

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 400**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4355 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2001** **E 10163813 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015** **EP 2216022**

54 Título: **Uso de ciclopamina en el tratamiento de carcinoma de células basales y otros tumores**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2015

73 Titular/es:

TAS, SINAN (100.0%)
S.H. TUNCEL CADDESI NO. 36 AHMET KUDDUSI
MAHALLESİ
BOR 51700, TR

72 Inventor/es:

TAS, SINAN

74 Agente/Representante:

MIR PLAJA, Mireia

ES 2 534 400 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 ciclopamina en el tratamiento de carcinoma de células basales y otros tumores

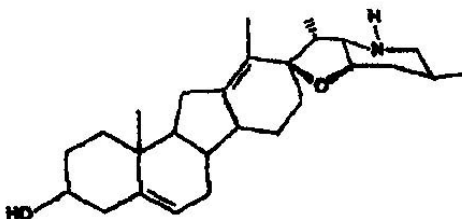
[0001] Esta exposición se refiere a la utilización *in vivo* de ciclopamina sobre carcinomas de células basales (CCBs) para alcanzar un efecto terapéutico al provocar la diferenciación de las células tumorales y, simultáneamente, la muerte apoptótica y la eliminación de estas células tumorales, aunque conservando las células normales del tejido, incluyendo las células no diferenciadas de la capa basal epidérmica normal y los folículos pilosos. La ciclopamina provoca la apoptosis mediante un mecanismo no genotóxico y, por lo tanto, de manera diferente a la radioterapia y a la mayoría de las quimioterapias para el cáncer utilizadas en la actualidad, que actúan provocando daños en el ADN. Estos efectos novedosos, que anteriormente no se habían conseguido por medio de una quimioterapia contra el cáncer, hacen que la utilización de la ciclopamina sea altamente deseable en la terapia del cáncer, en el tratamiento de CCBs y de otros tumores que utilizan la ruta de transducción de señales *hedgehog/smoothened* para la proliferación y la prevención de la apoptosis.

[0002] Esta invención reivindicada se refiere a un medicamento para ser usado en la inducción de apoptosis de células tumorales de un sujeto que tiene un carcinoma de células basales u otro tumor que usa la ruta de transducción de señales *Hedgehog/Smoothened* para la prevención de apoptosis de células tumorales, en donde el medicamento comprende ciclopamina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

[0003] El carcinoma de las células basales es un tumor epitelial común. Su incidencia se incrementa con la edad. Los tratamientos actuales para CCBs incluyen la extirpación quirúrgica del tumor junto con un margen de tejido normal y, cuando la cirugía no resulta factible o deseable, la destrucción de las células tumorales con radiación ionizante o con otros medios. Aunque las cicatrices y la desfiguración son efectos secundarios potenciales, las extirpaciones quirúrgicas que no dejan células neoplásicas tras ellas pueden proporcionar la curación. La radioterapia actúa provocando una cantidad irreparablemente elevada de daño en el ADN que, a su vez, desencadena la muerte apoptótica de las células tumorales. Este modo de acción de la radioterapia, es decir, la apoptosis secundaria a los daños en el ADN, es similar a los de muchos agentes quimioterapéuticos que se utilizan en la actualidad en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, tanto la radioterapia como las quimioterapias citotóxicas del cáncer tienen la capacidad de provocar daños en el ADN de las células normales de los pacientes además de en las células tumorales. Como resultado, su efectividad y utilidad en la terapia del cáncer se encuentran severamente limitadas. Otro dilema de la utilización de la radiación y de las quimioterapias genotóxicas contra el cáncer es el hecho inquietante de que, incluso cuando se consigue la curación del tumor primario, los pacientes presentan un riesgo notablemente superior de desarrollar cánceres nuevos debido a los daños producidos en el ADN y a las mutaciones resultantes que hayan experimentado durante el tratamiento del tumor primario. Por lo tanto, la inducción de la apoptosis de manera selectiva en células tumorales a través de medios no genotóxicos resultaría muy deseable en el campo de la terapia contra el cáncer.

[0004] Los CCBs con frecuencia presentan mutaciones inactivantes del gen *patched*, que codifica una proteína transmembrana que actúa como receptor para las proteínas *hedgehog* identificadas en primer lugar por su efecto sobre la creación de disposición espacial de los tejidos durante el desarrollo. Cuando no se encuentra unida a *hedgehog*, la proteína *patched* actúa inhibiendo la transducción intracelular de señales por parte de otra proteína transmembrana llamada *smoothened*. La unión de *hedgehog* a *patched* provoca la liberación de la inhibición. La transducción intracelular de señales por parte de la proteína *smoothened* liberada da inicio entonces a una serie de sucesos celulares que dan como resultado finalmente alteraciones de las expresiones de los genes diana *hedgehog* y del comportamiento celular. Las características generales de esta ruta *hedgehog/smoothened* de transducción de señales, identificada por primera vez en *Drosophila*, se encuentran conservadas en diversos organismos vivos, desde *Drosophila* hasta el ser humano. Sin embargo, la ruta resulta más compleja en organismos superiores (por ejemplo, el ser humano presenta más de un gen con una similitud significativa con el único gen *patched* de *Drosophila*). Se ha descubierto que las mutaciones inactivantes de *patched* provocan una señalización constitutiva (sin ligandos) a través de la ruta *hedgehog/smoothened*. En todos los CCBs se observa hiperactividad de la ruta *hedgehog/smoothened*, resultante de mutaciones de *patched* y/o de otros elementos de la ruta situados aguas abajo. El síndrome de carcinoma nevoide de células basales (SCCBN) es el resultado de la haploinsuficiencia de *patched*. Los pacientes con SCCBN, debido a la presencia de un *patched* ya mutante en todas las células, desarrollan múltiples CCBs con la edad.

[0005] La ciclopamina, un alcaloide esteroideo, presenta la fórmula química siguiente:



[0006] Se encuentra en la naturaleza en el lirio *Veratrum californicum* y puede obtenerse mediante purificación a

partir de ella y de otras fuentes. Se ha descubierto que la ciclopamina inhibe la ruta *hedgehog/smoothened* en embriones de pollo y en cultivos celulares de ratón. Por ejemplo, Taipale et al., *Nature* 2000; 406: 1005-1009 y el documento WO 01/27135 A2 describieron la inhibición selectiva de la señalización *Hedgehog/Smoothened*.

[0007] Para aplicaciones tópicas, la ciclopamina puede disolverse en etanol o en otro disolvente adecuado y mezclarse con una crema, pomada o gel base adecuados. La ciclopamina también puede encapsularse en hidrogeles o en otras formas farmacéuticas que permiten la liberación controlada y puede adsorberse en parches dérmicos. Los efectos mostrados en las Fig 1A a Fig 1D, Fig 2A a Fig 2F, Fig 3A a Fig 3G y Fig 4A a Fig 4D se han obtenido con una preparación de crema obtenida mezclando una solución de ciclopamina en etanol con una crema base de modo que se obtiene una concentración final de 18 mM de ciclopamina en la crema. La crema base utilizada está constituida principalmente por aceite pesado de parafina (10% p/p), vaselina (10% p/p), alcohol estearílico (8% p/p), polyoxysteareth-40 (3% p/p) y agua (68% p/p), aunque también pueden utilizarse otras cremas base formuladas adecuadamente. La concentración óptima de ciclopamina en una forma farmacéutica, así como la dosificación y programas de aplicación óptimos, evidentemente pueden resultar afectados por factores tales como la forma farmacéutica particular, la localización y características de la piel que contiene el tumor (por ejemplo el grosor de la epidermis) y el tamaño del tumor; sin embargo, estos factores pueden determinarse siguiendo procedimientos de optimización publicados bien conocidos. La dosificación y los programas de aplicación seguidos para los tumores mostrados en la Fig. 1A (CCB en el pliegue nasolabial, ~ 4 x 5 mm en la superficie) y en la Fig. 1C (CCB en la frente, ~ 4 x 4 mm en la superficie) son los siguientes: $10 \pm 2 \mu\text{l}$ de crema aplicada directamente sobre los CCBs con ayuda de una espátula de acero cuatro veces al día comenzando a las ~9.00 a.m., con ~3,5 horas entre aplicaciones. Las aplicaciones nocturnas, que en este programa se evitan debido a la posible pérdida de crema de la piel del paciente en las sábanas durante el sueño, pueden llevarse a cabo con parches dérmicos adecuados. La conservación de las células no diferenciadas en la epidermis normal y en folículos pilosos tras la exposición a la ciclopamina, tal como se describe en la presente invención, también proporciona información sobre las dosis tolerables en otros modos posibles de administración; por ejemplo, inyección intratumoral directa de una solución acuosa o la administración sistémica de la misma o de ciclopamina encapsulada en liposomas.

Las Fig 1A, Fig 1B, Fig 1C y Fig 1D muestran regresiones clínicas rápidas de los CCBs tras exposición a la ciclopamina. Aparte de la desaparición visual de varias áreas tumorales en menos de una semana de exposición a ciclopamina, se produce una pérdida en el aspecto típicamente translúcido de los CCBs, como se observa a partir de la comparación de la Fig 1B con la Fig 1A y de la Fig 1D con la Fig 1C.

Las Fig 2A a Fig 2F muestran aspectos microscópicos de las áreas tumorales sometidas a extirpación quirúrgica junto con un margen de tejido normal en el quinto y sexto días de las aplicaciones de ciclopamina, cuando los CCBs habían desaparecido de la mayoría de las áreas en las que se encontraba presente antes del tratamiento pero todavía se hallaba presente en unas cuantas regiones que, aunque de altura notablemente reducida, no habían desaparecido por completo y por lo tanto presentaban células tumorales residuales disponibles para su análisis por microscopía.

Las Fig 2A y Fig 2B muestran, en secciones de tejido, las áreas de piel correspondientes a los nódulos tumorales visualmente desaparecidos. Se observa que los tumores han desaparecido, dejando tras ellos estructuras quísticas grandes que contienen poco material en su interior y ninguna célula tumoral detectable.

La Fig 2C muestra el aspecto microscópico de un área de piel que contenía CCB todavía visible *in vivo*. Se observa que estas regiones contienen CCBs residuales con grandes quistes en el centro del tumor y estructuras quísticas más pequeñas de diverso tamaño situadas entre las células residuales de CCB hacia la periferia.

Las Fig 2D y Fig 2E muestran aspectos aumentados a 1.000X del interior y de las regiones periféricas en empalizada de estos CCBs residuales y muestran la presencia de actividad apoptótica masiva entre las células residuales de CCB con independencia de la región tumoral. Estos aumentos elevados muestran una frecuencia muy incrementada de las células de CCB con morfología apoptótica y la formación de las estructuras quísticas por la eliminación apoptótica de células, tal como se ejemplifica en la Fig 2D por la unión inminente entre sí de los tres quistes más pequeños para formar un quiste mayor tras la eliminación de las células septales en apoptosis.

La Fig 2F muestra que los CCBs tratados con la crema placebo (es decir, la preparación de crema idéntica a la crema de ciclopamina excepto por la ausencia de ciclopamina en el placebo) muestran, por el contrario, las típicas células neoplásicas de CCB y la ausencia de actividad apoptótica detectable.

[0008] Se sabe que las células que experimentan apoptosis resultan eliminadas por macrófagos y por células vecinas presentes en tejidos normales y se sabe que la cuantificación de la actividad apoptótica por criterios morfológicos en secciones teñidas con hematoxilina-eosina proporciona una infraestimación. A pesar de ello, los datos cuantitativos mostrados en la Tabla I muestran una actividad apoptótica muy incrementada, provocada por ciclopamina entre las células residuales de CCB.

[0009] La pérdida de translucidez en los CCBs tratados con ciclopamina plantea la interesante posibilidad de que los CCBs se diferencien bajo la influencia de la ciclopamina. Se ha observado que esta posibilidad, que puede someterse a ensayo mediante análisis inmunohistoquímicos de los CCBs, sí se produce en la presente invención. En epidermis normal, la diferenciación de células de la capa basal con respecto a células de la capa superior se ve acompañada por una pérdida de marcaje con el anticuerpo monoclonal Ber-Ep4. Ber-Ep4 también marca las células de CCB y es un marcador conocido de estos neoplasmas. Las Fig 3A y Fig 3B y los datos cuantitativos en la Tabla I muestran que, aunque Ber-Ep4 marca fuertemente todas las células periféricas en empalizada y más del 90% de las células interiores de los CCBs tratados con placebo, ninguna de las células interiores o periféricas residuales de los CCBs tratados con ciclopamina resulta marcada por Ber-Ep4. La diferenciación de los CCBs bajo la influencia de la ciclopamina, hasta el momento desconocida por cualquier otro medio y altamente inesperada porque se ha conseguido *in vivo* y en todas las células según criterios inmunohistoquímicos, presenta un valor independiente en el tratamiento del cáncer.

[0010] Otro marcador de diferenciación, la lectina tipo 1 de *Ulex europaeus*, normalmente no marca los CCBs o las células de la capa basal de la epidermis normal pero marca las células diferenciadas de la capa superior. La Fig 3C, que muestra el marcaje heterogéneo, con esta lectina, de las células residuales de CCBs tratados con ciclopamina, muestra la diferenciación de algunas de las células de CCB más allá de la etapa de diferenciación detectada con Ber-Ep4 hasta la etapa detectada por la lectina tipo 1 de *Ulex europaeus*.

[0011] La p53 es un regulador maestro de la respuesta celular frente al daño del ADN. Es conocido que la cantidad de esta proteína se incrementa en el núcleo celular tras la exposición de las células a agentes genotóxicos. Cuando el daño al ADN aumenta más allá de un umbral, p53 actúa en la muerte apoptótica de células. La radioterapia del cáncer y las quimioterapias genotóxicas del cáncer que son comunes en la actualidad, actúan en gran parte mediante este mecanismo, es decir provocando la apoptosis secundaria frente al daño del ADN. El anticuerpo monoclonal DO-7 puede unirse a formas tanto normales como mutantes con cambio de sentido (es decir, no funcionales) de p53 y se sabe que el mismo puede detectar el incremento de p53 en las células tras exposición a agentes que dañan el ADN.

[0012] Las Fig 3D, Fig 3E y los datos cuantitativos en la Tabla I muestran que tanto la intensidad de marcaje con DO-7 como la frecuencia de células marcadas resultan notablemente reducidas en CCBs tratados con ciclopamina en comparación con los CCBs tratados con placebo. De este modo, la ciclopamina provoca, no un incremento, sino por el contrario una reducción de p53 en los núcleos de células de CCB que han sido tratadas con ciclopamina. Debido a que se sabe que la expresión de p53 se reduce en células epidérmicas al diferenciarse, el menor marcaje con DO-7 de los CCBs tratados con ciclopamina es probable que sea secundario a la diferenciación de las células de CCB inducida por ciclopamina. En cualquier caso, la actividad apoptótica masiva en los CCBs tratados con ciclopamina, a pesar de la expresión marcadamente reducida de p53, significa que la apoptosis de estas células tumorales inducida por ciclopamina se produce mediante un mecanismo no genotóxico.

[0013] Se sabe que la detención de la proliferación de CCBs está asociada a su retracción con respecto al estroma. Aunque la retracción con respecto al estroma también podría estar provocada en forma de artefacto por la fijación y procesamiento inapropiados de los tejidos, el seguimiento de detalles técnicos publicados garantiza que se evitan dichos artefactos. Como muestran las Fig 3F y Fig 3G, los CCBs tratados con ciclopamina, pero no tratados con placebo, consistentemente presentan retracción con respecto al estroma. La exposición de CCBs a ciclopamina, de esta manera, aparentemente está asociada también a la detención de la proliferación.

[0014] Las Fig 4A a Fig 4D muestran el marcaje con Ber-Ep4 del tejido normal de la piel situado sobre y alrededor de los CCBs tratados con ciclopamina. Se observa que las diferentes áreas epidérmicas que se trataron con ciclopamina presentan en las Fig 4A, Fig 4B y Fig 4C un patrón normal de marcaje con Ber-Ep4, es decir, se observa el marcaje de las células de la capa basal. De manera similar, la Fig 4D muestra el marcaje normal con Ber-Ep4 de un folículo piloso expuesto a ciclopamina. De esta manera, se conservan las células no diferenciadas de epidermis normal y de folículos pilosos a pesar de exponerse al mismo programa y dosis de ciclopamina que los CCBs.

[0015] La causalidad de la diferenciación y apoptosis altamente eficientes de las células tumorales *in vivo* por parte de la ciclopamina a dosis que permiten la conservación de las células de tejido no diferenciadas son logros desconocidos hasta el momento que, junto con el modo de acción no genotóxico de la ciclopamina, apoyan la utilización de la ciclopamina no sólo para CCBs, sino también para aquellos tumores internos que utilizan la ruta *hedgehog/smoothened* para la proliferación y evitación de la apoptosis y/o la diferenciación. Esta invención reivindicada se refiere a la causalidad de apoptosis de células tumorales según se define en la reivindicación 1.

Descripción de las figuras

[0016] Fig 1A, 1B, 1C y 1D: regresiones rápidas de los CCBs tratados con ciclopamina, como indica la desaparición de regiones tumorales (ejemplificadas por flechas), la altura marcadamente reducida con respecto a la superficie de la piel y una pérdida de translucidez en menos de una semana. 1A: CCB, situado en el pliegue nasolabial izquierdo, previamente al tratamiento. 1B: mismo CCB en el quinto día de tratamiento tópico con ciclopamina. 1C: CCB, situado en

la frente, previamente al tratamiento. 1D: mismo CCB en el sexto día del tratamiento tópico con ciclopamina.

Fig 2A, 2B, 2C, 2D, 2E y 2F: aspectos microscópicos de los CCBs tratados con ciclopamina y con placebo, que muestran la muerte y la eliminación apoptóticas masivas, inducidas por ciclopamina, de las células tumorales y la desaparición de nódulos tumorales, dejando tras ellos espacios quísticos sin células tumorales. Las áreas de piel correspondientes a las posiciones previas al tratamiento de los CCBs se extirparon quirúrgicamente en el quinto y sexto días de exposición a la ciclopamina con un margen de tejido normal y se sometieron a fijación, seccionamiento y tinción con hematoxilina-eosina convencionales para análisis microscópicos. 2A: quiste grande en la dermis en correspondencia con la posición de un nódulo tumoral desaparecido que no presenta ninguna célula tumoral residual. 2B: quistes similares en otra área dérmica que presentaba CCB antes, pero no después, del tratamiento con ciclopamina. 2C: vista con bajo aumento de un área del CCB mostrado en la Fig 1D, que muestra células residuales y la formación de un quiste grande por la unión entre sí de los numerosos quistes más pequeños entre dichas células. 2D: vista con aumento elevado de una región interior del mismo CCB residual que la Fig 2C, que muestra una frecuencia muy incrementada de las células apoptóticas, y la formación así como el incremento de tamaño de los quistes por la eliminación apoptótica de las células de CCB. 2E: vista con aumento elevado de una región periférica del mismo CCB residual que la Fig 2C, que también muestra una frecuencia muy incrementada de las células apoptóticas y la formación de quistes por la eliminación apoptótica de células de CCB. 2F: vista con aumento elevado de un área interna de un CCB tratado con placebo que muestra las típicas células neoplásicas de este tumor y la ausencia de apoptosis. Los aumentos originales son de 100X para 2A, 2B, 2C, y de 1.000X para 2D, 2E, 2F.

Las Fig 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F y 3G: análisis inmunohistoquímicos de los CCBs tratados con ciclopamina y con placebo, que muestran la diferenciación de todas las células residuales de CCB bajo la influencia de la ciclopamina y la reducción de la expresión de p53 en CCBs tras la exposición a ciclopamina. 3A y 3B: ausencia de tinción con el anticuerpo monoclonal Ber-Ep4 en todas las células residuales de CCB tratado con ciclopamina (3A) en comparación con la tinción fuerte del CCB tratado con placebo (3B), que muestra que todas las células residuales en los CCBs tratados con ciclopamina se encuentran diferenciados hasta o más allá de una etapa detectada por Ber-Ep4. Ber-Ep4 es un conocido marcador de diferenciación que tiñe las células de CCB, así como las células no diferenciadas de la capa basal de la epidermis normal y de folículos pilosos, pero no las células diferenciadas de la capa superior de la epidermis normal. 3C: marcaje heterogéneo, con la lectina tipo 1 de *Ulex europaeus*, de las células residuales de un CCB tratado con ciclopamina, que muestra la diferenciación de algunas de las células de CCB hasta la etapa detectada por esta lectina, que normalmente no marca los CCBs o las células de la capa basal de la epidermis normal pero que sí marca las células diferenciadas de la capa superior. 3D y 3E: expresión reducida de p53 según detección mediante el anticuerpo monoclonal DO-7 en CCBs tratados con ciclopamina (3D) en comparación con los CCBs tratados con placebo (3E). Se sabe que la expresión de p53 se reduce al diferenciarse las células basales de la epidermis y al diferenciarse los queratinocitos en cultivo. También es bien conocido que la cantidad de p53, detectable con DO-7, se incrementa en células cuando se exponen a agentes que dañan el ADN. 3F y 3G: retracción consistente de CCBs con respecto al estroma, que es una característica que se sabe que está asociada a la detención de la proliferación de células tumorales, observada en tumores tratados con ciclopamina (3F, la flecha muestra el espacio de retracción) pero no en los tratados con placebo (3G) (también se observa una diferencia en los CCBs tratados con ciclopamina y con placebo en términos de retracción con respecto al estroma en 3D, 2C en comparación con 3B, 3E). Los aumentos originales son de 400X para 3A, 3B, 3D, 3E, de 1.000X para 3C y de 100X para 3F, 3G. Todos los marcajes inmunohistoquímicos se realizan por unión de estreptavidina conjugada con peroxidasa a anticuerpo secundario biotinilado; el marcaje se indica mediante tinción de color marrón. Las secciones mostradas en 3F y en 3G se tiñen con ácido peryódico de Schiff y con azul alcian.

Fig 4A, 4B, 4C, 4D: patrón normal de marcaje de la piel normal tratada con ciclopamina utilizando Ber-Ep4, que muestra que las células no diferenciadas de epidermis normal y de folículos pilosos se conservan a pesar de haberse expuesto al mismo programa y dosis de ciclopamina que los CCBs. 4A: marcaje con Ber-Ep4 de las células de la capa basal de la epidermis tratada con ciclopamina. 4B y 4C: vistas con aumento más elevado, de diferentes áreas de epidermis tratada con ciclopamina que muestran el marcaje con Ber-Ep4 de las células basales. 4D: vista con aumento elevado de un folículo piloso tratado con ciclopamina que muestra sin embargo un marcaje normal con Ber-Ep4. El aumento original es de 400X para 4A y de 1.000X para 4B, 4C, 4D. El procedimiento de detección inmunohistoquímico es el mismo que en las Fig 3A, 3B; el marcaje se indica mediante coloreado marrón.

Tabla 1: Inducción de la Diferenciación y Apoptosis de Células de Carcinoma de Células Basales por Ciclopamina tópica

	Células Periféricas en Empalizada		Células No en Empalizada	
	de los CCBs Tratados Con Placebo	Ciclopamina	de los CCBs Tratados Con Placebo	Ciclopamina
% De Células Que Mostraban ≥ 2 Signos Morfológicos				
De Apoptosis En Secciones De Tejido Teñidas Con H-E	0 $\pm$ 0	20 $\pm$ 8	0,2 $\pm$ 0,4	18 $\pm$ 11
% De Células Marcadas Con Ber-Ep4	100 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	91 $\pm$ 8	0 $\pm$ 0
% De Células Marcadas Con DO-7	58 $\pm$ 27	16 $\pm$ 11	67 $\pm$ 22	5 $\pm$ 3

Se muestran las medias $\pm$ desviaciones estándares a partir de por lo menos 16 campos con aumento elevado (1.000X) seleccionados aleatoriamente, de las secciones de tejido de cada grupo tumoral. $p < 0,001$ para la comparación placebo frente a ciclopamina en el tratamiento de tumores para todos los parámetros, para las áreas tumorales tanto periféricas en empalizada como las no en empalizada (interiores).

5 **[0017]** Las impresiones a color de las mismas figuras que la página 12 (Fig 1A, 1B, 1C, 1D, Fig 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, Fig 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, 3G, Fig 4A, 4B, 4C, 4D, se han añadido como página 12a ya que los datos y hallazgos inmunohistoquímicos, debido a su naturaleza, se pueden comunicar en color mejor que en escala de grises; se solicita con el debido respecto a la Oficina de Patentes que se tenga en consideración este hecho y que se mantenga la página 12a como parte de esta solicitud de patente. No obstante, la página 12a se puede eliminar de la solicitud de patente si la Oficina de Patentes lo considera necesario.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Medicamento para ser usado en la inducción de apoptosis de células tumorales de un sujeto que tiene un carcinoma de células basales u otro tumor que usa la ruta de transducción de señales *Hedgehog/Smoothened* para la prevención de apoptosis de células tumorales, en donde el medicamento comprende ciclopamina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
2. Medicamento según la reivindicación 1, en el que las células tumorales se inducen también para la diferenciación.
- 10 3. Medicamento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho medicamento está formulado para administración tópica o sistémica.
4. Medicamento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho medicamento está formulado para inyección intratumoral.
- 15 5. Medicamento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho medicamento es una solución acuosa o una preparación liposomal.
6. Medicamento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho medicamento es una forma farmacéutica que permite la liberación controlada.
- 20 7. Medicamento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho medicamento está adsorbido en un parche dérmico.
- 25 8. Medicamento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el medicamento está elaborado en forma de una crema, pomada, gel o hidrogel.

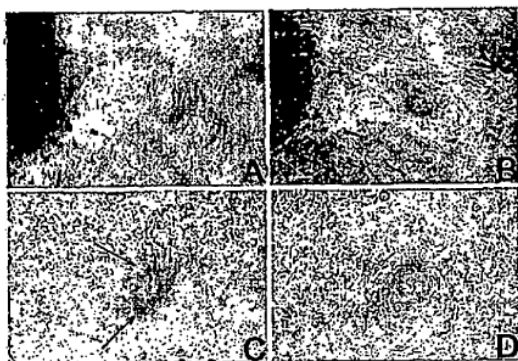


Fig 1A,1B,1C,1D

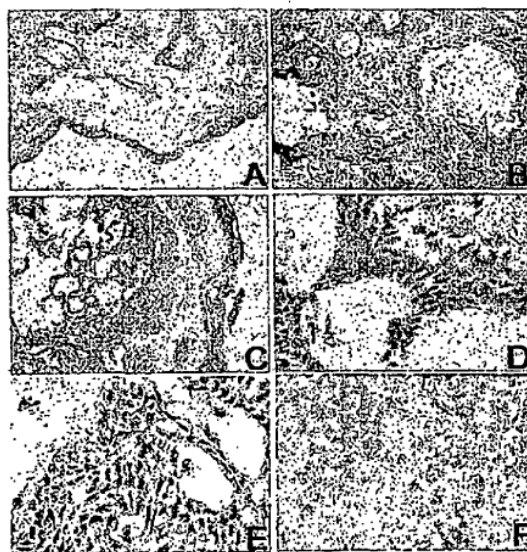


Fig 2A,2B,2C,2D,2E,2F

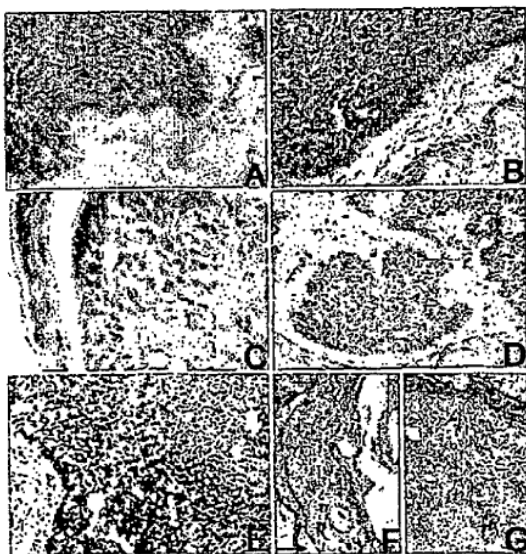


Fig 3A,3B,3C,3D,3E,3F,3G

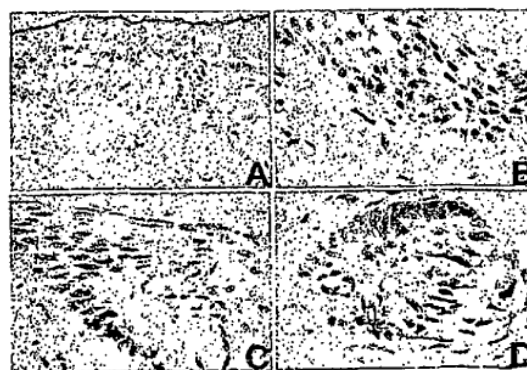


Fig 4A,4B,4C,4D

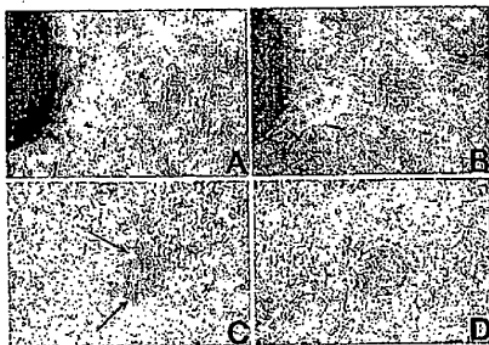


Fig 1A,1B,1C,1D

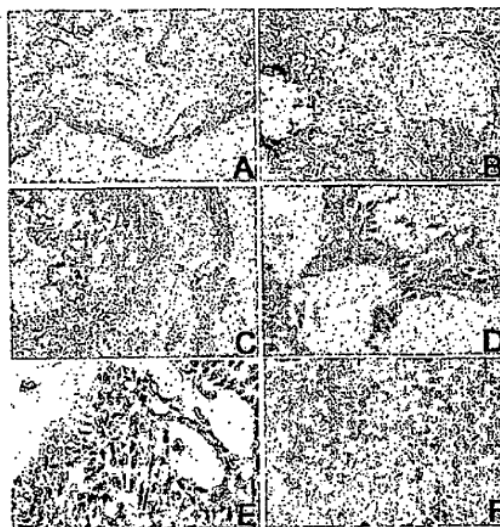


Fig 2A,2B,2C,2D,2E,2F

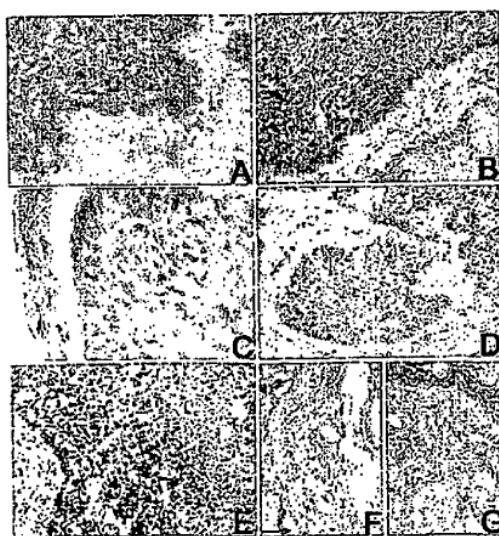


Fig 3A,3B,3C,3D,3E,3F,3G

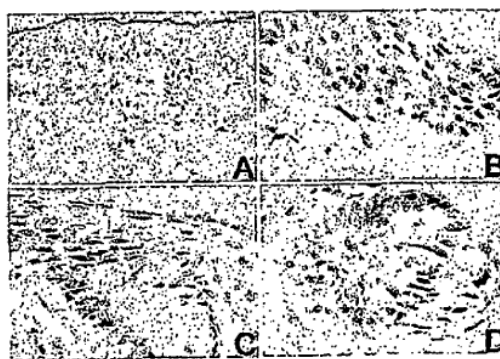


Fig 4A,4B,4C,4D