctg ctatcggaat tgcaaatgcc
1201 acccccatcc caggagactt gcttggagaa aatacagatg aagtgtttcc agatgaaagc
1261 cttagtgtatg gggagaacgg aatcctgtt ggtgtatcac cagataaatt gccctggatct
1321 ctggggcacc cacgcctca ggaaaaggat gcttgggag agatggatat caacaagaac
1381 aagataaagc tgggaatttg caaagcagct actgaaagaag aaaatagcca tggtaagta
1441 aatggcatac tcaatgtctc aagccttggg tcaccaattc gtgtccgac agagattact
1501 cagccagaca gagatgttcc gttagtaagg aagctacgtt ctattcacag ctttgagctg
1561 gaaaaacggt tgacacttga gccaaagcca gatactgaca agtttctgga gacctgcatg
1621 gagaaaatgc agaaagattc cagtgcagga aaagaacctg tccccctgc tctgctcat
1681 aagccgtgtg tccccgtcgt gaccacact gaccacatct ggcactatga tgacgaatat
1741 cticctgatg cctccaagcc tgccctctgc aacaccocgg agcaggcaga tgggtgtggc
1801 agcaacggat ttatagctgt taacttaagc tcttgcaaac aggaggttga ttccaaagaa
1861 tgggtgattg tggacaagga gcaagacctt caggacttta ggacaaatga ggtgttaggc
1921 cataagacaa ctggaagccc ttcagatgag gagcctgaag tgcttcaggt ccttgaggga
1981 tcacctcaag atgaaaagat ccaagtaggt ccttggactg acaacctca cttaaagaag
2041 gaaagctcag gtgtggtttt agcactttct gctgaatgcc ctgctactgc tgcttcagaa
2101 ctgtacacag ataggctaga cctccaggct ggagctgcaa gtcagttcat cacagtgact
2161 cccacaagtc ccatggaggc acaagcagaa ggaccctga ctgcgattac aattcctaga
2221 ccttctgtgg catcaacaca gtcaacttca ggaagcttcc actatggccc acaaccagag
2281 aagaaagatc ttcagccctt ggagcccact gtagaactgt acttccaag ggagaacttc
2341 tccggcttgg ttgtgacaga ggggtgaacta gctagcggag gaagcagagt ggatttggga
2401 cttcagatag atcacactgg tcatgacatg ttaccaaca tgagagatgg tgacacatct
2461 caagacttgg gaccaaaaga cctcctgac cataatagat tagctgtgaa agaattgaa
2521 catctccctg gagaaacaga agagagaagc cttctctctg gctcagagaa tgaagatgag
2581 aggttaagta aagggcagca ctgtattgaa gctcttccc caggagagtt agtgactgca
2641 gagagggtc agttagctgc cacagaacct ctgcatgtat cagagacaca gaactgtagt
2701 gtgctaccaa atcaggacaa aacctatgag ataatgaagc ttttggcagt tggaaactca
2761 gaaatttctc ctcaagccat tgaccacat gctgaagggc agataggcca gatggcagca
2821 atgcagaaaa ataagctatt taaagatgat ggtattcaga gtgaaagctt gccaaaggcag
2881 caggagagacc tctctgcttt tttgcaccaa gagggtaaaga gagagaaagt tgctcctaga

```

FIG. 2H-1

```

2941 aatggagagc tctatcattg tgtctcagag aatgagcatg gtcctcctac tcggaaggac
3001 atgctccggt catcctttgt gaccaggcac agccggatcc ctgttttagc acaagaaata
3061 gactcaactt ttgaatcacc ctctgetatt tctgcaaaag aaaagcttct acagaagaaa
3121 gcctatcagc cagaaatagt caaacttctt gtagaaaaaa ggcagttcaa gtctttcctg
3181 ggagacctct caagtgcctc tgataagctg atagaggaga aactagccgc tgtccagtc
3241 cctttttctg aggaggaagt cttcgcctcc ttttctagac tggcagcaga tcccacctg
3301 agtagatcag ttgaagatag ctttctgtca cccatcatct cccaggctag aaagagcaag
3361 attccaaggc cagtatcctg ggtcagcaca gatcaaatta atggctccgc ttcacctcag
3421 ttcttgctc gccaccacc aggaaagcca ccagtcaggc ctggagtaga agccaggcta
3481 cgcagatata aagttctagg gagtagtaac tctgactcag accttttctc tcgctggcc
3541 caaattcttc aaaatggatc tcagaaatcc cggagtacta cccaatgcaa gagcccagga
3601 tctcctcaca atccaaaaac accacccaag agtccagttg tacctegaag gagtcccagt
3661 gctctctctc gaagctcate cttgcctcga acatctagtt cctcacctc tagggctgga
3721 cgccccacc atgaccagag gagttcttcc ccacatctgg ggagaagcaa gtcacccct
3781 agccactcag gatcatcgtc ctccaggagg tctcgccaac aggagcattg caaacccagc
3841 aagaatggcc caaaaggatc tggcagcctc caccaccact caaccagctc taaaactccc
3901 ccaggggaaga gtaagccagc cagtaaactc agcagatag

```

FIG. 2H-2

ADN de TTK de ratón:

```

1 atggaggctg aagagttaat tggcagcagt gtgacgattg attccatcat gagcaaaatg
61 agagatatta aaaataagat aatgaagac tgtactgatg agctaagctt gtctaaaatc
121 tgtgccgatc acaccgaaac tgtaaccaa attatgaggg ttgggaacac cccagagaac
181 tggttgaatt tcttgetgaa actagagaaa aacagctcac ctctaaatga cgatctttta
241 aataagctga ttggtcggta tagtcaagcg attgaagtac ttctccaga taaatacggc
301 cagaatgaga gctttgetcg aatacaagtg agacttgctg aactaaaagc tattcaagag
361 cctgatgatg cccgtgacta ctccagatg gccagggaaa actgcaagaa gtttgccttt
421 gtgcacgtat cttttgcaca gtttgaactg tctcaaggca atcttaaaaa aagtgagcag
481 cttcttcata aagctgtaga gactggggcg gtgcccgtgc agatgctgga gacggccatg
541 cgtaacttac acctccagaa aaagcagctg ctcccgagg aggacaagaa gagtgtgtca
601 gcatcgacag tactaagtgc ccaagagccg ttctccagct cacttggaat tgtacagaat
661 aggagcatca gctgtgagtc cagaggacag gctggggcag ccagggtttt atatggagag
721 aacttgctc cacaagatgc cgaagtgagg catcaaaacc cttcaagca gactcacgca
781 gctaaacggg catgcccctt tggagagtc ccagtcaatc ttctaaacag cccagatttc
841 tatgtgaaga cagatagctc agctgtgaca cagttaacaa caaggctagc cttaagctct
901 gtacccttgc cgtacgtaac ctgcctcctg cacttacagc tgctggcgct cgcaggcttg
961 gcaaaggggt caggaccaga ccgagacgcg attctgcccg gctccagacc acgtggcagt
1021 gattcctatg aactgagagg tttaaagccc attcaacta tctattttaa agactctttg
1081 gtgtccaatg aaaagagttc tgaacttatg tctgatttaa tagccttgaa gagtaaaaca
1141 gattcaagtc taacaaaatt ggaagaaact aagccagaga ttgcagaaag aaggcccatg
1201 cagtggcagt ctaccagaaa gcccgagtgt gtgttcaga acctgctgc ctttgaccc
1261 ctgcccagc ttccagatgt caccocgaag gctgacaaag agtcaccacc aatcagctt
1321 cctaaatggc ttgatccaaa gctgcttgt gagacaccta gtagcagctc ctgggatgat
1381 tacatgaaat gttttaagac tccagttgta aagaatgact tccacctgc ctgtccatca
1441 tcaacacctt acagccagct tgcccgcctc cagcagcaac agcagcagg actcagcact

```

FIG. 2I-1

```

1501 cctotcca aa gcttgcagat ttcaggttct tcatcaataa atgaatgcat ttcagttaac
1561 ggaagaat ttt attccatatt aaagcagata ggcagtgagg gttccagtaa ggtgtttcag
1621 gtattgaatg agaaaaaaca gataaacgct atcaaatatg tgaacctaga agacgccgat
1681 agccaaacta ttgagagcta ccgcaacgag atagcgtttt tgaacaaact acagcaacac
1741 agtgataaga tcatccgct ctatgattat gaaatcaccg agcagtacat ctacatggta
1801 atggaatgtg gaaacattga cctaaatagt tggcttaaaa agaaaaaatc catcaatcca
1861 tgggaacgca agagctactg gaaaaacatg ttggaggcag tacacataat ccatcagcat
1921 ggtattgttc atagtgatct gaagcctgct aactttgtga tagtggatgg aatgctaaag
1981 ctaattgatt ttgggattgc aaaccaaagc cagccagaca caacaagcat tgttaaagat
2041 tctcaggttg gcacagttaa ctatatggcc ccagaagcaa tcagagacat gtcttcttca
2101 agagaaaatt cgaaaatcag gaccaaggta agtcccagaa gtgatgtctg gtcttggggg
2161 tgcattttgt actacatgac ttatgggagg acgccatttc agcacatcat caatcaggtc
2221 tctaaactgc acgccataat caaccctgct catgagattg aatttcccga gatttcggaa
2281 aaagatcttc gagacgtgtt aaagtgtgtt ttagtggagg accctaaaga gaggatatct
2341 atccctgagc ttctcacaca tccgtatggt caaattcagc cccatccagg cagccaaatg
2401 gctagggggg cactgatgta aatgaaatat gtgttgggtc aacttgttgg tctgaattct
2461 cctaactcca tcttgaaaac tgcaaaaact ttgtatgaac gttataattg tgggtgaaggt
2521 caagattctt cgtcatccaa gacttttgac aaaaagagag aaagaaagtg a

```

FIG. 21-2

Proteína de CDC2L1 humana:

```

MGDEKDSWKVKTLD EILQEKRRRKEQEKA EIKRLKNSDDRDSKRDSLEEGELRDHCMEITIRN
SPYRREDSMEDRGEEDSLAIKPPQOMSWKEKVHHRKDEKRKEKCRHSHSAEGGKHARVKERE
HERRKRHREEQDKARREWERQKRREMAREHSRRERDRLEQLERKRERERKMREQQKEQREQKER
ERRAEERRKEREARREVS AHHR TMREDYSDKVKASHWSRSPRPPRERFELGDGRKPVKEEKME
ERDLLSDLQDISDSEKRTSSAESS SAESGSGSEEEEEEEEEEEEEEGSTSEEEEEEEEEEEETG
SNSEASEQSAEEVSEEE MSEDEERENENHLLVVPESRFDRDSGESEEAEEVGEVGTPOSSALT
EGDYVVPDSPALLPIELKQELPKYLPALQGCRSVEEFQCLNRIEETGYGVVYRAKDKKTDEIVAL
KRLKMEKEKEGFPITSLREINTILKAQHPNIVTVREIVVGSNMDKIYIVMNYVEHDLKSLMETM
KQPFPLPGEVKTLMIQLLRGVKHLHDNWILHRDLKTSINLLLSHAGILKVGDFGLAREYGSPLKAY
TPVVVTQWYRAPELLLGAKEYSTAVDMWSVGCIFGELLTQKPLFPGNSEIDQINKVFKELGTPS
EKIWPGYSELVVKMTFSEHPYNNLRKRF GALLSDQGF DLMNKFLTYFPGRRI SAEDGLKHEY
FRETPLPIDPSMFPTWPAKSEQQRV KRGTSPRPPEGGLGYSQ LGDDDLKETGFHLTTTNOGASA
AGPGFSLKF

```

FIG. 3A

Proteína de CSNK1A1 humana:

```

MASSSGSKAEFIVGGKYKLV RKIGSGSFGDIYLAINITNGEEVAVKLESQKARHPQLLYESKLY
KILQGGVGIPIHRWYGQEKDYNVLMDDLGP SLEDLNFCSRRFTMKTVLMLADQMSRIEYVH
TKNFIHRDIKPDNFLMGIGRHCNKLF LIDFGLAKKYRDNRTROHIPYREDKNLTGTARYASINA
HLGIEQSRDDMESLGYVLMYFNRTSLPWQGLKAATKKQKYEKISEKKMSTPVEVLCKGFPAEF
AMYLNYCRGLRFEEAPDYMYLRQLFRILFRTL NHQYDYTFDWTMLKQKAAQQAASSSGQGQQAQ
TPTGKQTDKTKSNMKGF

```

FIG. 3B

Proteína de GYK humana:

MAASKKAVLGPLVGAVDQGTSSSTRFLVFNSKTAELLSHHQVEIKQEFPPREGWVEQDPKEILHSV
 YECIEKTCEKLGQLNIDISNIKAIGVSNQRETTVVWDKITGEPLYNAVVVWLDLRTQSTVESLSK
 RIPGNNNFVKSKTGLPLSTYFSAVKLRWLLDNVRKVQKAVEEKRALFGTIDSWLIWSLTGGVNG
 GVHCTDVTNASRTMLFNIHSLEWDKQLCEFFGIPMEILPNVRSSEIYGLMKISHSVKAGALEG
 VPI SGCLGDQSAALVGQMCFOIGQAKNTYGTGCFLLCNTGHKCVFSDHGLLTTVAYKLRDKPV
 YYALEGSVAIAGAVIRWLRDNLGIIKTSEEIEKLAKEVGTSYGCYFVPAPFSGLYAPYWEPSARG
 IICGLTQFTNKCHIAFAALEAVCFQTREILDAMNRDCGIPLSHLQVDGGMTSNKILMQLOADIL
 YIPVVKPSPMETTALGAAMAAGAAEGVGVWSLEPEDLSAVTMERFEPQINAESEIRYSTWKKA
 VMKSMGWVTTQSPESGIP

FIG. 3C

Proteína de NEK1 humana:

MEKYVRLQKIGEGSFGKAILVKSTEDGRQYVIKEINISRMSSKEREESRREVAVLANMKHPNIV
 QYRESFEENGLYIVMDYCEGGDLFKRINAQKGVLFQEDQILDWVFOICLALKHVHDRKILHRD
 IKSQNI FLTKDGTVQLGDFGIARVLNSTVELARTICGTPYILSPEICENKPYNNKSDIWALGCV
 LYELCTLKHAFEAGSMKNLVLKIIISGSFPVSLHYSYDLRSLVSQIFKRNPRDRPSVNSILEKG
 FIAKRIEKFLSPQLIAEEFCLKTFKFGSQPIPAKRPASGQNSISVMPAQKITKPAAKYGIPLA
 YKKYGDKKLHEKKPLQKHKQAHQTPKRVNTGEERRKISEEAARKRLEFIEKEKKQKDQIISL
 MKAEQMKRQEKERLERINRAREQGWRNVLSAGGSGEVKAPFLGSGGTIAPSSFSSRGQYEHYHA
 IFDQMQQQRAEDNEAKWKREIYGRGLPERGILPGVRPFGFPYGAAGHHHFPDADDIRKTLKRLKA
 VSKQANANRQKQLAVERAKQVEEFLQRKREAMONKARAEGHMVYLARLRQIRLQNFNERQQIK
 AKLRGEKKEANHSEGEQEGSEADMRRKKIESLKAHANARA AVLKEQLERKRKEAYEREKKVWEE
 HLVAKGVKSSDVS PPLGQHETGGSPSKQQMRSVIVSVTSALKEVGVDS SLTDRETSEEMQKTN
 AISSKREILRRLNENLKAQEDKQKQNLSDTFEINVHEDAHEHEKEKSVSSDRKKWEAGGQLV I
 PLDELTLDTSFSTTERHTVGEVIKLGPNGSPRAWGKSPTDSVLKILGEAELQLOTELLENTTI
 RSEISPEGEKYKPLITGEKKVQCISHEINPSAIVDSPVETKSPFSEASPQMSLKLEGNLEEPD
 DLETEILQEPSGTNKDES L PCTITD V WISEEKETKETQ SADRITIQENEVSE DGVSSTVDQLSD
 IHIEPGTND SQHSKCDVDKSVQPEPFFHKVVHSEHLNLPVQVQSVQCSPEESFAFRSHSHLPPK
 NKNKNSLLIGLSTGLFDANNPKMLRTCSLPDLSKLFRTLM DVPTVGDVRODNLIDEIEDENIK
 EGPSDSEDIVFEETDLDLQELQASMEQLLREQPGEYSEEEESVLKNSDVEPTANGTDVADEDD
 NPSSSALNEEWHSDNSDGEIASECECDSVFNHLEELRLHLEQEMGFEEKFFEVYEKIKAIHEDE
 DENIEICSKIVQNILGNEHQHLYAKILHLVMADGAYQEDNDE

FIG. 3D

Proteína de PLK1 humana:

MSAAVTAGKLARAPADPGKAGVPGVAAPGAPAAAPPAKEIPEVLVDPRRRRYVVRGRFLGKGGF
 AKCFEISDADTKEVFAGKIVPKSLLLKPHQREKMSMEISIHRS LAHQHVVGFGHGFEDNDFV FV
 VLELCRRRSLELHKRRKALTEPEARYYLRQIVLGCQYLHRNRVIHRDLKLG NLF LNEDLEVKI
 GDFGLATKVEYDGERKKTLCGTPNYIAPEVLSKKGHSFEVDVWSIGCIMYTLVKGPPPFETSCL
 KETYLRIKKNEYSIPKHINPVAASLIQKMLQTDPTARPTINELLNDEFFTSGYIPARLPITCLT
 IPPRFSIAPSSLDPSNRKPLTVLNKGLNPLPERPREKEEPVVRETGEVVDCHLSDMLQQLHSV
 NASKPSEGLVRQEEAEDPACIPIFWVSKWVDYSDKYGLGYQLCDNSVGVLFNDSTRILLYNDG
 DSLQYIERDGTESYLTVSSHPSNLMKKITLLKYFRNYMSEHLLKAGANITPREGDELARLPYLR
 TWFRTSAIILHLSNGSVQINFFQDHTKILCPLMAAVTYIDEKRDFRTYRLSLLLEEYGCCKEL
 ASRLRYARTMVDKLLSSRSASNRLKAS

FIG. 3E

Proteína de PRKAR1A humana:

MESGSTAASEEARSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAKQ
IQNLQKAGTRTDSREDEISPPPPNPVVKGRRRRGAISAEVYTEEDAASYVRKVIPKDYKTMAL
AKAIEKNVLFSHLDDNERSDIFDAMFSVSFIAGETVIQQGDEGDNFYVIDQGETDVYVNNNEWAT
SVGEGGSFGELALIYGTTPRAATVKAKTNVKLWIDRDSYRRILMGSTLRKRKMYEEFLSKVSIL
ESLDKWERLTVADALEPVQFEDGQKIVVQGEPEGDEFFIILEGSAAVLQRRSENEEFVEVGRGLGP
SDYFGEIALLMNRPRAATVVARGPLKCVKLDPRFRFVRLGPCSDILKRNIQQYNSFVSLSV

FIG. 3F

Proteína de PRKRA humana:

MSQSRHRAEAPPLEREDSGTFSLGKMITAKPGKTFIQVLHEYGMKTKNIPVYECERSDVQIHVP
TFTFRVTVDITCTGEGTSKKLAKHRAEAAAINILKANASICFAVPDPLMPDPSKQPKNLNPI
GSLQELAIHHGWRLPEYTLSEQEGPAHKREYTTICRLESFMETGKGASKKQAKRNAAEKFLAKF
SNISPENHISLTVVGHSLGCTWHSRLRNSPGEKINLLKRSLLSIPNTDYIQLLSEIAKEQGFNI
TYLDIDELSDANGQYQCLAELSTSPITVCHGSGISCGNAQSDAAHNALQYLKIIAERK

FIG. 3G

Proteína de TTBK2 humana:

MQCLAAALKDETNMSGGGEQADILPANYVVKDRWKVLKIGGGGFGEIYEAMDLLTRENVALKV
ESAQQPKQVLKMEVAVLKKLQGDHVCRFIGCGRNEKFNYYVMQLQGRNLADLRRSQPRGTFTL
STTLRLGKQILESIEAHSVGFHLHRDIKPSNFMAGRLPSTYRKCYMLDFGLARQYTNNTTGDVVRP
PRNVAGFRGTVRYASVNAHKNREMGRHDDLWSLFLYMLVEFVAVGQLPWRKIKDKEQVGMKEKEYE
HRMLLKHMPSSEFHLFLDHIASLDYFTKPDYQOLIMSVFENSMKERGIAENEAFDWEKAGTDALLS
TSTSTPPQQNTRQTAAMFGVVNVTPVPGDLLRENTEDVLQGEHLSQENAPPILPGRPSEGLGP
SPHLVPHPGGPEAEVWEETDVNRNKLRLINIGKSPVEEEQSRGMGVPSSPVRAPPDSTTPVRS
LRYRRVNSPESERLSTADGRVELPERRSRMDLPGSPSRQACSSQPAQMLSVDTGHADRQASGRM
DVSASVEQEALSNAFRSVPLAEEDFDSEKVIIDKETELKDFPPGAEPSTSGTTDEEPEELRP
LPEEGEERRRLGAEPTVRPRGRSMQALAEEDLQHLPPQPLPPQLSQGDGRSETSQPPTPGSPSH
SPLHSGPRPRRRESDPTGPQRQVFSVAPPFEVNGLPRAVPLSLPYQDFKRDLSDYRERARLLNR
VRRVGFSHMLLTTPQVPLAPVQPQANGKEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE
EEEEAAAVALGEVLGPRSGSSSEGSERSTDRSQEGAPSTLLADDQKESRGRASMDGDLEPEEG
SKTLVLVSPGDMKKS PVTAE LAPDPLGTLAALTPQHERPQPTGSQLDVSEPGTLSSVLKSEPK
PPGPGAGLGAGTVTTGVGGVAVTSSPFTKVERTFVHIAEKTHLNVMSGGQALRSEEF SAGGEL
GLELASDGGAVEEGARAPLENGLALSGLNGAEIEGSALSGAPRETPSEMATNSLPNGPALADGP
APVSPLEPSPEKVATISPRRHAMPGRPRSRIPVLLSEEDTGSEPSGSLSAKERWSKRARPOQD
LARLVMEKRQGRLLLRLASGASSSSSEEQRRASETLSTGTGSEEDTPASEPAAALPRKSGRAAAT
RSRIPRPIGLRMPMFVAAQQPASRSHGAAPALDTAITSRLQLQTPPGSATAADLRPKQPPGRGL
GPGRAQAGARPPAPRSPRLPASTSAARNASASPRSQSLSRRESPPSPSHQARPGVPPPRGVPPAR
AQPDCGTPSPGGSKKGRGKLAQQRATTKGRAGGAEGRAGAR

FIG. 3H

Proteína de TTK humana:

MESEDLSGRELTIDSIMNKVRDIKKNFKNEDLTDELSLNKISADTTDNSGTVNQIMMMANNPED
WLSLLLKLEKNSVPLSDALLNKLIGRYSQAIEALPPDKYQNESFARIQVRF AELKAIQEPDDA
RDYFQMARANCKKFAFVHISFAQFELSQGNVKKSKQLLQKAVERGAVPLEMLEIALRNLNLQKK
QLLSEEEKKNLSASTVLTAEFSFSGSLGHLQNRNNSCDSRGQTTKARFLYGENMPPQDAEIGYR
NSLRQTNKTKQSCPFGRVPVNLNSPDCDVKTDDSVVPCFMKRQTSRSECRDLVVP GSKPSGND
SCELRNLKSVQNSHFKEPLVSDEKSSSELIITDSITLKNKTESSLLAKLEETKEYQEPEVPESNQ
KQWQSKRKSECINQNPAASSNHWQIPELARKVNTEQKHTTFEQPVFSVSKQSPPISTSKWFDPK
SICKTPSSNTLDDYMSCFRTPVVKNDFPPACQLSTPYGQPACFQQQHQILATPLQNLQVLASS
SANECISVKGRIYSILKQIGSGGSSKVQVLNEKKQIYAIKYVNLEEADNQTLDSYRNEIAYLN
KLQOHSDKIIRLYDYEITDQYIYMVMCEGNIDLNSWLKKKKSIDPWERKSYWKNM LEAVHTIHQ
HGIVHSDLKPANFLIVDGMLKLIDFGIANQMOPDTTSVVKDSQVGTVNYPPEAIKDMSSSREN
GKSKSKISPKSDVWSLGCILYYMTYGKTPFQQIINQISKLHAIIDPNHEIEFPDIPEKDLQDVL
KCCLKRDPKQRISIPELLAHPYVQIQTHPVNQMAKGTTEEMKYVLGQLVGLNSPNSILKAAKTL
YEHYSGGESHNSSSSKTFEKKRGKK

FIG. 31

ADN de CDC2L1 humana:

```

1   atgggtgatg aaaaggactc ttggaaagtg aaaacttttag atgaaattct tcaggaaaag
61  aaacgaagga aggaacaaga ggagaaagca gagataaaac gcttaaaaaa ttctgatgac
121 cgggattcca agcgggattc ccttgaggag ggggagctga gagatcaactg catggagatc
181 acaataagga actccccgta tagaagagaa gactcaatgg aagacagagg agaagaagat
241 gattctttgg ccatcaaacc accccagcaa atgtcttggg aagaaaaagt tcatcacaga
301 aaagatgaaa agaggaaaga aaaatgtagg catcatagcc attcagcaga aggggggaag
361 catgctagag tgaagaaaag agagcacgaa cgtcggaaac gacatcgaga agaacaggat
421 aaagctcgcc gggaatggga aagacagaag agaagggaaa tggcaaggga gcattccagg
481 agagaaaggg accgcttggg gcagttagaa aggaagcggg agcgggagcg caagatgcgg
541 gagcagcaga aggagcagcg ggagcagaag gagcgcgagc ggcgggcgga ggagcggcgc
601 aaggagcggg aggcccgag ggaagtgtct gcacatcacc gaacgatgag agaggactac
661 agcgacaaa tgaaagccag cactggagt cgcagcccgc ctcggccgcc gcgggagcgg
721 ttcgagttgg gagacggccg gaagccagta aaagaagaga aaatggaaga aagggacctg
781 ctgtccgact tacaggacat cagcgacagc gagaggaaga ccagctcggc cgagtcctcg
841 tcagcagaat caggctcagg ttctgaggaa gaagaggagg aggaggaaga ggaggaggag
901 gaagggagca ccagtgaaga atcagaggag gaagagggaag aggagggaga ggagaccggc
961 agcaactctg aggaggcatc agagcagttc gccgaagaag taagtgagga agaaatgagt
1021 gaagatgaag aacgagaaaa tgaaaaccac ctcttgggtg ttccagagtc acggttcgac
1081 cgagattccg gggagagtga agaagcagag gaagaagtgg gtgagggaac gccgcagagc
1141 agcgcctga cagagggcga ctatgtgcc gactcccctg cctgttgcc catcgagtc
1201 aagcaggagc tgcccaagta cctgccggcc ctgcagggct gccggagcgt cgaggagttc
1261 cagtgcctga acaggatcga ggagggcacc tatggagtgg tctacagagc aaaagacaag
1321 aaaacagatg aaattgtggc tctaaagcgg ctgaagatgg agaaggagaa ggagggcttc
1381 ccgatcacgt cctgagggga gatcaacacc atcctcaagg ccagcatcc caacattgtc
1441 accgttagag agattgtggt gggcagcaac atggacaaga tctacatcgt gatgaactat
1501 gtggagcacg acctcaagag cctgatggag accatgaaac agcccttctt gccaggggag
1561 gtgaagacc tgatgatcca gctgctgctg ggggtgaaac acctgcacga caactggatc
1621 ctgcaccgtg acctcaagac gtccaacctg ctgctgagcc acgcggcat cctcaagggtg
1681 ggtgattttg ggtggcgcg ggagtacgga tcccctctga aggcctacac cccggctcgtg
1741 gtgaccagtg ggtaccgcgc ccagagctg ctgcttgggtg ccaaggaata ctccacggcc
1801 gtggacatgt ggtcagtggg ctgcatcttc ggggagctgc tgaactcagaa gcctctgttc
1861 cccgggaatt cggaaatcga tcagatcaac aaagtgttca aggagctggg gacccccagt
1921 gagaaaatct ggccccgcta cagtgagctc ccagtagtca agaagatgac cttcagcgag
1981 caccctaca acaacctcgg caagcgcttc ggggctctgc tctcagacca gggcttcgac
2041 ctcatgaaca agttcctgac ctacttcccc gggaggagga tcagcgtgga ggacggcctc
2101 aagcatgagt atttccgcga gacccccctc cccatcgacc cctccatggt ccccacgtgg
2161 cccgccaaqa gcgagcagca gcgtgtgaa gggggcacca gcccgaggcc cctgagggga
2221 ggcctgggct acagccagct gggtgacgac gacctgaagg agacgggctt ccacctacc
2281 accacgaacc agggggcctc tgccgcgggc cccggcttca gccctcaagt ctga

```

FIG. 4A

Secuencia de ADN de CSNK1A1 humana:

```

1   atggcgagta gcagcggtc caaggctgaa ttcattgtcg gagggaaata taaactggta
61  cggaagatcg ggtctggctc cttcggggac atctatitgg cgaatcaacat caccaacggc
121 gaggaagtgg cagtgaagct agaattctcag aaggccaggc atcccagtt gctgtacgag
181 agcaagctct ataagattct tcaagggtgg gttggcatcc cccacatagc gtggtatggt
241 caggaaaaag actacaatgt actagtcacg gatcttctgg gacctagcct cgaagacctc
301 ttcaatttct gttcaagaag gttcacaatg aaaactgtac ttatglttagc tgaccagatg
361 atcagtagaa ttgaatatgt gcatacaaag aattttatac acagagacat taaaccagat
421 aacttcctaa tgggtattgg gcgtcactgt aataagttat tccttattga ttttggtttg
481 gccaaaaagt acagagacaa caggacaagg caacacatac catacagaga agataaaaac
541 ctactggca ctgcccgata tgctagcacc aatgcacatc ttggtattga gcagagtcgc
601 cgagatgaca tggaatcatt aggatatggt ttgatgtatt ttaatagaac cagcctgcc
661 tggcaagggc taaaggctgc aacaaagaaa caaaaatatg aaaagattag tgaaaagaag
721 atgtccacgc ctggtgaagt tttatgtaag gggtttctct cagaatttgc gatgtactta
781 aactattgtc gtgggtacg ctttgaggaa gccccagatt acatglatct gaggcagcta
841 ttccgcattc ttttcaggac cctgaacct caatatgact acacatttga ttggacaatg
901 ttaaagcaga aagcagcaca gcaggcagcc tcttccagtg ggcagggtca gcaggccaa
961 accccacag gcaagcaaac tgacaaaacc aagagtaaca tgaaaggttt ctaa

```

FIG. 4B

ADN de GYK humana:

```

1   atggcagcct caaagaaggc agttttgggg ccattggtgg gggcggtgga ccagggcacc
61  agttcgacgc gctttttggg ttccaattca aaaacagctg aactacttag tcatcatcaa
121 gtagaaataa aacaagagtt cccaagagaa ggatgggtgg aacaggacc taaggaaatt
181 ctacattctg tctatgagtg tatagagaaa acatgtgaga aacttgga ca gctcaatatt
241 gatatttcca acataaaagc tattgggtgc agcaaccaga gggaaaccac tgtagtctgg
301 gacaagataa ctggagagcc tctctacaat gctgtgggtg ggcttgatct agaaccag
361 tctaccgttg agagtcttag taaaagaatt ccaggaaata ataactttgt caagtccaag
421 acaggccttc cacttagcac ttacttcagt gcagtgaaac ttcgttggct ccttgacaat
481 gtgagaaaag ttcaaaaggc cgttgaagaa aaacgagctc tttttgggac tattgattca
541 tggcttattt ggagtttgac aggaggagtc aatggaggtg tccactgtac agatgtaaca
601 aatgcaagta ggactatgct ttccaacatt cattctttgg aatgggataa acaactctgc
661 gaattttttg gaattccaat ggaaattctt ccaaagtcc ggagttcttc tgagatctat
721 ggctaataga aaatctctca tagcgtgaaa gctggggcct tggaaaggtg gccaatatct
781 ggggtgtttg gggaccagtc tgctgcattg ggggacaaa tgtgcttcca gatggacaa
841 gccaaaaata cgtatggaac aggatgttct ttaactatgta atacaggcca taagtgtgta
901 tttctgac atggccttct caccacagtg gcttacaac ttggcagaga caaaccagta
961 tattatgctt tggaaaggtc ttagctata gctgggtgct ttattcgctg gctaagagac
1021 aatcttggaa ttataaagac ctcagaagaa attgaaaaac ttgctaaga agtaggtact
1081 tcttatggct gctacttcgt cccagcattt tcggggttat atgcacctta ttgggagccc
1141 agcgcaagag ggataatctg tggactcact cagttcacca ataaatgcca tattgctttt
1201 gctgcattag aagctgtttg ttccaaact cgagagattt tggatgcat gaatcgagac
1261 tggggaattc cactcagtca ttgacagga gatggaggaa tgaccagcaa caaattctt
1321 atgcagctac aagcagacat tctgtatata ccagtagtga agccctcaat gcccgaaacc
1381 actgcaactg gtgaggctat gggcgaggg gctgcagaag gagtcggcgt atggagtctc
1441 gaaccgagg atttgtctgc cgtcacgatg gagcggtttg aacctcagat taatcgagg
1501 gaaagtga aa ttcgttatct tacatggaag aaagctgtga tgaagtcaat gggttgggtt
1561 acaactcaat ctccagaaag tggatttcca taa

```

FIG. 4C

ADN de NEK1 humana:

```

1   atggagaagt atggttagact acagaagatt ggagaagggt catttggaag agccattctt
61  gttaaactca cagaagatgg cagacagtat gttatcaagg aaattaacat ctcaagaatg
121 tccagtaaag aaagagaaga atcaaggaga gaagttgcag tattggcaaa catgaagcat
181 ccaaataattg tccagtatag agaatcattt gaagaaaatg gctctctcta catagtaatg
241 gattactgtg agggagggga tctgtttaag cgaataaatg ctcagaaagg cgttttggtt
301 caagaggatc agattttgga ctggtttgta cagatatggt tggccctgaa acatgtacat
361 gatagaaaaa ttcttcatcg agacattaaa totcagaaca tatttttaac taaagatgga
421 acagtacaac ttggagattt tgggaattgct agagttctta atagtactgt agagctggct
481 cgaacttgca tagggacccc ataactacttg tcacctgaaa tctgtgaaaa caaaccttac
541 aataataaaa gtgacatttg ggctctgggg tgtgtccttt atgagctgtg tacacttaaa
601 catgcttttg aagctggcag tatgaaaaac ctggactga agataaatatc tggatctttt
661 ccacctgtgt ctttgcatta ttccatgat ctccgcagtt tgggtgtctca gttatttaaa
721 agaaatccta gggatagacc atcagtcaac tccatattgg agaaagggtt tatagccaaa
781 cgcattgaaa agtttctctc tctcagctt attgcagaag aattttgtct aaaaacattt
841 tcgaagtttg gatcacagcc tataccagct aaaagaccag cttcaggaca aaactcgatt
901 tctgttatgc ctgctcagaa aattacaaag cctgccgcta aatatggaat acctttagca
961 tataagaaat atggagataa aaaattacac gaaaagaaac cactgcaaaa acataaacag
1021 gcccatcaaa ctccagagaa gagagtgaat actggagaag aaaggaggaa aatatctgag
1081 gaagcagcaa gaaagagaag gctggaattt attgaaaaag aaaagaaaca aaaggatcag
1141 attattagtt taatgaaggc tgaacaaatg aaaaggcaag aaaaggaaag gttggaaaga
1201 ataaataggg ccagggaaca aggatggaga aatgtgctaa gtgctggtgg aagtggtgaa
1261 gtaaaggctc ctttctggg cagtggaggg actatagctc catcatctt tctctctcga
1321 ggacagtatg aacattacca tgccattttt gaccaaatgc agcaacaaag agcagaagat
1381 aatgaagcta aatggaaaag agaaatatat ggtcgaggtc tccagaaag aggaattctg
1441 cctggagttc gtccaggatt tcttatggg gctgcaggtc atcaccattt tctgatgct
1501 gatgatatta gaaaaacttt gaaaagattg aaggcggtgt ctaaacaagc caatgcaaac
1561 aggcaaaaag ggcagctagc tgtagaaaga gctaaacaag tagaagagtt cctgcagcga
1621 aaacgggaag ctatgcagaa taaagctcga gccgaaggac atatggttta tctggcaaga
1681 ctgaggcaaa taagactaca gaatttcaat gagcgccaac agattaaagc caaacttctg
1741 ggtgaaaaag aagaagctaa tcatctgaa ggacaagaag gaagtgaaga ggctgacatg
1801 aggcgcaaaa aatcgaatc actgaaggcc catgcaaatg cacgtgctgc tgtactaaaa
1861 gaacaactag aacgaaagag aaaggaggct tatgagagag aaaaaaagt gtgggaagag
1921 catttggtgg ctaaaggagt taagagttct gatgtttctc cacctttggg acagcatgaa
1981 acaggtggct ctccatcaaa gcaacagatg agatctgta ttictgtaac ttcagctttg
2041 aaagaagttg gcgtggacag tagtttaact gataccggg aaacttcaga agagatgcaa
2101 aagaccaaca atgctatttc aagtaagcga gaaatacttc gtagattaaa tgaaaatctt
2161 aaagctcaag aagatgaaaa aggaaagcag aatctctctg atacttttga gataaatggt
2221 catgaagatg ccaaagagca tgaaaaagaa aatcagttt catctgatcg caagaagtgg
2281 gaggcaggag gtcaacttgt gattcctctg gatgagttaa cactagatac atccttctct
2341 acaactgaaa gacatacagt gggagaagtt attaaattag gtcctaattg atctccaaga
2401 agagcctggg ggaaaagtcc gacagattct gttctaaaga tacttggaqa agctgaacta
2461 caacttcaga cagaactatt agaaaataca actattagaa gtgagatttc tcccgaaggg
2521 gaaaagtaca aacccttaat tactggagaa aaaaaagtac aatgtatttc acatgaaata
2581 aacccatcag ctattgttga ttctctctgt gagacaaaaa gtcccaggtt cagtgaggca
2641 totccacaga tgtcattgaa actggaagga aatttagaag aacctgatga ttggaaca
2701 gaaattctac aagagccaag tggaaacaaac aaagatgaga gcttgccatg cactattact
2761 gatgtgtgga ttagtgagga aaaagaaaca aaggaaactc agtcggcaga taggatcacc
2821 attcaggaaa atgaagtttc tgaagatgga gctctcagta ctgtggacca acttagtgac

```

FIG. 4D-1

```

2881 attcatatag agcctggaac caatgattct cagcactcta aatgtgatgt agataagtct
2941 gtgcaaccgg aaccattttt ccataagggtg gttcattctg aacacttgaa ctttagtccct
3001 caagttcaat cagttcagtg ttcaccagaa gaatcctttg catttcgatc tcactcgcac
3061 ttaccaccaa aaaataaaaa caagaattcc ttgctgattg gaacttcaac tggctctggtt
3121 gatgcaaca acccaagat gtaaggaca tgttcacttc cagatctctc aaagctgttc
3181 agaaccctta tggatgttcc caccgtagga gatgttcgtc aagacaatct tgaatatagat
3241 gaaattgaag atgaaaacat taaagaagga ccttctgatt ctgaagacat tgtgtttgaa
3301 gaaactgaca cagatttaca agagctgcag gctcctgatg aacagttact tagggaacaa
3361 cctggatgag aatcacgtga agaagaagag tcagtcttga agaacagtga tgtggagcca
3421 actgcaaatg ggacagatgt ggacagatga gatgacaatc ccagcagtga aagtgcctg
3481 aacgaagaat ggcactcaga taacagtgat ggtgaaattg ctagtgaatg tgaatgcgat
3541 agtgtcttta accatttaga ggaactgaga ttcatctgg agcaggaaat gggctttgaa
3601 aaattctttg aggtttatga gaaaataaag gctattcatg aagatgaaga tgaaaatatt
3661 gaaatttgtt caaaaatagt tcaaaaatatt ttgggaaatg aacatcagca tctttatgcc
3721 aagattcttc atttagtcat ggcagatgga gcctaccaag aagataatga tgaataa
    
```

FIG. 4D-2

ADN de PLK1 humana:

```

1 atgagtgctg cagtgactgc agggaagctg gcacgggcac cggccgacc tgggaaagcc
61 ggggtccccg gagttgcagc tcccggagct cggcggcgg ctcccaggc gaaagagatc
121 cgggaggtcc tagtggacc acgcagccgg cggcgtatg tgcggggccg ctttttgggc
181 aagggcggct ttgccaagtg cttcgagatc tcggacgcgg acaccaagga ggtgttcgcg
241 ggcaagattg tgcctaagtc tctgctgctc aagccgcacc agagggagaa gatgtccatg
301 gaaatatcca ttcaccgcag cctcgcacc cagcacgtcg taggattcca cggctttttc
361 gaggacaacg acttcgtgtt cgtggtgttg gagctctgcc gccggaggtc tctcctggag
421 ctgcacaaga ggaggaaagc cctgactgag cctgaggccc gatactacct acggcaaat
481 gtgcttggct gccagtacct gcaaccgaaac cgagttatc atcgagacct caagctgggc
541 aaccttttcc tgaatgaaga tctggaggtg aaaatagggg attttggact ggcaaccaa
601 gtcgaatatg acggggagag gaagaagacc ctgtgtggga ctctaatta catagctccc
661 gaggtgctga gcaagaaag gcacagtttc gaggtggatg tgtggtccat tgggtgtatc
721 atgtatacct tgttagtggg caaaccacct tttgagactt cttgcctaaa agagacctac
781 ctccggatca agaagaatga atacagtatt cccaagcaca tcaaccctgt ggccgcctcc
841 ctcatccaga agatgcttca gacagatccc actgcccgcc caaccattaa cgagctgctt
901 aatgacgagt tctttacttc tggctatata cctgcccgtc tccccatcac ctgctgacc
961 attccaacaa ggttttcgat tgcctccagc agcctggacc ccagcaaccg gaagcccctc
1021 acagtcccca ataaaggctt ggagaacccc ctgcctgagc gtccccggga aaaagaagaa
1081 ccagtggttc gagagacag tggagtggtc gactgccacc tcagtacat gctgcagcag
1141 ctgcacagt tcaatgcctc caagcccctc gagcgtgggc tggtcaggca agaggaggct
1201 gaggatcctg cctgcattcc catctctctg gtcagcaagt ggggtggacta ttcggacaag
1261 tacggccttg ggtatcagct ctgtgataac agcgtggggg tgccttcaa tgactcaaca
1321 cgcctcatcc tctacaatga tggtgacagc ctgcagtaca tagagcgtga cggcactgag
1381 tctacctca ccgtgagttc ccatcccaac tcttgatga agaagatcac cctcctaaa
1441 tatttccgca attacatgag cgagcacttg ctgaaggcag gtgccacat cacgcgcgc
1501 gaaggtgatg agctcggccg gctgccctac ctacggacct ggttccgcac ccgcagcgc
1561 atcatcctgc acctcagcaa cggcagcgtg cagatcaact tcttccagga tcacaccaag
1621 etcatcttgt gccactgat ggcagccgtg acctacatcg acgagaagcg ggacttccgc
1681 acataccgcc tgagtctcct ggagggagtac ggctgctgca aggagctggc cagccggctc
1741 cgctacgcc gcactatggt ggacaagctg ctgagctcac gctcggccag caaccgtctc
1801 aaggcctcct aa
    
```

FIG. 4E

ADN de PRKAR1A de ratón:

```

1   atggagtcctg gcagtagcgc cgccagtgag gaggcacgca gccttcgaga atgtgagctc
61  tacgtccaga agcataacat tcaagcgcctg ctcaaagatt ctattgtgca gttgtgcact
121 gctcgacctg agagacctat ggcattcctc agggaatact ttgagaggtt ggagaaggag
181 gaggcaaac agattcagaa tctgcagaaa gcaggcactc gtacagactc aaggaggat
241 gagatttctc ctctccacc caaccagtg gttaaaggta ggaggcgacg aggtgctatc
301 agcgctgagg tctacacgga ggaagatgcg gcatcctatg tttagaaagg tataccaaaa
361 gattacaaga caatggccgc tttagccaaa gccattgaaa agaattgtgct gttttcacat
421 cttgatgata atgagagaag tgatattttt gatgccatgt tttcggctc ctttatcgca
481 ggagagactg tgattcagca aggtgatgaa ggggataact tctatgtgat tgatcaagga
541 gagacggatg tctatgttaa caatgaatgg gcaaccagtg ttggggaagg agggagcttt
601 ggagaacttg ctttgattta tggaaacacc agagcagcca ctgtcaaagc aaagacaaat
661 gtgaaattgt ggggcatcga ccgagacagc tatagaagaa tcctcatggg aagcacactg
721 agaaagcgga agatgtatga ggaattcctt agtaaagtct ctattttaga gtctctggac
781 aagtgggaac gtcttacggg agctgatgca ttggaaccag tgcagtttga agatgggcag
841 aagattgtgg tgcagggaga accaggggat gagtcttca ttattttaga ggggtcagct
901 gctgtgctac aacgtcggtc agaaaatgaa gagtgtgtg aagtgggaag attggggcct
961 tctgattatt ttggtgaaat tgcactactg atgaatcgtc ctctgtctgc cacagttgtt
1021 gctcgtggcc ccttgaagtg cgttaagctg gaccgacctg gatttgaacg tgttcttggc
1081 ccatgctcag acatcctcaa acgaaacatc cagcagtaca acagttttgt gtcactgtct
1141 gtctga

```

FIG. 4F

ADN de PRKRA humana:

```

1   atgtcccaga gcaggcaccg cgccgaggcc ccgcccctgg agcgcgagga cagtgggacc
61  ttcagtttgg ggaagatgat aacagctaag ccagggaaaa caccgattca ggtattacac
121 gaatacggca tgaagaccaa gaacatccca gtttatgaat gtgaaagatc tgatgtgcaa
181 atacaogtgc ccactttcac ctccagagta accgttggtg acataacctg cacaggtgaa
241 ggtacaagta agaagctggc gaaacataga gctgcagagg ctgccataaa cattttgaaa
301 gccaatgcaa gtatttgett tgcagttcct gaocccataa tgccagacc ttccaagcaa
361 ccaaagaacc agcttaatcc tattgggtca ttacaggaat tggctatcca tcatggctgg
421 agacttctct aatataacct ttcccaggag ggaggacctg ctcataagag agaataact
481 acaatttgca ggctagagtc atttatggaa actggaaagg gggcatcaaa aaagcaagcc
541 aaaaggaatg ctgctgagaa atttcttgc aaatttagta atatttctcc agagaaccac
601 atttctttaa caaatgtagt aggacattct ttaggatgta cttggcattc cttgaggaat
661 tctctctggtg aaaagatcaa cttactgaaa agaagcctcc ttagtattcc aaatacagat
721 tacatccagc tgcttagtga aattgccaa gaaacaagg tttaatataac atatttggat
781 atagatgaac tgagcgccaa tggacaatat caatgtcttg ctgaactgtc caccagcccc
841 atcacagtct gtcattggctc cggtatctcc tgtggcaatg cacaaagtga tgcagctcac
901 aatgotttgc agtattttaa gataatagca gaaagaaagt aa

```

FIG. 4G

ADN de TTBK2 humana:

```

1   atgcagtgcc tagcggccgc ccttaaggac gaaaccaaca tgagtggggg aggggagcag
61  gccgacatcc tgccggccaa ctacgtggtc aaggatcgct ggaaggtgct gaaaaagatc
121 gggggcgggg gctttggtga gatctacgag gccatggacc tgctgaccag ggagaatgtg
181 gccctcaagg tggagtcagc ccagcagccc aagcagggtcc tcaagatgga ggtggccgtg
241 ctcaagaagt tgcaagggaa ggaccatgtg tgcaggttca ttggctgtgg caggaacgag
301 aagtttaact atgtagtgat gcagctccag ggccggaaacc tggccgacct gcgccgtagc
361 cagccgcgag gcaccttcac gctgagcacc acattgctggc tgggcaagca gatcttgag
421 tccatcgagg ccatccactc tgtgggcttc ctgcaccgtg acatcaagcc ttcaaacttt
481 gccatgggca ggctgccttc cacctacagg aagtgcataa tgctggactt cgggctggcc
541 cggcagtaca ccaacaccac gggggatgtg cggccccctc ggaatgtggc cgggtttcga
601 ggaacggttc gctatgcctc agtcaatgcc cacaagaacc gggagatggg ccgccacgac
661 gacctgtggt cctcttcta catgctgggtg gagtttgcag tggccagctc gccctggagg
721 aagatcaagg acaaggaaca ggtagggatg atcaaggaga agtatgagca ccgatgtctg
781 ctgaagcaca tgccgtcaga gttccacctc ttctggacc acattgccag cctcgactac
841 ttaccaagc ccgactacca gttgatcatg tcagtgtttg agaacagcat gaaggagagg
901 ggcattgccg agaatgaggc cttigactgg gagaaggcag gcaccgatgc cctcctgccc
961 acgagcacct ctaccccgcc ccagcagaac acccggcaga cggcagccat gttgggggtg
1021 gtcaatgtga cgccagtgcc tggggacctg ctccgggaga acaccgagga tgtgctacag
1081 ggagagcacc tgagtgacca ggagaatgca cccccaatc tggccgggag gccctctgag
1141 gggctgggce ccagtcccca ccttgcccc caccocgggg gtccctgaggc tgaagtctgg
1201 gaggagacag atgtcaaccg gaacaaactc cggatcaaca tcggcaaaag ccctctgtgtg
1261 gaggaggaac agagccgagg catgggggtc ccagctccc cagtgcgtgc cccccagac
1321 tccccacaa cccagctccg ttctctgccc taccggaggg tgaacagccc tgagtcagaa
1381 aggtcttcca cggcggacgg gcgagtggag ctacctgaga ggaggtcacg gatggatctg
1441 cctggctcgc cctcgcgcca ggcctgctcc tctcagccag ccagatgct gtcagtggac
1501 acaggccacg ctgaccgaca ggccagtggc cgcattggagc tgcagcctc tgtggagcag
1561 gaggccctga gcaacgcctt ccgctcgggtg ccgctggctg aggaggagga ttctgacagc
1621 aaagagtggg tcatcatcga caaggagacg gagctcaagg acttccctcc aggggctyag
1681 cccagcacat cgggcaccac ggatgaggag ccgaggagc tgcggccact gcccgaggag
1741 ggcgaagagc ggcggcggct gggggcagag cccaocgtcc ggcgccgggg acgcagcatg
1801 caggccttgg cggaggagga cctgcagcat ttgcccctcc agccccctgc accccagctg
1861 agccagggcg atggccgttc cgagacgtca cagcccccca cgccctggcag cccttcccac
1921 tcaccctgc actcgggacc ccgcccctcga cggagagagt cggaccccac aggccacag
1981 agacaggtgt tctccgtggc gccccattt gaggtgaatg gcctcccacg agctgtgctt
2041 ctgagtctgc cctaccagga ctcaaaaaga gacctctccg attaccgaga acgggcgagg
2101 ttgctcaaca gggctccggag ggtgggcttc tgcacatgc tgctcaccac ccccaggtc
2161 cactggctc ctgttcagcc tcaggctaata ggaaggagg aagaggagga ggaggaggaa
2221 gatgaggaag aggaagaaga ggatgaggaa gaagaagagg aggaagagga agaggaggag
2281 gaagaagagg aggaggagga agaggaggag gaggctgcag cggcagttgc cttgggggag
2341 gtgctggggc ctctagtgg ctccagcagt gaggggagtg agaggagcac tgaccggagc
2401 caggagggtg ccccgctcac gctgctggca gacgatcaga aggagtccag gggccgggcc
2461 tccatggcgg atggggacct ggagcctgag gagggtcca aaacgctggt gcttgtctct
2521 cctggcgaca tgaagaagtc gcccgctact gccgaactgg cccccagacc cgacctgggc
2581 accctggctg cctcactcc tcagcatgag cggccccagc ccacgggcag ccagctggac
2641 gtatctgagc caggcaccct gtctctgttc ctcaagtctg agcccaagcc cccggggcct
2701 ggggcagggc tgggggcccg gacagtgacc acaggggtcg gggcggtggc agtcacctcc
2761 tcacccttca ccaaagttga gaggacctt gtgcacattg cggagaaaac ccacctcaac

```

FIG. 4H-1

```

2821 gfcattgttt cccgtggaca agccttgccg tctgaggagt tcagccttgg gggcgagctg
2881 ggtctggagc tggcctctga tggggggcgt gtggaggagg gggcccagac gcccttggag
2941 aacggcctcg cctgttcagg gctgaatggg gctgagatag agggctctgc cctgtctggg
3001 gccccccggg aaacccccctc agagatggcc acaaaactcac tgcccattgg cccggccctt
3061 gcagacgggc cagccccggg gtccccgctg gagccaagcc ctgagaaagt ggcaccatc
3121 tccccagac gccatgctat gccaggctct cggcccagga gccgtatccc tgtcctgctc
3181 tctgaggagg acacgggctc ggagccctca ggctcactgt cggccaaaga gcggtggagc
3241 aagcgggctc ggccgcagca ggacctggcg cggctggtga tggagaagag gcagggccgc
3301 ctgctgttgc ggttggcctc aggggcctcg tctcctcca gtgaggagca gcgccgtgcc
3361 tctgagacc cctcaggcac gggtcttgag gaggacagc ccgctctga gccggcagc
3421 gccctgccc ggaagagcgg gagggcagcc gccaccagga gccggattcc ccgcccatt
3481 ggctccgca tgcccatgcc tgttgagcc cagcagccc ccagcagatc ccattggcgc
3541 gcccagcat tggacacagc catcaccagc aggtccagc tgcagagcc cccagggctg
3601 gccactgctg ctgacctccg ccccaaaaaa cctcctggcc gggccttggg cccagggcga
3661 gcccagccg gagccaggcc cccagcggcg cgcagcccgc gccctcccgc gtccacatcc
3721 gccgcccga atgccagcgc gtccccccgg agccagtccc tgtcccagc agagagcccc
3781 tccccctgc accaggcccg gcccggggtc ccccccccc ggggcgtccc gccggcccgg
3841 gccagcctg atggcaccct cccccccgg ggtccaaga aaggaccagc agggaaactc
3901 caggctcagc gcgcaacaac caaaggcccg gcaggaggcg cggaggcccg ggctggggcc
3961 agataa

```

FIG. 4H-2

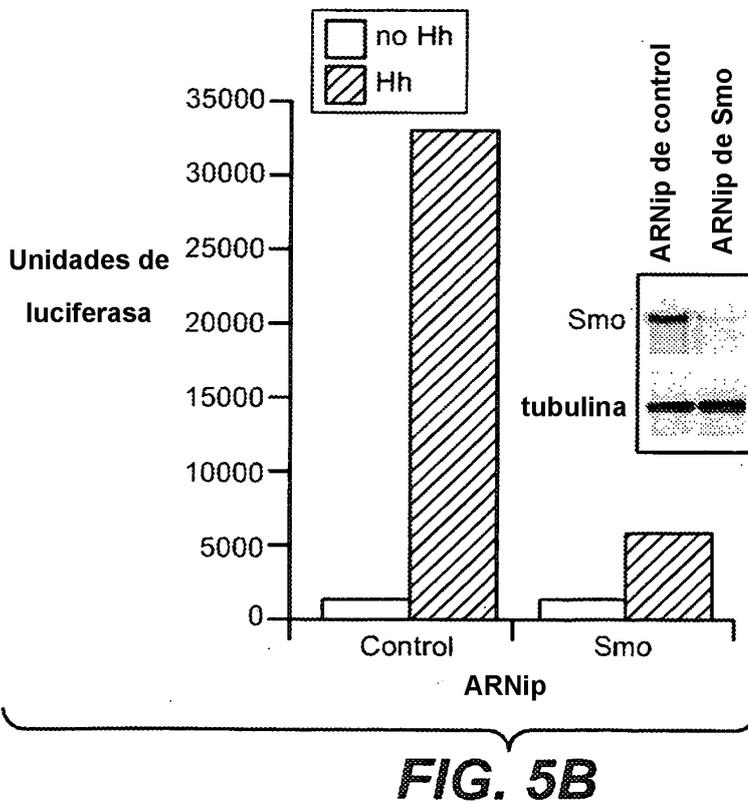
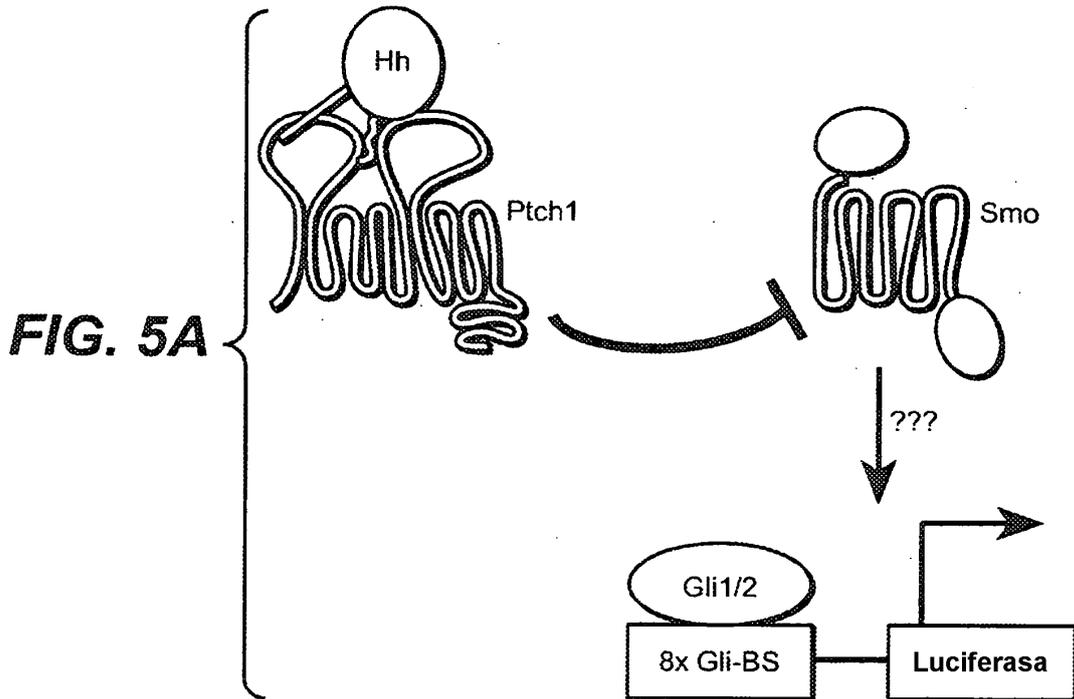
ADN de NEK1 humana:

```

1   atggaatccg aggatttaag tggcagagaa ttgacaattg attccataat gaacaaagtg
61  agagacatta aaaataagtt taaaaatgaa gaccttactg atgaactaag cttgaataaa
121 atttctgctg atactacaga taactcggga actgttaacc aaattatgat gatggcaaac
181 aaccagaggg actggttgag tttggtgctc aaactagaga aaaacagtggt tccgctaagt
241 gatgctcttt taaataaatt gattggctgt tacagtcaag caattgaagc gcttccccca
301 gataaataig gccaaaatga gagttttgct agaattcaag tgagatttgc tgaattaaaa
361 gctattcaag agccagatga tgcacgtgac tactttcaaa tggccagagc aaactgcaag
421 aaatttgctt ttgttcatac atcttttgca caatttgaac tgtcacaagg taatgtcaaa
481 aaaagtaaac aacttcttca aaaagctgta gaacgtggag cagtaccact agaaatgctg
541 gaaaattgcc tgcggaattt aaacctocaa aaaaagcagc tgccttcaga ggaggaaaag
601 aagaatttat cagcatctac ggtattaact gcccaagaat cattttccgg ttcacttggg
661 catttacaga ataggaacaa cagttgtgat tccagaggac agactactaa agccagggtt
721 ttatatggag agaacatgcc accacaagat gcagaaatag gttaccggaa ttcattgaga
781 caaactaaca aaactaaca gtcatgccc tttggaagag tcccagttaa ccttctaaat
841 agcccagatt gtgatgtgaa gacagatgat tcagttgtac cttgttttat gaaaagacaa
901 acctctagat cagaatgccg agatttgggt gtgcctggat ctaaaccaag tggaaatgat
961 tcctgtgaat taagaaattt aaagtcigtg caaaatagtc atttcaagga acctctgggtg
1021 tcagatgaaa agagttctga acttattatt actgattcaa taaccctgaa gaataaaacg
1081 gaatcaagtc ttctagctaa attagaagaa actaaagagt atcaagaacc agaggttcca
1141 gagagtaacc agaaacagtg gcaatotaag agaaagtcag agtgtattaa ccagaatcct
1201 gctgcatctt caaatcactg gcagattccg gagttagccc gaaagttaa tacagagcag
1261 aacatacca cttttgagca acctgtcttt tcagtttcaa aacagtcacc accaatatca
1321 acatctaaat ggtttgacce aaaatctatt tgtaagacac caagcagcaa taccttggat
1381 gattacatga gctgttttag aactccagtt gtaaagaatg actttccacc tgcctgtcag
1441 ttgtcaacac cttatggcca acctgcctgt tccagcagc aacagcatca aatacttggc
1501 actccacttc aaaatttaca ggttttagca tcttcttcag caaatgaatg catttccggtt
1561 aaaggaagaa tttattccat tttaaagcag ataggaagtg gaggttcaag caaggtattt
1621 caggtgttaa atgaaaagaa acagatatat gctataaaat atgtgaactt agaagaagca
1681 gataaccaaa ctcttgatag ttaccggaac gaaatagott atttgaataa actacaacaa
1741 cacagtgata agatcatccg accttatgat tatgaaatca cggaccagta catctacatg
1801 gtaatggagt gtggaaatat tgatcttaat agttggctta aaaagaaaaa atccattgat
1861 ccatgggaac gcaagagtta ctggaaaaat atgttagagg cagttcacac aatccatcaa
1921 catggcattg ttcacagtga tottaaacca gctaactttc tgatagttga tggaaatgcta
1981 aagctaattg attttgggat tgcaaaccaa atgcaaccag atacaacaag tgttgttaaa
2041 gattctcagg ttggcacagt taattatatg ccaccagaag caatcaaga tatgtcttcc
2101 tccagagaga atgggaaatc taagtcaaaag ataagcccca aaagtgatgt ttggctctta
2161 ggatgtattt tgtactatat gacttacggg aaaacaccat ttcagcagat aattaatcag
2221 atttctaaat tacatgccat aattgatcct aatcatgaaa ttgaatttcc cgatattcca
2281 gagaaagatc ttcaagatgt gttaaagtgt tgtttaaaaa gggaccctaaa acagaggata
2341 tccattcctg agctcctggc tcatccctat gttcaaattc aaactcatcc agttaacca
2401 atggccaagg gaacctga agaaatgaaa tatgttctgg gccaaactgt tggcttgaat
2461 tctcctaact ccattttgaa agctgctaaa acttttatatg aacactatag tgggtgtgaa
2521 agtcataatt cttcatcctc caagactttt gaaaaaaaaa ggggaaaaaa atga

```

FIG. 41



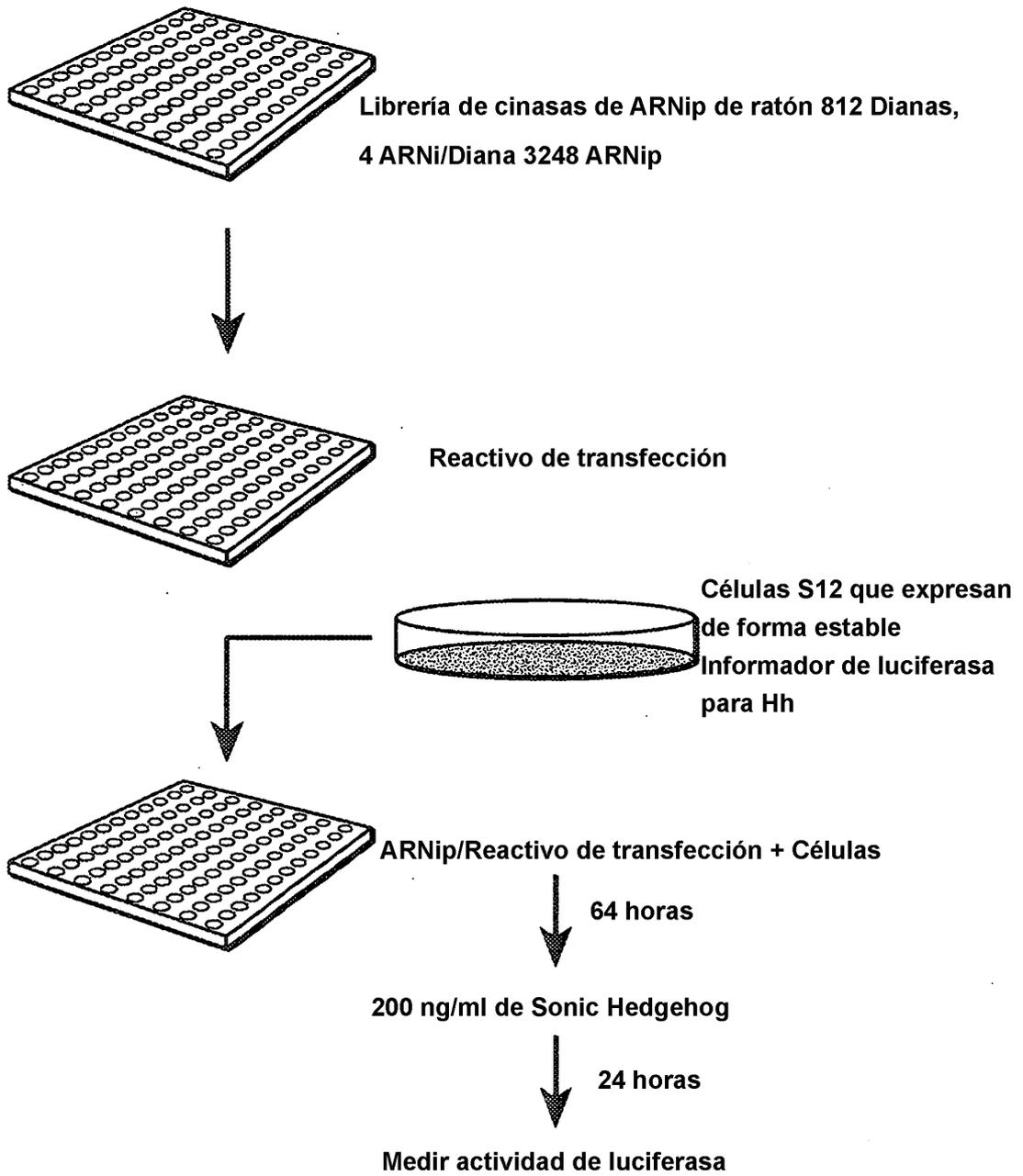


FIG. 5C

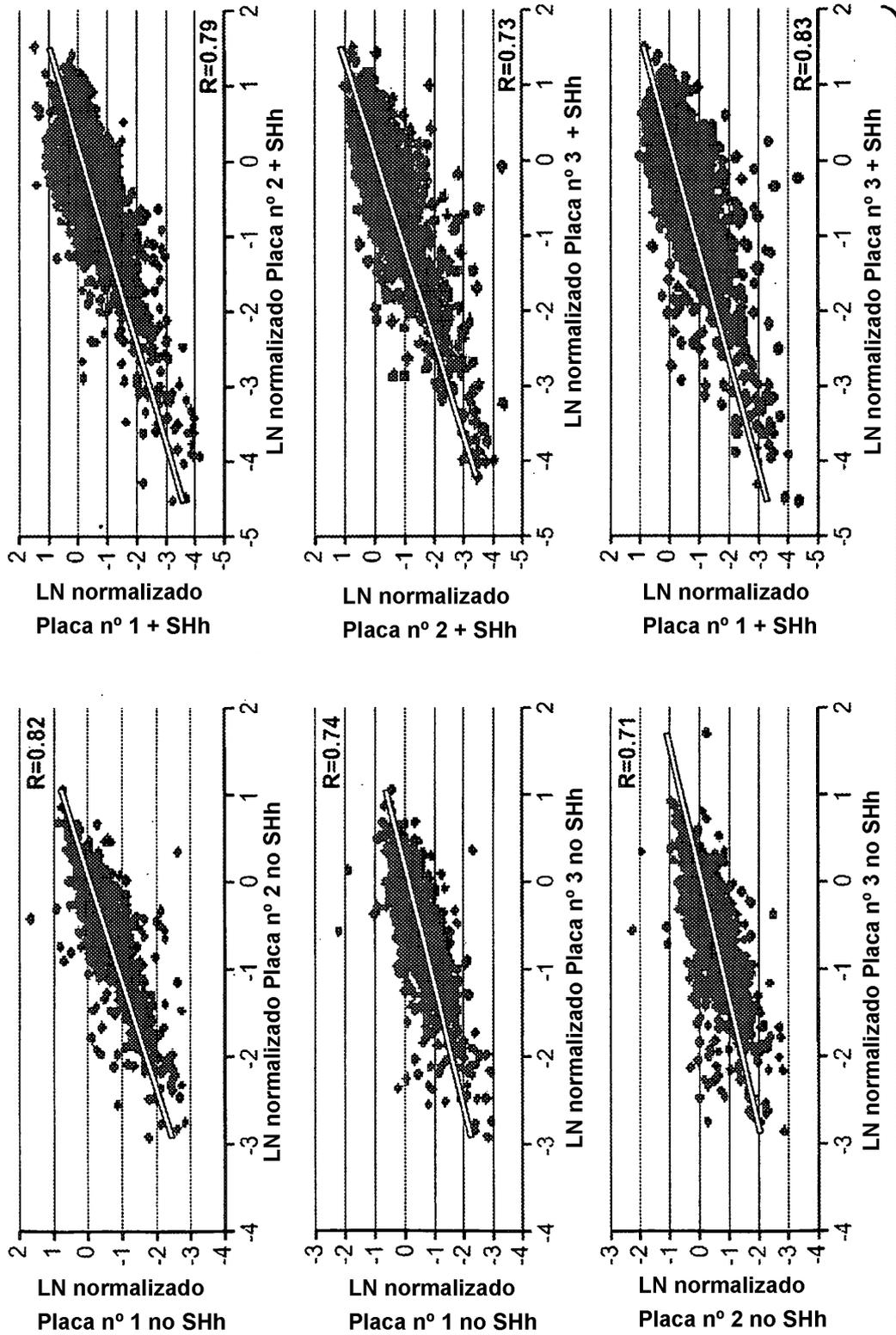


FIG. 5D

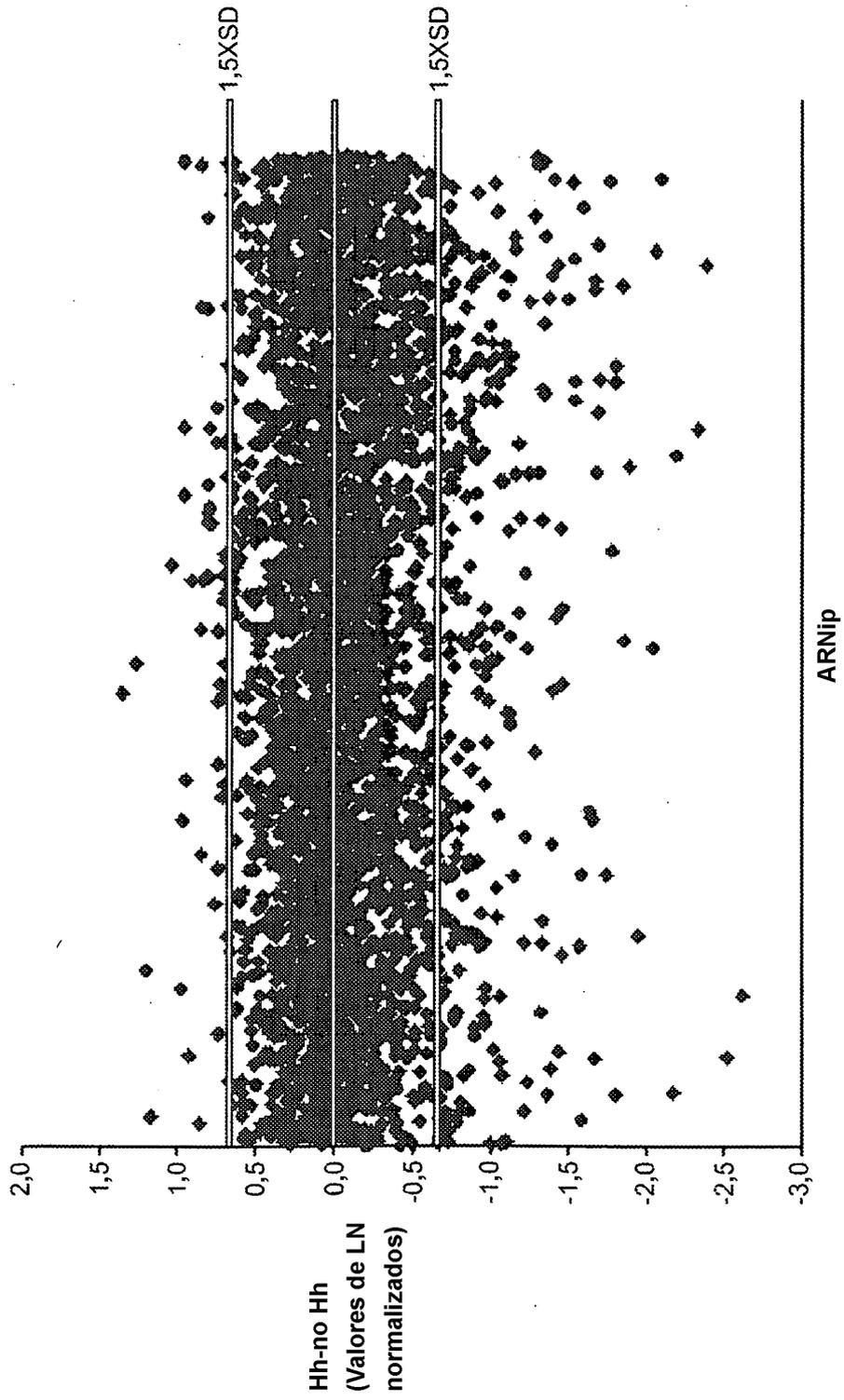


FIG. 5E

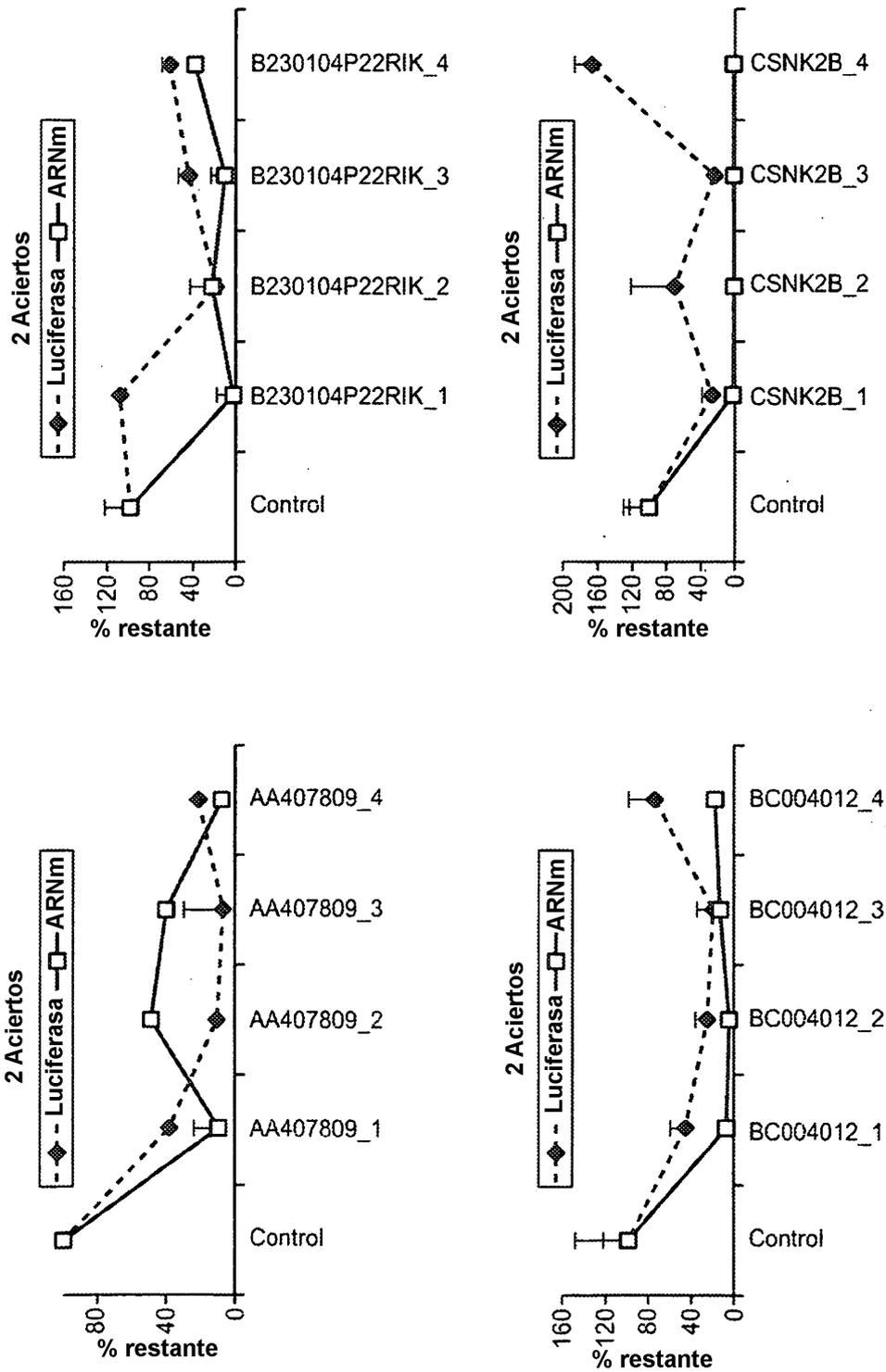


FIG. 6A-1

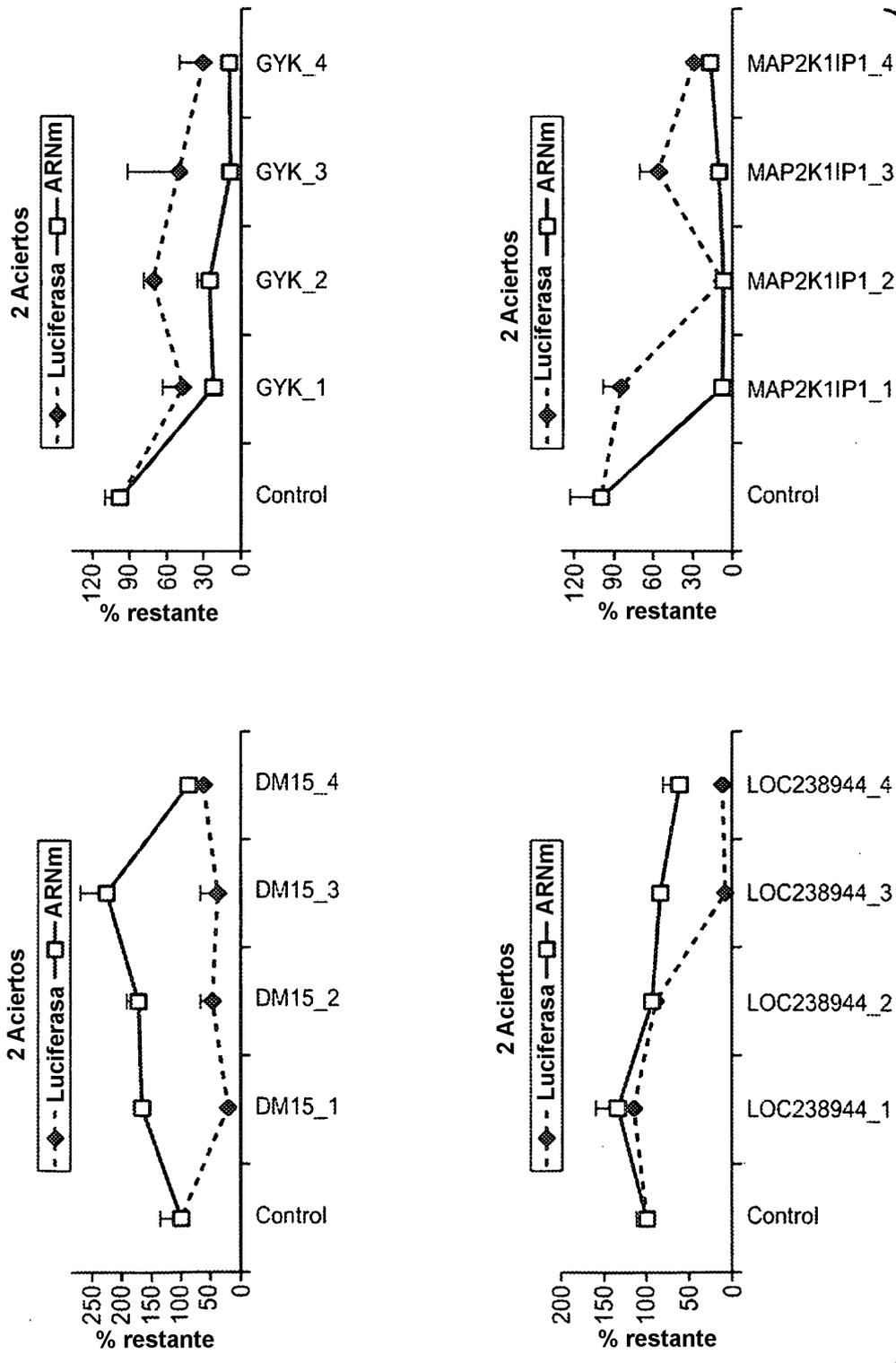


FIG. 6A-2

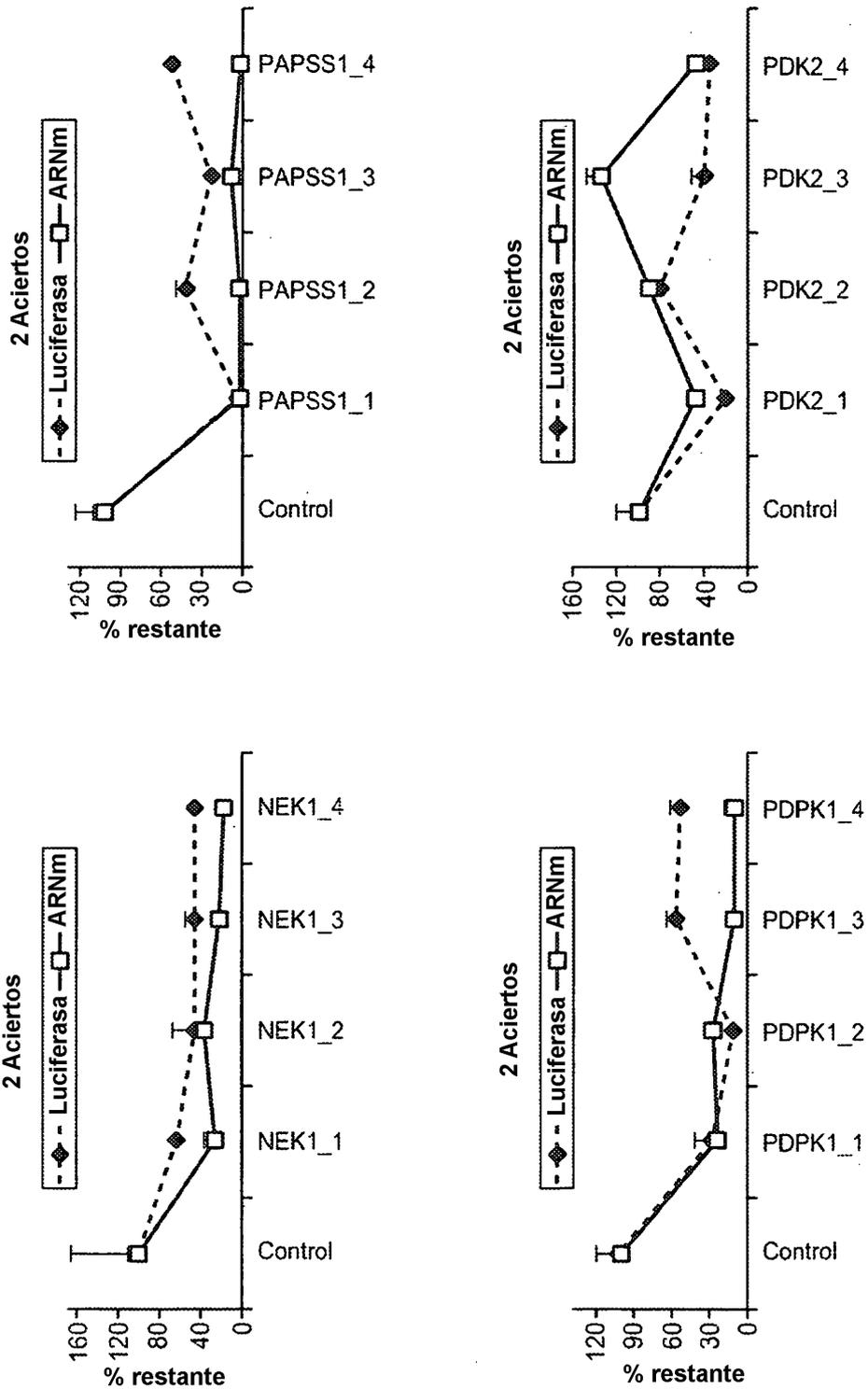


FIG. 6A-3

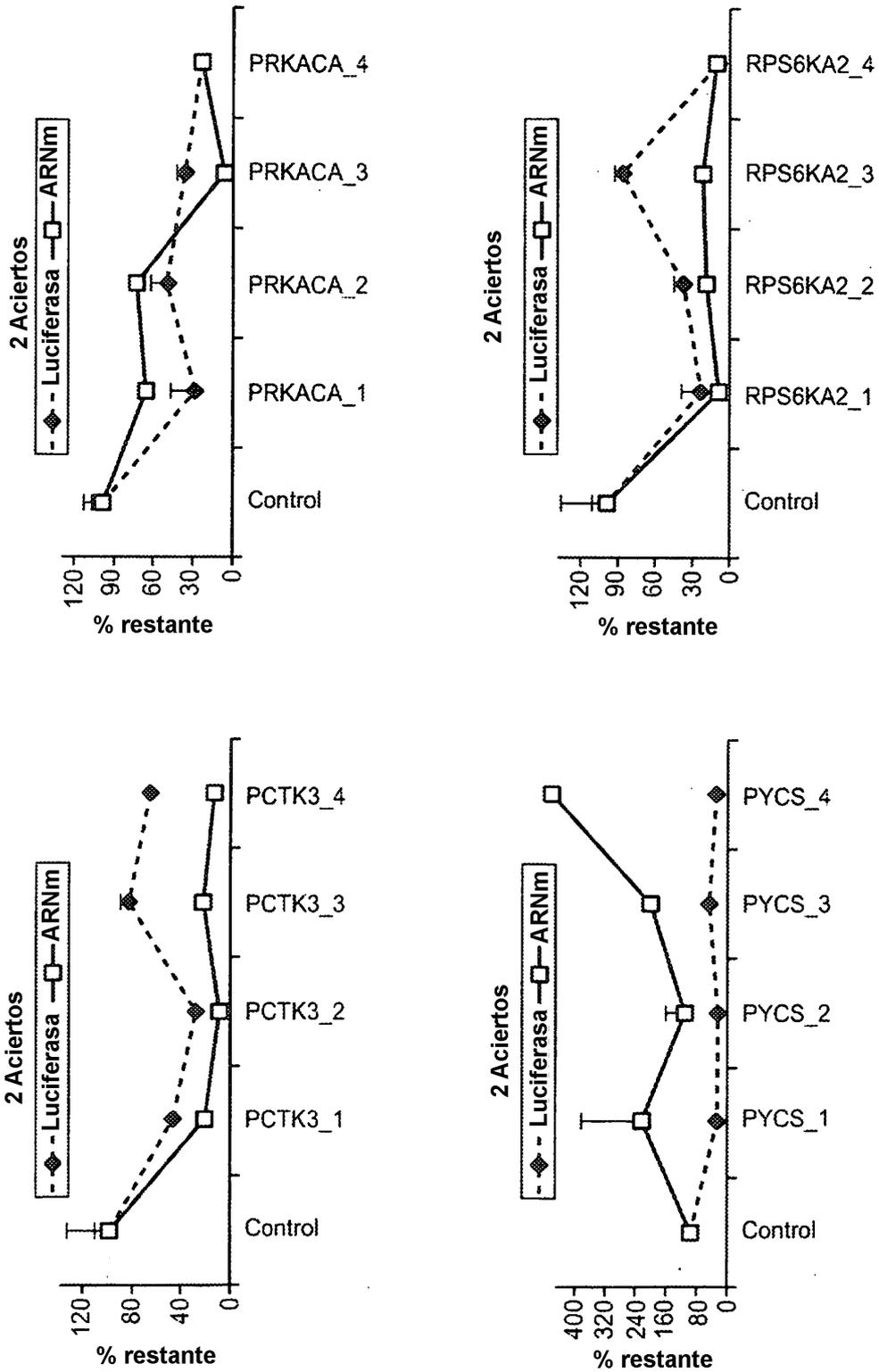


FIG. 6A-4

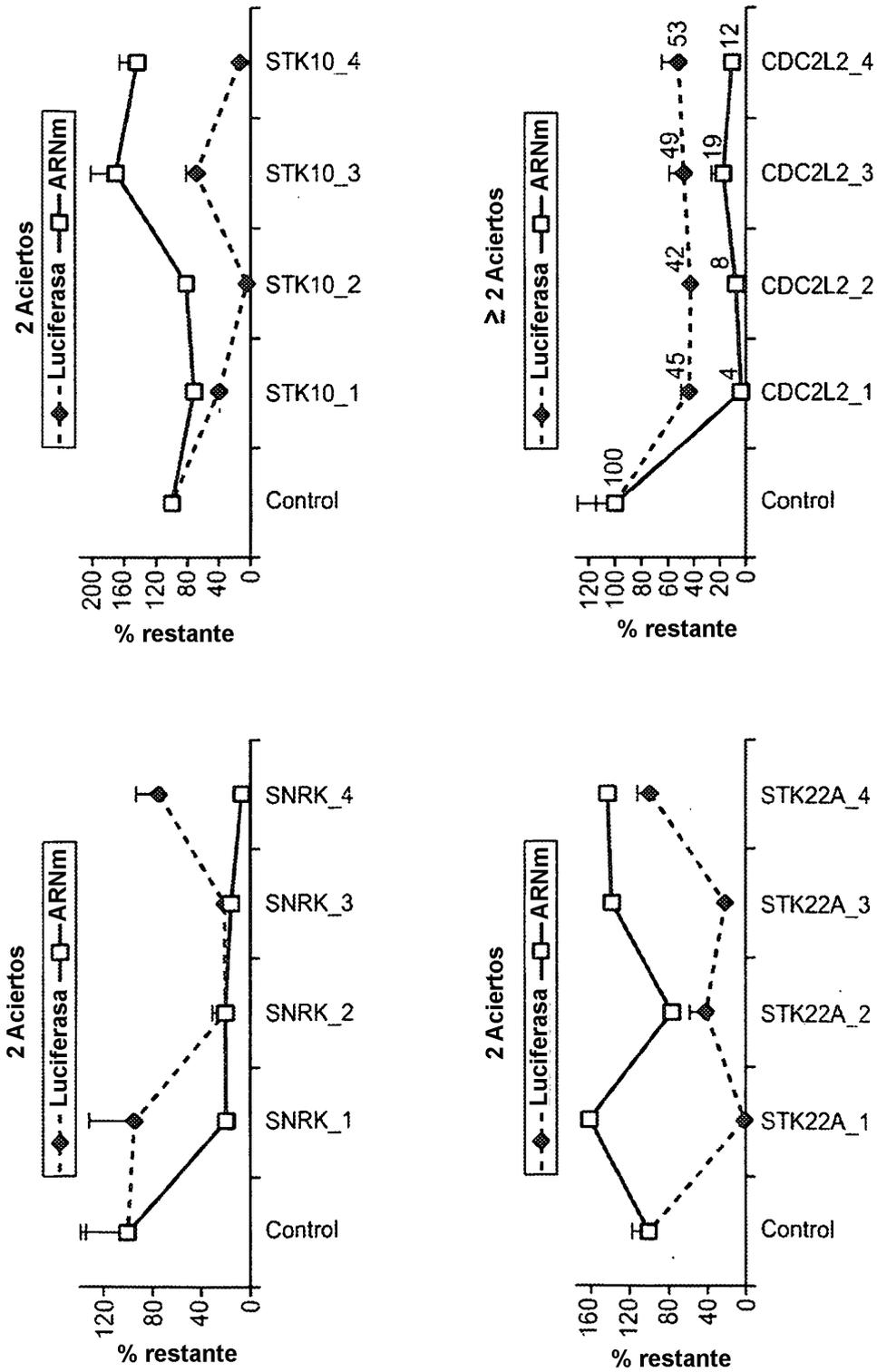


FIG. 6A-5

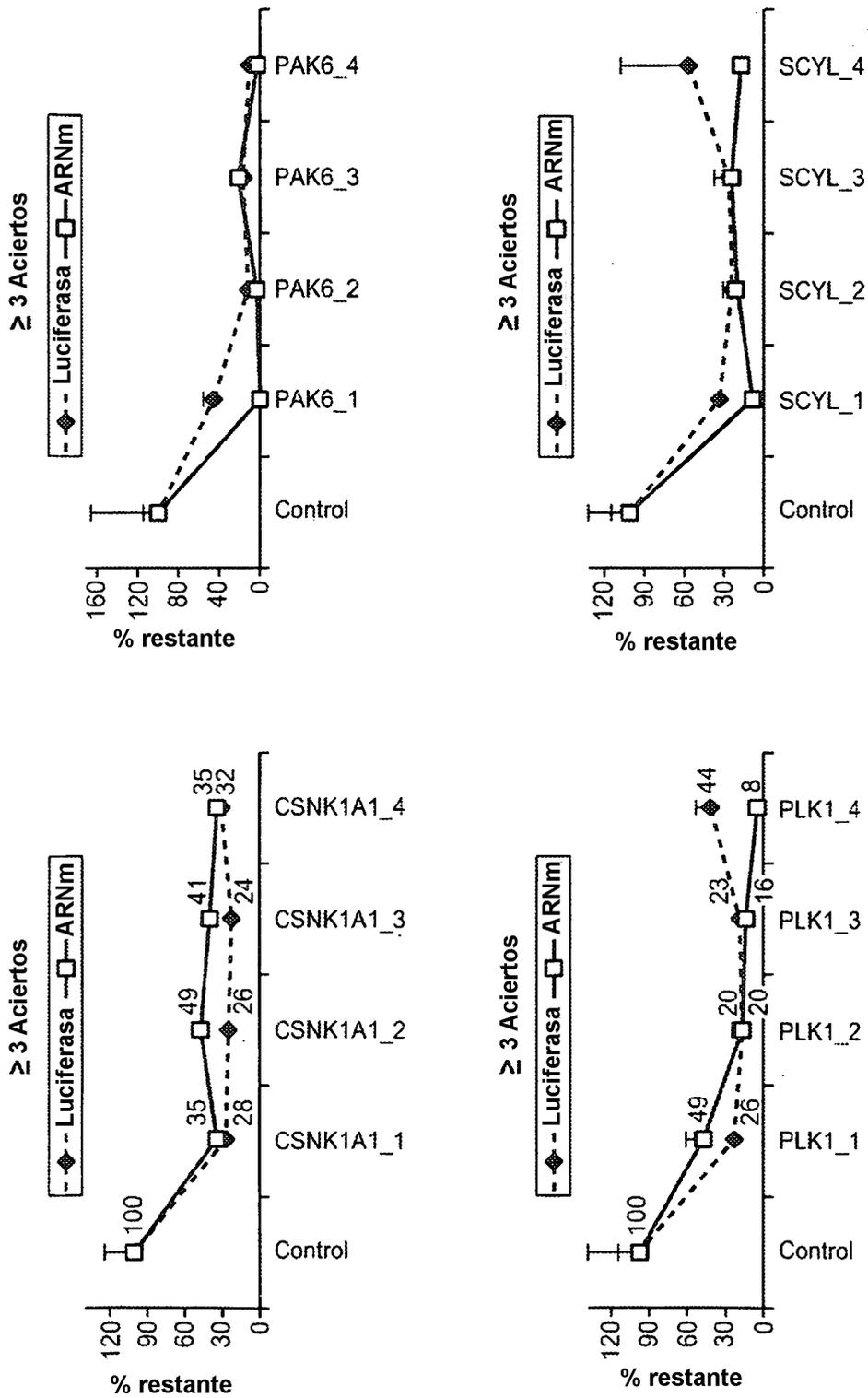


FIG. 6A-6

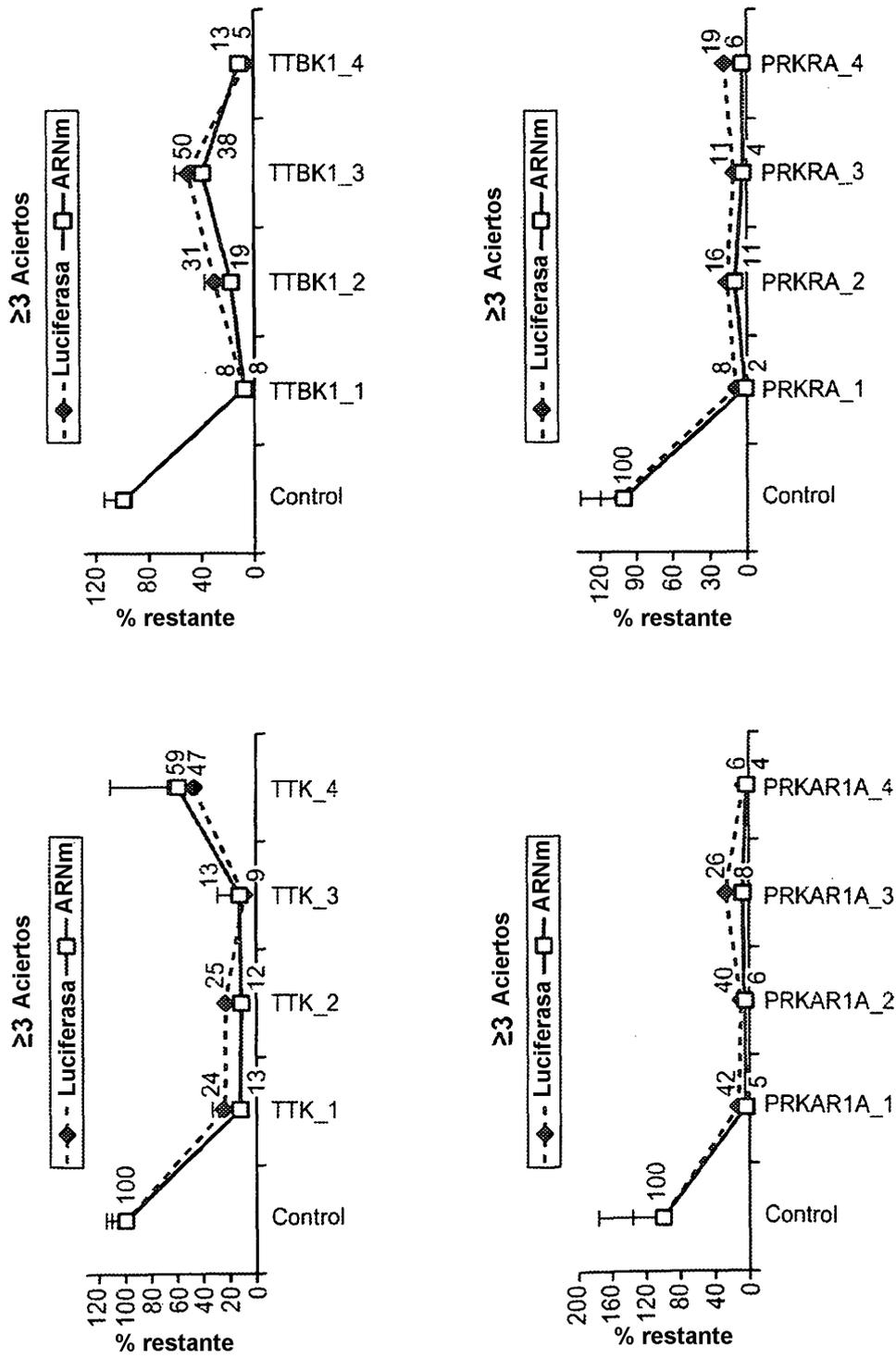
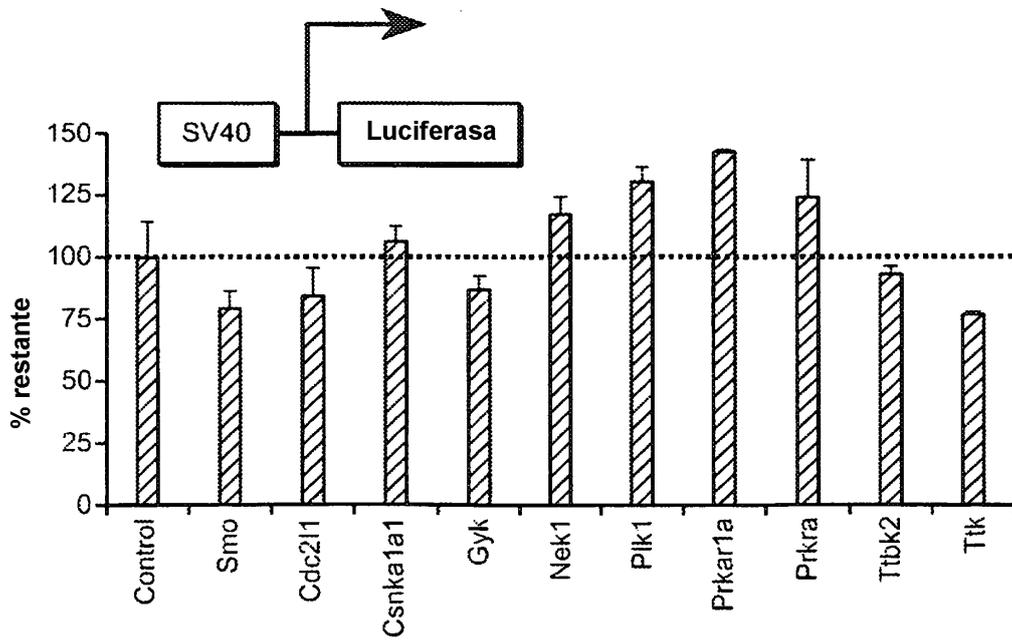
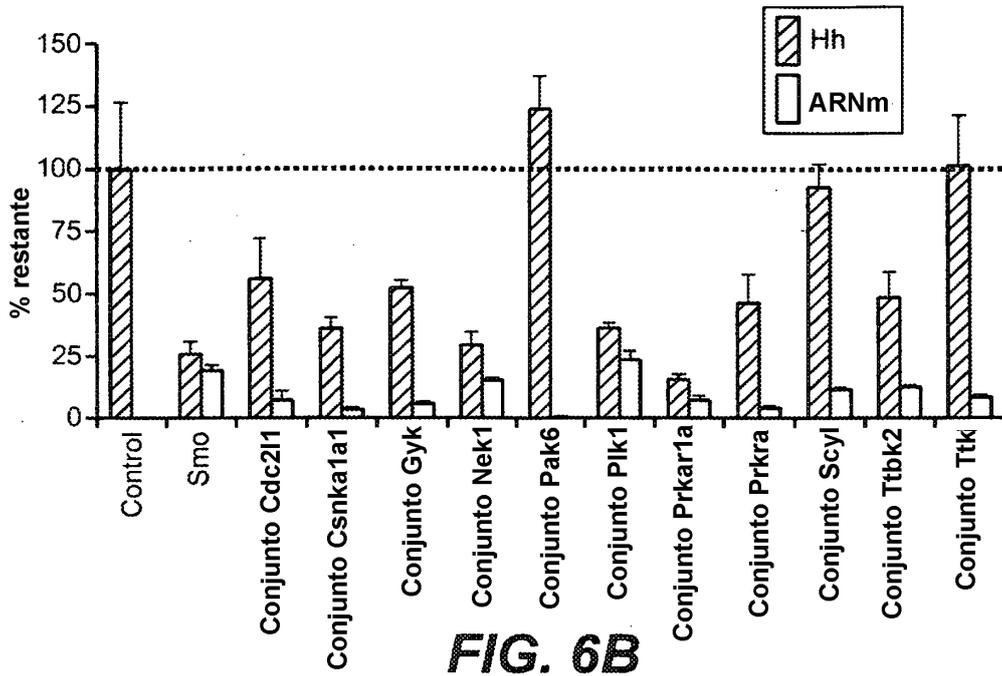


FIG. 6A-7



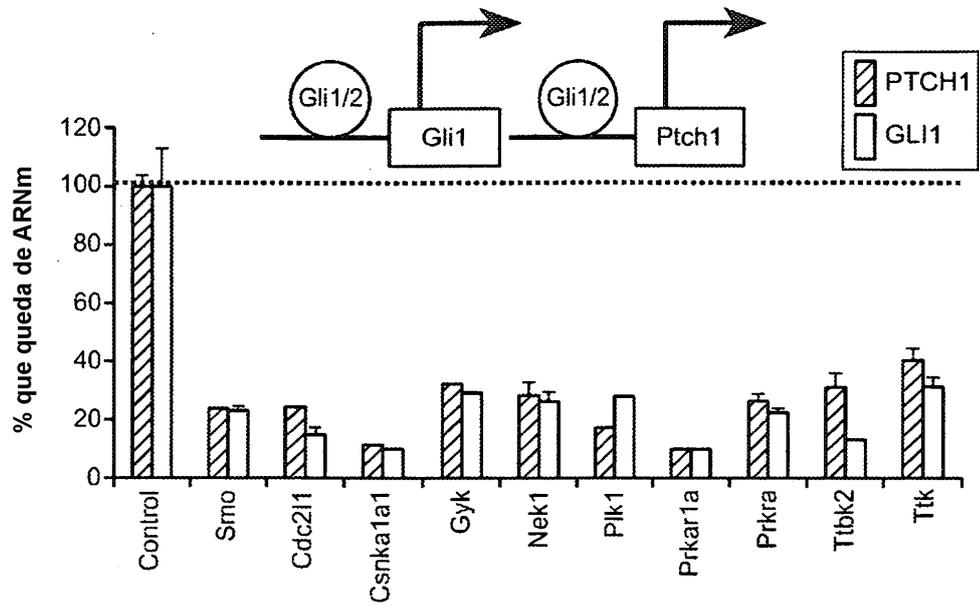


FIG. 6D

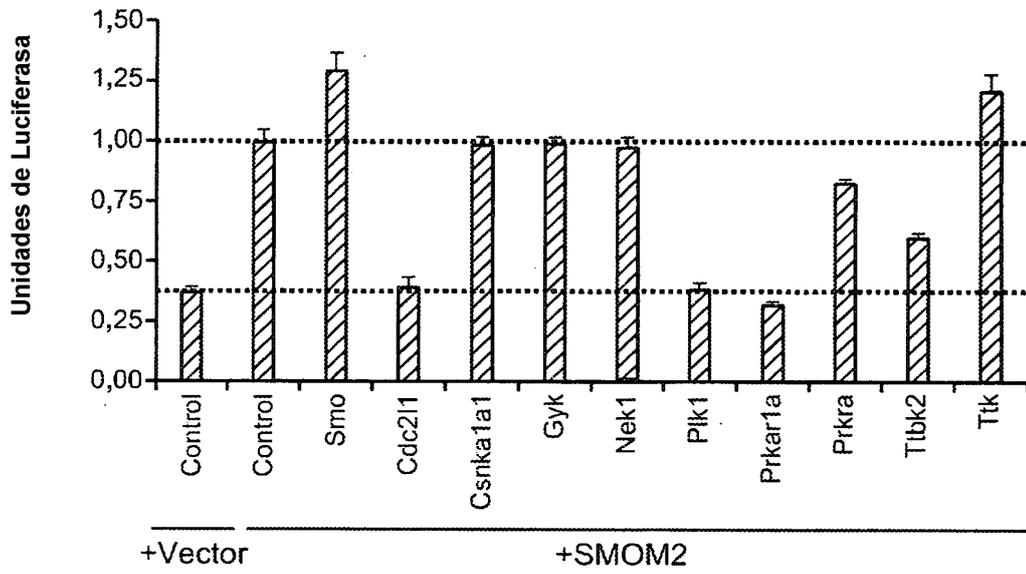


FIG. 7A

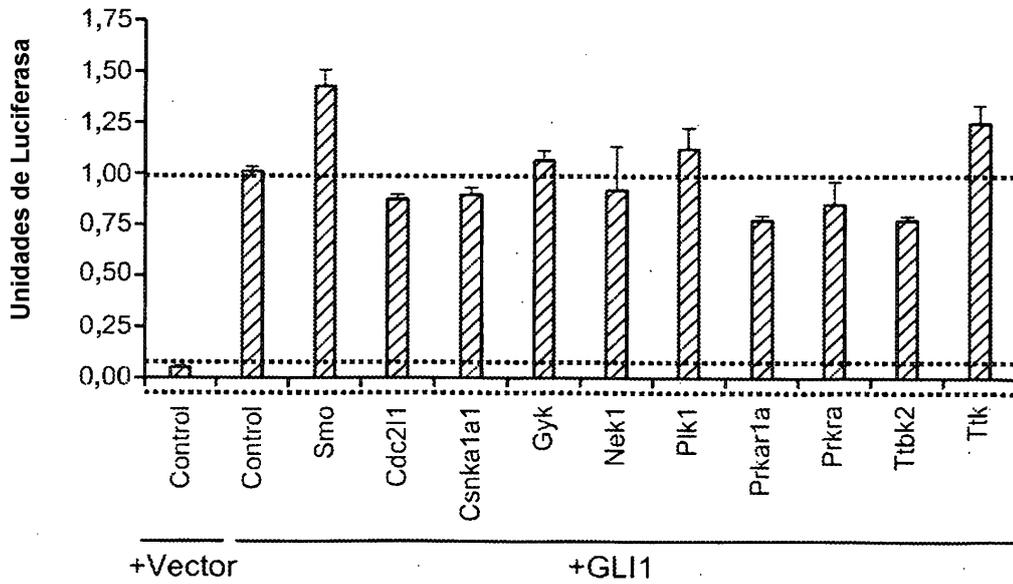


FIG. 7B

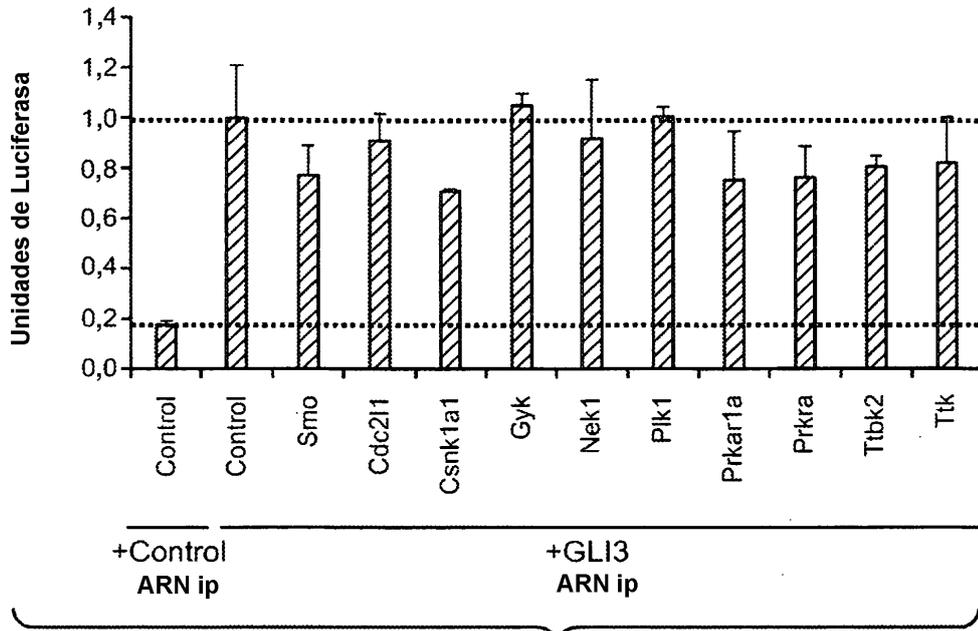


FIG. 7C

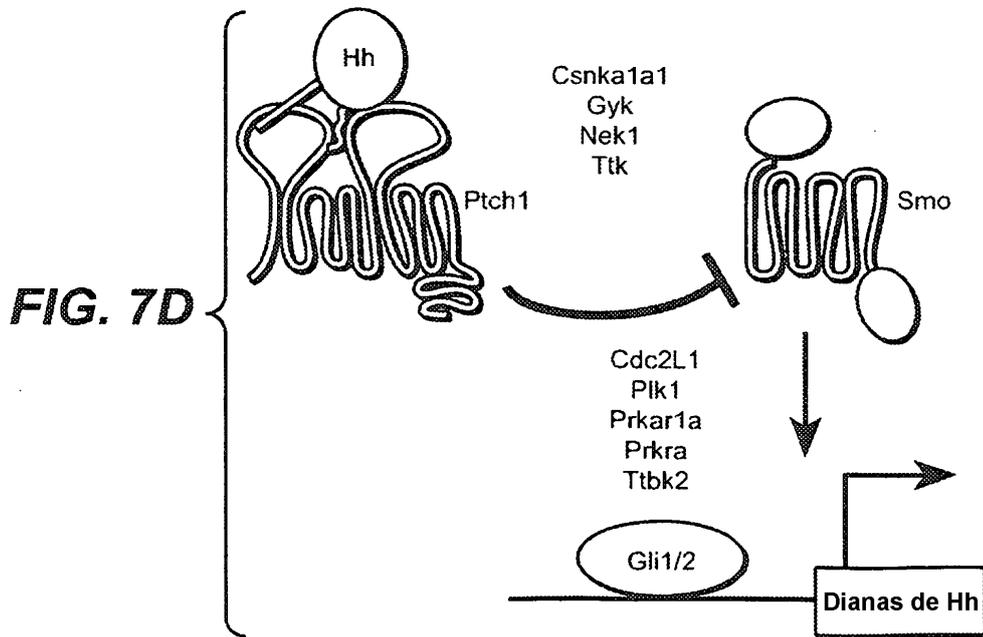


FIG. 7D

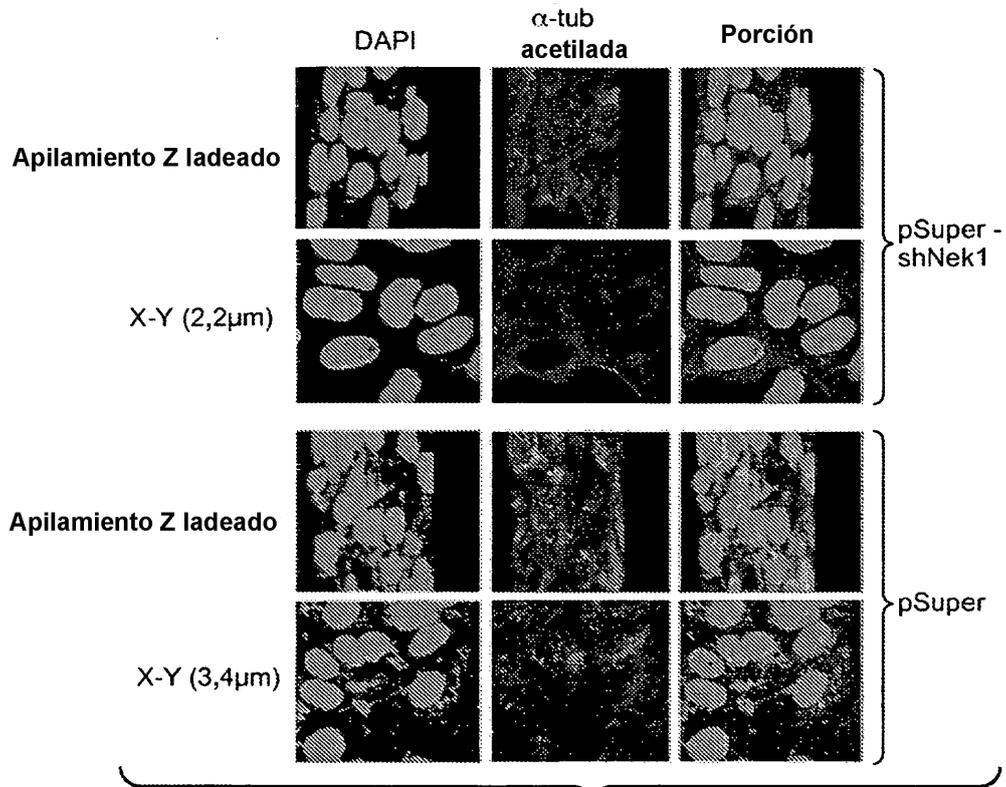


FIG. 7E

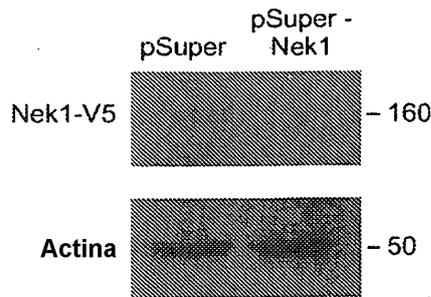


FIG. 8C

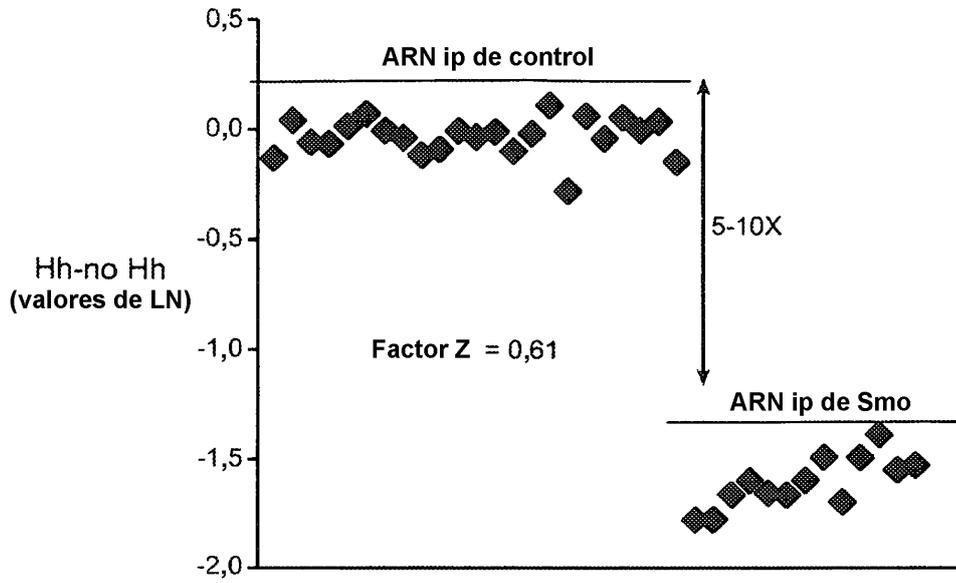


FIG. 8A

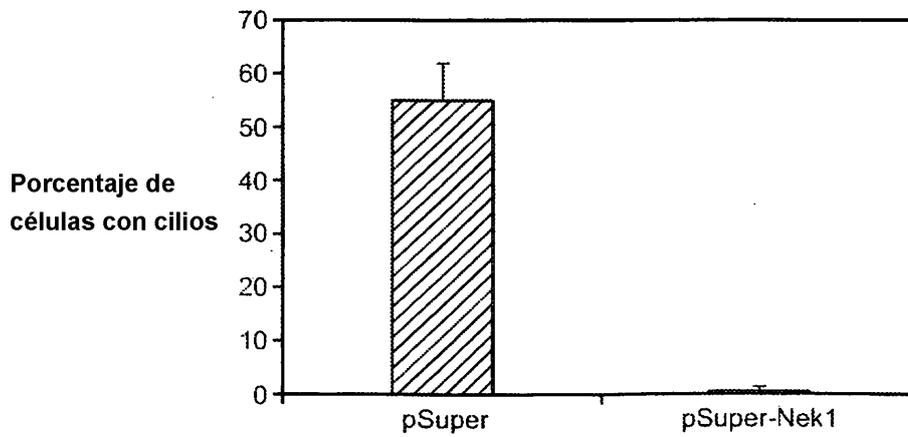


FIG. 8B