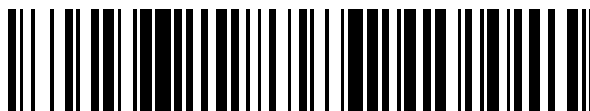


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 393**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2005 PCT/US2005/009739**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2005 WO05097207**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2005 E 05732497 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 1730280**

54 Título: **Moduladores de interferencia de ARN de señalización de hedgehog y usos de los mismos**

30 Prioridad:

26.03.2004 US 556661 P

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

03.04.2019

73 Titular/es:

**CURIS, INC. (50.0%)
4 Maguire Road
Lexington, MA 02421, US y
GENENTECH, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

BUMCROT, DAVID, A.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 707 393 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

Moduladores de interferencia de ARN de señalización de *hedgehog* y usos de los mismos

Antecedentes de la invención

5 La formación de patrones es la actividad mediante la cual las células embrionarias forman disposiciones espaciales ordenadas de tejidos diferenciados. La complejidad física de los organismos superiores surge durante la embriogénesis a través de la interacción de linaje intrínseco de célula y señalización extrínseca de célula. Las interacciones inductivas son esenciales para la formación de patrones embrionaria en el desarrollo de vertebrados desde el establecimiento más temprano del plan corporal, hasta la formación de patrones de los sistemas de órganos, hasta la generación de diversos tipos de célula durante la diferenciación de tejido (Davidson, E., (1990) Development 108: 365-389; Gurdon, J. B., (1992) Cell 68: 185-199; Jessell, T. M. *et al.*, (1992) Cell 68: 257-270). Sin embargo, la generación de complejidad y el refinamiento de la identidad y el comportamiento celulares que comienzan en la embriogénesis continúa en la totalidad de la vida adulta. La señalización e interacciones intrínsecas de célula y extrínsecas de célula continúan influyendo en la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular durante el desarrollo adulto.

15 Los miembros de la familia de *Hedgehog* de moléculas de señalización median en muchos procesos de formación de patrones a corto y largo alcance importantes durante el desarrollo embrionario, fetal y adulto de invertebrados y vertebrados. En la mosca, un único gen *hedgehog* regula la formación de patrones de discos imaginales y segmentales. En cambio, en vertebrados, una familia de genes *hedgehog* está implicada en el control, la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia de células y tejidos derivados de las tres capas germinales. A modo de ejemplo no limitativo, la señalización de *hedgehog* está implicada en la asimetría izquierda-derecha, el desarrollo del SNC, la formación de patrones de somitas y extremidades, la condrogénesis y esquelotogénesis y espermatogénesis.

25 Se identificó el primer gen *hedgehog* mediante un examen genético en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Nüsslein-Volhard, C. y Wieschaus, E. (1980) Nature 287, 795-801). Este examen identificó varias mutaciones que afectaban al desarrollo embrionario y larvario. En 1992 y 1993, se notificó la naturaleza molecular del gen *hedgehog* (*hh*) de *Drosophila* (C.F., Lee *et al.* (1992) Cell 71, 33-50), y desde entonces, se han aislado varios homólogos de *hedgehog* de diversas especies de vertebrados. Aunque sólo se ha encontrado un gen *hedgehog* en *Drosophila* y otros invertebrados, están presentes múltiples genes *Hedgehog* en vertebrados.

30 La familia de genes *hedgehog* de vertebrados incluye al menos cuatro miembros, por ejemplo, parálogos del único gen *hedgehog* de *Drosophila*. Se describen proteínas y genes *hedgehog* a modo de ejemplo en las publicaciones PCT WO 95/18856 y WO 96/17924. Tres de estos miembros, denominados en el presente documento Desert *hedgehog* (*Dhh*), Sonic *hedgehog* (*Shh*) e Indian *hedgehog* (*Ihh*), existen aparentemente en todos los vertebrados, incluyendo peces, aves y mamíferos. Un cuarto miembro, denominado en el presente documento *tiggie-winkle hedgehog* (*Thh*), parece ser específico de peces. Desert *hedgehog* (*Dhh*) se expresa principalmente en los testículos, tanto en el desarrollo embrionario de ratón como en el roedor y ser humano adultos; Indian *hedgehog* (*Ihh*) está implicado en el desarrollo de los huesos durante la embriogénesis y en la formación de huesos en el adulto; y *Shh*, que, está implicado en múltiples tipos de célula embrionarias y adultas derivadas de los tres linajes. Dado los papeles críticos de los polipéptidos de *hedgehog* y la señalización de *hedgehog* a través del desarrollo embrionario y adulto, así como el papel de señalización de *hedgehog* aberrante en una variedad de estados de enfermedad, existe una necesidad sustancial de composiciones y métodos mejorados para modular la señalización de *hedgehog*.

45 Las diversas proteínas *Hedgehog* consisten en un péptido señal, una región N-terminal altamente conservada y un dominio C-terminal más divergente. Además de la escisión de secuencia señal en la ruta secretora (Lee, J.J. *et al.* (1992) Cell 71:33-50; Tabata, T. *et al.* (1992) Genes Dev. 2635-2645; Chang, D.E. *et al.* (1994) Development 120:3339-3353), las proteínas precursoras de *Hedgehog* experimentan una escisión autoproteolítica interna que depende de secuencias conservadas en la parte C-terminal (Lee *et al.* (1994) Science 266:1528-1537; Porter *et al.* (1995) Nature 374:363-366). Esta autoescisión conduce a un péptido N-terminal de 19 kD y un péptido C-terminal de 26-28 kD (Lee *et al.* (1992) citado anteriormente; Tabata *et al.* (1992) citado anteriormente; Chang *et al.* (1994) citado anteriormente; Lee *et al.* (1994) citado anteriormente; Bumcrot, D.A., *et al.* (1995) Mol. Cell. Biol. 15:2294-2303; Porter *et al.* (1995) citado anteriormente; Ekker, S.C. *et al.* (1995) Curr. Biol. 5:944-955; Lai, C.J. *et al.* (1995) Development 121:2349-2360). El péptido N-terminal permanece estrechamente asociado con la superficie de células en las que se sintetizó, mientras que el péptido C-terminal puede difundirse libremente tanto *in vitro* como *in vivo* (Porter *et al.* (1995) Nature 374:363; Lee *et al.* (1994) citado anteriormente; Bumcrot *et al.* (1995) citado anteriormente; Martí, E. *et al.* (1995) Development 121:2537-2547; Roelink, H. *et al.* (1995) Cell 81:445-455). De manera interesante, la retención en la superficie celular del péptido N-terminal depende de autoescisión, ya que una forma truncada de HH codificada por un ARN que termina precisamente en la posición normal de escisión interna puede difundir *in vitro* (Porter *et al.* (1995) citado anteriormente) e *in vivo* (Porter, J.A. *et al.* (1996) Cell 86, 21-34). Unos estudios bioquímicos han mostrado que la escisión autoproteolítica de la proteína precursora de HH avanza a través de un producto intermedio de tioéster interno que se escinde posteriormente en una sustitución nucleófila. Es este péptido N-terminal el que es tanto necesario como suficiente para las actividades de señalización de *Hedgehog*

a corto y largo alcance en *Drosophila* y vertebrados (Porter *et al.* (1995) citado anteriormente; Ekker *et al.* (1995) citado anteriormente; Lai *et al.* (1995) citado anteriormente; Roelink, H. *et al.* (1995) Cell 81:445-455; Porter *et al.* (1996) citado anteriormente; Fietz, M.J. *et al.* (1995) Curr. Biol. 5:643-651; Fan, C.-M. *et al.* (1995) Cell 81:457-465; Marti, E., *et al.* (1995) Nature 375:322-325; Lopez-Martinez *et al.* (1995) Curr. Biol. 5:791-795; Ekker, S.C. *et al.* (1995) Development 121:2337-2347; Forbes, A.J. *et al.* (1996) Development 122:1125-1135).

Tal como se expuso brevemente antes y tal como se detalla adicionalmente en el presente documento, las proteínas hedgehog y la señalización de hedgehog desempeñan papeles críticos en la modulación de la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia de numerosos tipos de célula en la totalidad del desarrollo embrionario y adulto. Además, la señalización de hedgehog aberrante (por ejemplo, mutaciones en componentes de la ruta de señalización de hedgehog, la expresión errónea de componentes de la ruta de señalización de hedgehog, etc.) se ha implicado en numerosos estados de enfermedad.

Hasta la fecha, se han identificado numerosos componentes de señalización de HH. Se han asociado mutaciones en muchos de estos componentes de señalización de HH con diversos estados de enfermedad tales como cáncer. Por ejemplo, el documento WO 2004/020599 da a conocer métodos generales de inhibición de la proliferación celular no deseada incluyendo tumores usando inhibidores de la ruta de hedgehog incluyendo *smoothened*. Por tanto, se desea modular la función de la ruta de señalización de HH, modulando, por ejemplo, la actividad y/o expresión de proteínas miembros individuales implicadas en la señalización de HH. Sin embargo, la regulación de la expresión de genes seleccionados como diana que están implicados en importantes rutas biológicas supone un gran reto para la medicina moderna. Aunque la sobreexpresión de un transgén introducido de manera exógena en una célula eucariota es relativamente sencilla, la inhibición dirigida de genes endógenos específicos ha sido más difícil de lograr. Los enfoques tradicionales para suprimir la expresión génica, incluyendo interrupción génica dirigida al sitio, ARN antisentido o suprimir conjuntamente o inyección, requieren manipulaciones genéticas complejas o grandes dosificaciones de supresores que superan a menudo el nivel de tolerancia de toxicidad de la célula huésped.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a las realizaciones tal como se caracterizan en las reivindicaciones y contempla métodos y reactivos para antagonizar la señalización de *hedgehog* usando interferencia de ARN (iARN) tal como se define adicionalmente en las reivindicaciones. El antagonismo de la señalización de *hedgehog* puede usarse para disminuir o inhibir al menos uno de proliferación, crecimiento, diferenciación o supervivencia no deseados de células. Tal proliferación, crecimiento, diferenciación o supervivencia no deseados de células pueden observarse en estados, incluyendo muchas formas de cáncer.

En determinados aspectos, la presente invención pone a disposición métodos y reactivos para inhibir estados de crecimiento no deseados que se producen en células con una ruta de señalización de *hedgehog* (HH) activa tal como se define en las reivindicaciones. En una realización, los métodos objeto pueden usarse para inhibir la proliferación celular no deseada determinando si las células sobreexpresan un gen *gli*, y poniendo en contacto células que sobreexpresan un gen *gli* con una cantidad eficaz de un antagonista de *hedgehog* tal como se define en las reivindicaciones. En realizaciones preferidas, la proliferación celular no deseada es cáncer o hiperplasia prostática benigna. Otro aspecto de la presente invención pone a disposición métodos para determinar un protocolo de tratamiento que comprende obtener una muestra de tejido de un paciente, y determinar los niveles de expresión de gen *gli* en dicha muestra, en el que la sobreexpresión de un gen *gli* indica que es apropiado el tratamiento con un antagonista de *hedgehog*.

En otras realizaciones preferidas, antagonistas de iARN de *hedgehog* de la invención son ARNip, o bien transcritos a partir de un vector de ADN que codifica para un ARNip en horquilla corto (tallo-bucle), un ARNip sintético, o bien ARNbc más largo que puede procesarse adicionalmente para dar ARNip más corto (tal como de 21-23 nucleótidos).

Se contempla que se usen los antagonistas de iARN de la presente invención con otros antagonistas de HH distintos de iARN seleccionados de una molécula pequeña de menos de 2000 Dalton, un anticuerpo contra *hedgehog*, un anticuerpo contra *patched*, un anticuerpo contra *smoothened*, una proteína *hedgehog* mutante, un ácido nucleico antisentido y una ribozima. Estos antagonistas de *hedgehog* distintos de iARN pueden seleccionarse de una de las fórmulas I a XXV tal como se describe en el documento de tramitación junto con el presente USSN 10/652.298. Preferiblemente, el antagonista de *hedgehog* distinto de iARN se selecciona de ciclopamina, compuesto A, tomatidina, jervina, AY9944, triparanol, compuesto B y derivados funcionalmente eficaces de los mismos tal como se describe en el documento USSN 10/652.298. También se prefiere que el antagonista de *hedgehog* distinto de iARN sea un anticuerpo contra *hedgehog* seleccionado de un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Anticuerpos monoclonales a modo de ejemplo son específicamente inmunorreactivos con un polipéptido de *hedgehog* de vertebrado. Se prefiere además que tales anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos no produzcan sustancialmente reacción cruzada o bien con un polipéptido de *hedgehog* de invertebrado, o bien con otros polipéptidos que no son de *hedgehog*. Los anticuerpos monoclonales contra *hedgehog* a modo de ejemplo para su uso como antagonistas de *hedgehog* en los métodos objeto incluyen 5E1, y anticuerpos que reconocen el mismo epítipo que 5E1. Se depositó 5E1 ante la ATCC el 13 de agosto de 2002. Aún en otro aspecto, la invención proporciona composiciones terapéuticas de antagonistas de iARN de *hedgehog* para su uso en los métodos objeto. Estas composiciones terapéuticas incluyen, pero no se limitan a, antagonistas de iARN de *hedgehog* solos, y se

describen en el presente documento para usarse en combinación con uno cualquiera o más de los otros antagonistas de HH distintos de iARN, tales como anticuerpos monoclonales contra *hedgehog* y anticuerpos policlonales contra *hedgehog*. La presente memoria descriptiva contempla además composiciones terapéuticas que comprenden combinaciones de más de un antagonista de iARN de *hedgehog* formulado con un excipiente o portador farmacéuticamente aceptables. Las composiciones terapéuticas a modo de ejemplo comprenden combinaciones de dos o más antagonistas de iARN de *hedgehog* formulados con un excipiente o portador farmacéuticamente aceptables. Además las composiciones a modo de ejemplo comprenden combinaciones de uno o más antagonistas de iARN de *hedgehog*, uno o más antagonistas distintos de iARN de *hedgehog* (por ejemplo, moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos, etc.), y un excipiente o portador farmacéuticamente aceptables.

Todavía en otro aspecto, la presente invención pone a disposición métodos y reactivos para inhibir al menos uno de proliferación, crecimiento, diferenciación o supervivencia no deseados de una célula con una ruta de señalización de *hedgehog* activa tal como se define en las reivindicaciones. En una realización, los métodos objeto pueden usarse para inhibir al menos uno de proliferación, crecimiento, diferenciación o supervivencia celulares no deseados determinando si las células sobreexpresan un gen *gli*, y poniendo en contacto células que sobreexpresan un gen *gli* con una cantidad eficaz de un antagonista de iARN de *hedgehog* tal como se define en las reivindicaciones. Todavía en otra realización, los métodos objeto pueden usarse para inhibir al menos uno de proliferación, crecimiento, diferenciación o supervivencia celulares no deseados determinando si las células sobreexpresan un gen *hedgehog*, y poniendo en contacto células que sobreexpresan un gen *hedgehog* con una cantidad eficaz de un antagonista de iARN de *hedgehog* tal como se define en las reivindicaciones. En realizaciones preferidas, la proliferación, el crecimiento, la diferenciación o la supervivencia celulares no deseados son cáncer o hiperplasia prostática benigna.

Las formas de cáncer a modo de ejemplo que pueden tratarse mediante los métodos objeto incluyen, pero no se limitan a, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer o bien de células pequeñas o bien de células no pequeñas), cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, cáncer endometrial u otro cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de pene, cáncer de vagina, cáncer de uretra, cáncer de vesícula biliar, cáncer de esófago o cáncer de páncreas. Formas de cáncer a modo de ejemplo adicionales que pueden tratarse mediante los métodos objeto incluyen, pero no se limitan a, cáncer de músculo liso o esquelético, cáncer de estómago, cáncer de intestino delgado, cáncer de glándula salival, cáncer anal, cáncer rectal, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer de hipófisis y cáncer de nasofaringe. Formas de cáncer a modo de ejemplo adicionales que pueden tratarse con los antagonistas de *hedgehog* de la presente invención incluyen cánceres que comprenden células que expresan *hedgehog*. Todavía formas de cáncer a modo de ejemplo adicionales que pueden tratarse con los antagonistas de iARN de *hedgehog* de la presente invención incluyen cánceres que comprenden células que expresan *gli*. En determinadas de tales realizaciones, el cáncer no se caracteriza por una mutación en *patched-1*. La memoria descriptiva contempla que los antagonistas de iARN de *hedgehog* de la presente invención pueden usarse solos, o pueden administrarse como parte de un régimen de tratamiento global que incluye otros agentes terapéuticos de *hedgehog* y/u otras terapias tradicionales o no tradicionales.

La presente memoria descriptiva contempla además métodos para determinar el régimen de tratamiento apropiado para un paciente con cáncer. Sin pretender restringirse por ninguna teoría particular, los cánceres que expresan un gen *hedgehog* o un gen *gli*, o que sobreexpresan un gen *hedgehog* o un gen *gli* en comparación con células no cancerosas del mismo tipo de tejido, pueden ser más susceptibles de tratamiento con los antagonistas de iARN de *hedgehog* de la presente invención. Por consiguiente, los métodos de determinación de la expresión de un gen *hedgehog* o un gen *gli* pueden usarse para determinar si el tratamiento con un antagonista de iARN de *hedgehog* es apropiado (es decir, es probable que sea eficaz).

En otro aspecto, la presente invención prevé el uso de uno o más antagonistas de iARN de *hedgehog* en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer en un paciente tal como se define en las reivindicaciones.

En otro aspecto, la presente invención prevé el uso de uno o más antagonistas de iARN de *hedgehog* en la fabricación de un medicamento para disminuir la proliferación, la supervivencia o el crecimiento no deseados de una célula tal como se define en las reivindicaciones.

La memoria descriptiva contempla el uso de cualquier combinación de antagonista de *hedgehog* independientemente del mecanismo de acción de ese antagonista. Los antagonistas de *hedgehog* a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, oligonucleótidos antisentido, anticuerpos, constructos de iARN, moléculas pequeñas, ribozimas, y similares.

Un aspecto adicional de la memoria descriptiva proporciona métodos para estimular la producción de surfactante en una célula pulmonar que comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad del antagonista de iARN de *hedgehog* eficaz para estimular la producción de surfactante. Otro aspecto de la memoria descriptiva proporciona métodos para estimular la formación de cuerpos lamelares en una célula pulmonar que comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad del antagonista de iARN de *hedgehog* eficaz para estimular la formación de cuerpos lamelares. La célula pulmonar puede estar presente en el tejido pulmonar de un bebé prematuro.

Por tanto, un aspecto de la invención proporciona un método de inhibición de al menos uno de la proliferación, la

- 5 supervivencia o el crecimiento no deseados de una célula tal como se define en las reivindicaciones, que comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un antagonista de iARN de hedgehog contra una secuencia diana de la ruta de hedgehog; dicha secuencia diana es un regulador positivo de la ruta de hedgehog, en el que poner en contacto dicha célula con dicho antagonista de iARN de hedgehog disminuye al menos uno de la proliferación, la supervivencia o el crecimiento celulares.
- En una realización, el método que comprende además determinar si dicha célula expresa un gen *gli*, y poner en contacto dicha célula que expresa un gen *gli*, si la hubiera, con una cantidad eficaz de un antagonista de iARN de hedgehog contra una secuencia diana de la ruta de hedgehog.
- En una realización, dicho gen *gli* es *gli-1*.
- 10 En una realización, dicha proliferación celular no deseada es cáncer.
- En una realización, dicha proliferación celular no deseada es hiperplasia benigna.
- En una realización, dicho cáncer es cáncer genitourinario.
- En una realización, dicho cáncer es cáncer del sistema neuronal incluyendo glioma maligno, meningioma, meduloblastoma, tumor neuroectodérmico y ependimoma.
- 15 En una realización, dicho cáncer se asocia con uno o más de tejidos de pulmón, próstata, mama, ovario, útero, músculo, vejiga, colon, riñón, páncreas e hígado.
- En una realización, dicha forma de cáncer asociada con tejido de mama se selecciona de carcinoma ductal inferior, carcinoma lobulillar inferior, carcinoma intraductal, carcinoma medular y carcinoma tubular.
- En una realización, dicho cáncer asociado con tejido pulmonar se selecciona de adenocarcinoma, adenocarcinoma broncoalveolar y carcinoma de células pequeñas.
- 20 En una realización, dicho cáncer asociado con la próstata es adenocarcinoma.
- En una realización, dicha proliferación celular no deseada es angiogénesis no deseada.
- En una realización, dicho antagonista de hedgehog se usa para disminuir la angiogénesis no deseada. La angiogénesis no deseada puede producirse en cualquiera de los siguientes: crecimiento tumoral, metástasis tumorales o crecimientos anómalos por células endoteliales, incluyendo enfermedad neovascular, degeneración macular asociada a la edad, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, rechazo de injerto corneal, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolenticular, queratoconjuntivitis epidérmica, deficiencia de vitamina A, uso excesivo de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, queratitis seca de pterigión, síndrome de Sjogren, acné rosácea, flictenulosis, sífilis, infecciones por *Mycobacteria*, degeneración lipoidea, quemaduras químicas,
- 25 úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por herpes simple, infecciones por herpes zóster, infecciones protozoarias, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratólisis marginal, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliarteritis, traumatismo, granulomatosis de Wegener, sarcoidosis, escleritis, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide queratotomía radial, rechazo de injerto corneal, artritis reumatoide, osteoartritis inflamación crónica (por ejemplo, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn), hemangioma, enfermedad de Osler-Weber-Rendu y telangiectasia hemorrágica hereditaria.
- 30 En una realización, dicha angiogénesis no deseada se produce en procesos fisiológicos normales incluyendo cicatrización de heridas, ovulación e implantación de la blástula después de la fecundación.
- En una realización, dicha proliferación, supervivencia o crecimiento no deseados de dicha célula se produce en crecimiento normal del pelo/cabello, en tricosis, hipertrichosis, hirsutismo o foliculitis incluyendo foliculitis decalvante, foliculitis uleritematosa reticulada, foliculitis queloide y pseudofoliculitis.
- 40 En una realización, dicha proliferación celular no deseada es hiperplasia prostática benigna.
- Dicho antagonista de iARN de hedgehog pueden usarse para modular la proliferación, diferenciación o supervivencia de células madre no comprometidas en cultivo. Por ejemplo, el antagonista de iARN de hedgehog puede usarse para modular la diferenciación de células madre en células neuronales diferenciadas de manera terminal para su uso en injertos intracerebrales. Dichas células neuronales diferenciadas de manera terminal pueden incluir células de la glía, células de Schwann, células cromafines, neuronas colinérgicas del sistema nervioso simpático o parasimpático y neuronas peptidérgicas y serotoninérgicas. El antagonista de iARN de *hedgehog* puede usarse en combinación con otros factores neurotróficos que potencian más particularmente un destino de diferenciación particular de dichas células madre no comprometidas.
- 45 Un aspecto relacionado de la invención proporciona un método de estimulación de al menos uno del crecimiento, la proliferación, la diferenciación o la supervivencia deseados de una célula, que comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un antagonista de iARN de hedgehog contra una secuencia diana de la ruta de
- 50

hedgehog; dicha secuencia diana es un regulador negativo de la ruta de hedgehog, en el que poner en contacto dicha célula con dicho antagonista de iARN de hedgehog aumenta al menos uno del crecimiento, la proliferación, la diferenciación o la supervivencia celulares.

5 Dicho crecimiento, proliferación, diferenciación o supervivencia deseados puede producirse en estados neurológicos que derivan de: (i) una lesión aguda, subaguda o crónica en el sistema nervioso, incluyendo lesión traumática, lesión química, lesión y déficits vasculares, isquemia que resulta de accidente cerebrovascular, lesión infecciosa/inflamatoria e inducida por tumor; (ii) envejecimiento del sistema nervioso incluyendo enfermedad de Alzheimer; (iii) enfermedades neurodegenerativas crónicas del sistema nervioso, incluyendo enfermedad de Parkinson, corea de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y degeneraciones espinocerebelosas; y (iv)

10 enfermedades inmunológicas crónicas del sistema nervioso o que afectan al sistema nervioso, incluyendo esclerosis múltiple.

Dicho crecimiento, proliferación, diferenciación o supervivencia deseados puede producirse en condrogénesis y/u osteogénesis.

15 Dicha condrogénesis y/u osteogénesis puede producirse en una intervención terapéutica en el tratamiento de cartílago de una articulación diartrodial o una articulación temporomandibular, o en terapias de trasplante de cartílago y aparatos protésicos.

Dicha condrogénesis y/u osteogénesis puede producirse en un régimen para la generación de hueso (osteogénesis) en un sitio en el animal en el que es deficiente en tal tejido esquelético.

20 Dicho crecimiento, proliferación, diferenciación o supervivencia deseados puede producirse en la regeneración o el nuevo crecimiento de pelo/cabello.

Dicha regeneración o nuevo crecimiento de pelo/cabello puede producirse después de quimioterapia o radioterapia.

En una realización, el antagonista de iARN es un antagonista de ARNip.

En una realización, dicho antagonista de ARNip es un ARNip formado después de transcripción a partir de síntesis exógena o de un plásmido (vector de expresión de iARN).

25 En una realización, dicho ARNip es un ARNip en horquilla corto formado después de transcripción a partir de un único promotor de dicho plásmido (vector de expresión de iARN).

En una realización, dicho ARNip es un ARNbc corto formado después de transcripción a partir de dos promotores convergentes flanqueantes en dicho plásmido (vector de expresión de iARN).

En una realización, dicho ARNip tiene aproximadamente 19-30 nucleótidos de longitud.

30 En una realización, dicho ARNip tiene 21-23 nucleótidos de longitud.

En una realización, dicho ARNip es un fragmento generado por corte con nucleasa Dicer de ARN bicatenarios más largos de al menos 25, 50, 100, 200, 300, 400 ó 400-800 bases de longitud.

En una realización, dicho ARNip es bicatenario, e incluye proyección/proyecciones corta(s) en uno o ambos extremos.

35 En una realización, dicha proyección corta tiene 1-6 nucleótidos de longitud en el extremo 3', de 2 a 4 nucleótidos de longitud en el extremo 3', o 1-3 nucleótidos de longitud en el extremo 3'.

En una realización, una cadena de dicho ARNip tiene una proyección en 3', y la otra cadena es de extremos romos, o también tiene una proyección de igual o diferente longitud.

En una realización, dicha proyección en 3' se estabiliza frente a la degradación.

40 En una realización, dicha proyección en 3' se estabiliza frente a la degradación incluyendo nucleótidos de purina, adenosina o guanosina.

En una realización, dicha proyección en 3' se estabiliza frente a la degradación sustituyendo nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, por ejemplo, sustitución de proyecciones en 3' de nucleótido de uridina por 2'-desoxitimidina.

45 En una realización, dicho ARNip se sintetiza químicamente.

En una realización, dicho iARN comprende o bien tramos largos de ARN bicatenario idéntico o sustancialmente idéntico a dicha secuencia diana de ácido nucleico, o bien tramos cortos de ARN bicatenario idéntico a sustancialmente idéntico únicamente a una región de dicha secuencia diana de ácido nucleico.

Dicha secuencia diana puede ser un componente de señalización de HH positivo enumerado en la tabla X, o un componente de señalización de HH negativo enumerado en la tabla Y.

Dicha secuencia diana puede ser una secuencia humana.

Dicha secuencia diana puede ser una secuencia no humana.

- 5 Dicha secuencia diana puede ser un homólogo de una cualquiera de las secuencias enumeradas en las tablas X o Y, pero no enumerado por sí mismo en las tablas X o Y.

Dicho antagonista de iARN puede ser específico para un miembro de varios homólogos del mismo componente de señalización de HH.

- 10 Dicho componente de señalización de HH es un hedgehog de mamífero, y dicho antagonista de iARN es específico para Shh según las reivindicaciones.

Dicho antagonista de iARN puede ser al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 100 veces o 1000 veces más selectivo para un miembro con respecto a todos los demás miembros de varios homólogos del mismo componente de señalización de HH.

- 15 En una realización, dicho antagonista de iARN es específico para la ruta de señalización de HH y no afecta significativamente a otras rutas de señalización celular.

En una realización, dicha otra ruta de señalización celular es una ruta de *wingless*.

Otro aspecto de la memoria descriptiva proporciona un método de estimulación de la producción de surfactante en una célula pulmonar que comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad del antagonista de iARN de *hedgehog* eficaz para estimular la producción de surfactante.

- 20 Otro aspecto de la memoria descriptiva proporciona un método de estimulación de la formación de cuerpos lamelares en una célula pulmonar que comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad del antagonista de iARN de *hedgehog* eficaz para estimular la formación de cuerpos lamelares.

Dicha célula de pulmón puede estar presente en el tejido pulmonar de un bebé prematuro.

- 25 Otro aspecto de la memoria descriptiva proporciona un método para tratar un tumor en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad de un antagonista de iARN de *hedgehog* suficiente para disminuir al menos uno de la proliferación, la supervivencia o el crecimiento del tumor, en el que el tumor expresa al menos uno de un gen *hedgehog* o un gen *gli*.

En una realización, dicho antagonista de iARN de *hedgehog* se administra como parte de un régimen de tratamiento contra el cáncer.

- 30 Otro aspecto de la invención proporciona un método de inhibición de al menos uno de la proliferación, la supervivencia o el crecimiento no deseados de una célula, que comprende (a) determinar si dicha célula expresa un gen *hedgehog*, y (b) poner en contacto dicha célula que expresa dicho gen *hedgehog* con una cantidad eficaz de un antagonista de iARN de *hedgehog*; en el que poner en contacto dicha célula con dicho antagonista de iARN de *hedgehog* disminuye al menos uno de la proliferación, supervivencia o el crecimiento celulares tal como se define en las reivindicaciones.

- 35 Dicho gen *hedgehog* es Sonic hedgehog.

En una realización, dicha proliferación, supervivencia o crecimiento celular no deseados de una célula es cáncer.

En una realización, dicho antagonista de iARN de *hedgehog* se formula en un portador farmacéuticamente aceptable.

- 40 Otro aspecto de la invención proporciona un método para tratar un tumor en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad de un antagonista de iARN de *hedgehog* eficaz para disminuir al menos uno de la proliferación, la supervivencia o el crecimiento de dicho tumor.

En una realización, dicho antagonista de iARN de *hedgehog* se administra como parte de un régimen de tratamiento contra el cáncer.

- 45 Otro aspecto de la invención proporciona a uso de un antagonista de iARN de *hedgehog* en la fabricación de un medicamento para tratar un tumor en un paciente tal como se define en las reivindicaciones.

En una realización, el antagonista de iARN de *hedgehog* se administra como parte de un régimen de tratamiento contra el cáncer.

Otro aspecto de la invención proporciona a uso de un antagonista de iARN de hedgehog en la fabricación de un medicamento para inhibir al menos uno de la proliferación, la supervivencia o el crecimiento no deseados de una célula tal como se define en las reivindicaciones.

5 En una realización, el antagonista de iARN de *hedgehog* se administra como parte de un régimen de tratamiento contra el cáncer.

Se contempla que una cualquiera de las realizaciones anteriores puede combinarse con cualquier otra realización siempre que sea aplicable.

Breve descripción de los dibujos

10 La figura 1, señalización de la ruta de hedgehog (adaptada de Michelson, Sci. STKE, 2003(192): PE30, 22 de julio de 2003).

La figura 2 muestra que antagonistas de ARNip en horquilla corto contra Shh humano inhibe la expresión de Shh en células HEK-293.

La figura 3 muestra que un ARNip en horquilla corto es específico contra Shh humano en comparación con Ihh y Dhh.

15 La figura 4 representa la expresión del gen *gli-1* en pulmón de ratón embrionario y adulto.

La figura 5 muestra la relación inversa entre la expresión de *gli-1* y la expresión de marcadores de maduración pulmonar. Entre E13.5 y E16.5, disminuye la expresión de *gli-1* mientras que aumenta la expresión del marcador de maduración, surfactante tipo C (Sp-C).

20 La figura 6 muestra el efecto del tratamiento con compuesto B de pulmones de ratón embrionario sobre la expresión de *gli-1*.

La figura 7 muestra que el tratamiento con compuesto B aumenta la producción de surfactante tipo C en pulmones de ratón embrionario.

25 La figura 8 muestra que neumocitos de tipo II en pulmones tratados con compuesto B se diferencian prematuramente, tal como se pone de manifiesto mediante la presencia de cuerpos lamelares que producen surfactante.

La figura 9 muestra que el tratamiento de cultivos de pulmón embrionario con compuesto B disminuye la expresión de *gli-1*.

30 La figura 10 muestra que el tratamiento de cultivos de pulmón embrionario con compuesto B aumenta la expresión del marcador de maduración Sp-C. La inducción de Sp-C observada tras el tratamiento es comparable a la observada tras el tratamiento con el factor de maduración pulmonar conocido, hidrocortisona.

La figura 11 muestra que el tratamiento de cultivos de pulmón embrionario con agonistas de hedgehog tiene el efecto opuesto. El tratamiento o bien con sonic hedgehog o bien con agonista Z aumenta la expresión de *gli-1* y disminuye la expresión de Sp-C.

La figura 12 ilustra la expresión de *gli-1* en tejido de cáncer de mama visualizado mediante hibridación *in situ*.

35 La figura 13 muestra la expresión de *gli-1* en cáncer de pulmón visualizado mediante hibridación *in situ*

La figura 14 ilustra la expresión de *gli-1* en cáncer de próstata visualizado mediante hibridación *in situ*.

La figura 15 representa la expresión de *gli-1* en hiperplasia prostática benigna visualizada mediante hibridación *in situ*

40 La figura 16 muestra: (A) expresión del transgén *Ptc-lacZ* en epitelio de vejiga *ptc-1 (d11) lacZ* de ratón recién nacido. Puede detectarse la expresión de *LacZ* en las células uroteliales en proliferación y, más débilmente, en células mesenquimatosas adyacentes. (B) expresión de *Gli-1* en epitelio de vejiga de ratón adulto. Puede detectarse la expresión de *Gli-1* en las células uroteliales en proliferación.

La figura 17 muestra la expresión de *gli-1* y *shh* en vejiga de adulto normal y en un tumor de vejiga disponible comercialmente.

45 La figura 18 muestra la expresión de *shh* y *gli-1* en ocho líneas celulares de cáncer de vejiga disponibles comercialmente. Las ocho líneas celulares examinadas expresan genes implicados en la señalización de *hedgehog*.

La figura 19 muestra la expresión de *shh*, *ptc-1*, *smo*, *gli-1*, *gli-2* y *gli-3* en ocho líneas celulares de cáncer de vejiga disponibles comercialmente, así como en cerebro fetal.

La figura 20 muestra una representación esquemática del ensayo de gli-Luc.

La figura 21 muestra los resultados del ensayo de gli-Luc con cocultivos de células de cáncer de vejiga. El cocultivo de células S12 o bien con la línea celular 5637 o bien con la línea celular RT4 da como resultado la activación del gen indicador que indica que estas líneas celulares pueden activar la señalización de *hedgehog*.

- 5 La figura 22 muestra que el anticuerpo contra Shh, 5E1, inhibe la activación del gen indicador en cocultivos de RT-4/S12.

Las figuras 23 y 24 muestran que la administración del anticuerpo contra Shh, 5E1, inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en un modelo de cáncer de vejiga de ratón desnudo.

- 10 La figura 25 muestra que administración del anticuerpo contra Shh, 5E1, disminuye la expresión de *gli-1 in vivo* en un modelo de cáncer de vejiga de ratón desnudo.

La figura 26 muestra que se expresa *shh* en muestras de cáncer de próstata visualizadas mediante hibridación *in situ*.

La figura 27 muestra mediante Q-RT-PCR la expresión de *gli-1* en próstata de adulto normal y en un adenocarcinoma de próstata.

- 15 La figura 28 muestra la expresión de *shh* y *gli-1* en tres líneas celulares de cáncer de próstata en comparación con la expresión en una línea celular de próstata normal.

La figura 29 muestra que líneas celulares de cáncer de próstata inducen la expresión de luciferasa cuando se cocultiva con células S12 en el ensayo *in vitro* de gli-Luc.

- 20 La figura 30 muestra que el anticuerpo de antagonización 5E1 inhibe la inducción de luciferasa por células de cáncer de próstata en el ensayo *in vitro* de gli-Luc.

La figura 31 muestra la expresión de *shh* en estroma y epitelio de próstata en muestras con HPB humanas.

La figura 32 muestra la expresión de *gli-1* en el estroma de próstata de muestras con HPB humanas tal como se mide mediante hibridación *in situ* radiactiva.

- 25 La figura 33 muestra que *shh* y *patched-1* se expresan en un patrón próximo-distal en tejido de próstata normal produciéndose los mayores niveles de expresión génica en la región proximal o central.

La figura 34 muestra la expresión de *shh* y *gli-1* en muestras con HPB, y compara los niveles de expresión génica con muestras con muestras con BCC.

La figura 35 muestra la expresión de *shh* y *gli-1* en líneas celulares con HPB, y compara los niveles de expresión génica con los de muestras con BCC, próstata normal y cáncer de próstata.

- 30 La figura 36 muestra la expresión de *shh* en una variedad de líneas celulares de cáncer humanas de colon, pulmón, ovario, renal y hepático. Se mide la expresión de *shh* usando Q-RT-PCR que demuestra que se expresa *shh*, en un grado variable, en líneas celulares de cáncer humanas derivadas de varios tipos de tejido diversos.

- 35 La figura 37 muestra la expresión de *shh* en una variedad de tumores sometidos a pases derivados de tejido de colon, pulmón, mama, melanoma, ovario, próstata, pancreático y renal. Se mide la expresión de *shh* usando QRT-PCR que demuestra que se expresa *shh*, en un grado variable, en tumores sometidos a pases derivados de varios tipos de tejido diversos.

La figura 38 muestra la expresión de proteína *hedgehog* en tejido humano normal de estómago, próstata, bazo, intestino delgado, intestino grueso, vesícula biliar, apéndice y riñón. Se examinó la expresión de proteína *Hedgehog* mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo policlonal anti-*hedgehog*.

- 40 La figura 39 muestra la expresión de proteína *hedgehog* en tumores humanos derivados de tejido salival, esofágico, pancreático, de tiroides, colon, endometrial, de riñón y próstata. Se examinó la expresión de proteína *Hedgehog* mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo policlonal anti-*hedgehog*.

- 45 La figura 40 muestra la expresión aumentada de proteína *hedgehog* en una muestra de tumor de páncreas en comparación con la expresión de proteína *hedgehog* en tejido pancreático normal. Se midió la expresión de proteína *Hedgehog* mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo policlonal anti-*hedgehog*.

La figura 41 muestra que el anticuerpo bloqueante de Shh, 5E1, disminuye el tamaño tumoral cuando se administra a ratones a los que se les inyectó una combinación de la línea celular de cáncer de colon que expresa Shh, HT-29, y fibroblastos.

La figura 42 muestra que el anticuerpo bloqueante de Shh, 5E1, disminuye el tamaño tumoral cuando se administra

a ratones a los que se les inyectó una combinación de la línea celular de cáncer de colon que expresa Shh, HT-29, y fibroblastos.

5 La figura 43 muestra que la administración retardada del anticuerpo bloqueante de Shh, 5E1, disminuye el tamaño tumoral cuando se administra a ratones a los que se les inyectó una combinación de la línea celular de cáncer de colon que expresa Shh, HT-29, y fibroblastos.

La figura 44 muestra que la administración retardada del anticuerpo bloqueante de Shh, 5E1, disminuye el tamaño tumoral cuando se administra a ratones a los que se les inyectó una combinación de la línea celular de cáncer de colon que expresa Shh, HT-29, y fibroblastos.

10 La figura 45 muestra que la administración del anticuerpo bloqueante de Shh, 5E1, induce apoptosis en tumores mixtos de HT-29/fibroblastos.

La figura 46 muestra que la administración retardada del anticuerpo bloqueante de Shh, 5E1, disminuye el tamaño tumoral cuando se administra a ratones a los que se les inyectó la línea celular de cáncer de colon que expresa Shh, HT-29.

15 La figura 47 muestra que la administración retardada del anticuerpo bloqueante de Shh, 5E1, disminuye el tamaño tumoral cuando se administra a ratones a los que se les inyectó la línea celular de cáncer de colon que expresa Shh, HT-29.

La figura 48 muestra que la administración retardada del anticuerpo bloqueante de Shh, 5E1, a ratones a los que se les inyectó la línea celular de cáncer de colon que expresa Shh, HT-29, disminuye la expresión de ARNm de gli-1.

20 La figura 49 muestra que la administración del anticuerpo bloqueante de Shh, 5E1, a ratones a los que se les inyectó la línea celular de cáncer de páncreas que expresa hedgehog, SW1990, disminuye el peso tumoral.

La figura 50 muestra que la administración del anticuerpo bloqueante de Shh, 5E1, a ratones a los que se les inyectó la línea celular de cáncer de páncreas que expresa hedgehog, SW1990, disminuye el tamaño tumoral, y da como resultado extensos dominios de necrosis dentro de dichos tumores.

25 La figura 51 muestra que la administración del anticuerpo bloqueante de Shh, 5E1, a ratones a los que se les inyectó la línea celular de cáncer de páncreas que expresa hedgehog, SW1990, disminuye el volumen tumoral.

La figura 52 muestra que la administración del anticuerpo bloqueante de Shh, 5E1, a ratones a los que se les inyectó la línea celular de cáncer de páncreas que expresa hedgehog CF PAC disminuye el peso tumoral.

La figura 53 muestra que la administración del anticuerpo bloqueante de Shh, 5E1, a ratones a los que se les inyectó la línea celular de cáncer de páncreas que expresa hedgehog CF PAC disminuye el volumen tumoral.

30 La figura 54 muestra que la administración del anticuerpo bloqueante de Shh, 5E1, a ratones a los que se les inyectó la línea celular de cáncer de colon que no expresa hedgehog, SW480, no tiene efecto sobre el volumen tumoral.

35 La figura 55 muestra la expresión de Hedgehog en cánceres humanos: (a, d) inmunorreactividad de Hedgehog en material de biopsia tomado de adenocarcinomas ductales de mama humanos. Obsérvese la inmunorreactividad más intensa presente en el epitelio canceroso (flechas) que en el epitelio ductal normal adyacente (punta de flecha) que demuestra niveles de Hh elevados en tejidos cancerosos. (b, e) Tinción de Hedgehog en dos formas de cáncer de ovario, incluyendo un adenocarcinoma seroso de malignidad dudosa bien diferenciado (b), y un adenocarcinoma escasamente diferenciado (e). (c, f) inmunorreactividad de Hedgehog en muestras de cáncer de útero que demuestran expresión en cánceres altamente invasivos tanto bien diferenciados (c), como escasamente diferenciados (f).

40 **Descripción detallada de la invención**

I. Visión general

45 La interferencia de ARN (iARN) es un fenómeno que describe silenciamiento postranscripcional específico de genes dependientes de ARN bicatenario (bc). Los intentos iniciales para aprovechar este fenómeno para la manipulación experimental de células de mamífero se vieron frustrados por un mecanismo de defensa antiviral robusto e inespecífico activado en respuesta a moléculas de ARNbc largo. Gil *et al.* Apoptosis 2000, 5:107-114. Se avanzó significativamente en el campo con la demostración de que dúplex sintéticos de ARN de 21 nucleótidos podrían mediar en iARN específica de genes en células de mamífero, sin acogerse a mecanismos de defensa antiviral genéricos. Elbashir *et al.* Nature 2001, 411:494-498; Caplen *et al.* Proc Natl Acad Sci 2001, 98:9742-9747. Como resultado, los ARN interferentes pequeños (ARNip) se han convertido en poderosas herramientas para diseccionar la función génica. La síntesis química de pequeños ARN es una vía que ha producido resultados prometedores. 50 Numerosos grupos también han buscado el desarrollo de vectores basados en ADN que puedan generar tales ARNip dentro de las células. Varios grupos han logrado este objetivo y han publicado estrategias similares que, en general, implican la transcripción de ARN en horquilla cortos (hc) que se procesan eficazmente para formar ARNip

dentro de las células. Paddison *et al.* PNAS 2002, 99:1443-1448; Paddison *et al.* Genes & Dev 2002, 16:948-958; Sui *et al.* PNAS 2002, 8:5515-5520; y Brummelkamp *et al.* Science 2002, 296:550-553. Estos informes describen métodos para generar ARNip que pueden seleccionar como diana específicamente numerosos genes expresados de manera endógena y de manera exógena.

5 La presente invención se refiere al descubrimiento de que las rutas de transducción de señales reguladas por *hedgehog*, *patched* (*ptc*), *gli*, *smoothed*, y muchas otras proteínas de la ruta de señalización de HH pueden inhibirse, al menos en parte, por antagonistas de iARN específicos. Puesto que determinadas proteínas de señalización de HH regulan positivamente la señalización de HH global, mientras que otras regulan negativamente la señalización de HH global, estos antagonistas de iARN pueden o bien aumentar o bien disminuir la señalización de HH global en una célula o tejido / órgano afectado. Por tanto, se contempla específicamente que estos antagonistas de iARN que modulan la actividad de transducción de señales de *hedgehog*, *ptc*, *smoothed*, *etc.* asimismo podrán cambiar el papel de una célula en el desarrollo de tejido con respecto a lo que se habría producido si no.

15 Preferiblemente, la célula tiene una señalización de la ruta de *hedgehog* sustancialmente silvestre. También se contempla que antagonistas de *hedgehog* sean particularmente eficaces en el tratamiento de trastornos que resultan de la hiperactivación de la ruta de *hedgehog*, o bien como resultado de mutaciones en componentes de la ruta de señalización de HH o bien como resultado de la activación inapropiada de la ruta de señalización de HH en una célula que no comprende una mutación/lesión en un componente de la ruta de señalización de HH. Por tanto, se desea disponer de un método para identificar aquellas células en las que la ruta de *hedgehog* es hiperactiva de tal manera que el tratamiento con antagonista puede dirigirse eficazmente. Un experto en la técnica reconocerá inmediatamente que los antagonistas de iARN de la presente invención pueden modular la señalización de *hedgehog* en cualquier punto en la ruta de señalización de *hedgehog*. Es decir, un modulador de iARN a modo de ejemplo puede regular la señalización de HH antagonizando el propio *hedgehog*, o cualquier otro componente de señalización de HH tal como el receptor de *hedgehog*, *patched*. Se contempla que los antagonistas de iARN de la presente invención pueden usarse para modular la señalización de *hedgehog* en una célula silvestre o en una célula que comprende una mutación en un componente de la ruta de señalización de *hedgehog*.

25 Por tanto, los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, el uso de antagonistas de iARN que modulan la señalización de HH en la regulación de la reparación y/o del rendimiento de una amplia variedad de células, tejidos y órganos que tienen el fenotipo de ganancia de función de *hedgehog* y en tejidos con actividad *hedgehog* silvestre. Por ejemplo, el método objeto tiene aplicaciones terapéuticas y cosméticas que van de la regulación de tejidos neurales, formación y reparación de hueso y cartilago, regulación de la espermatogénesis, regulación de músculo liso, regulación de pulmón, hígado y tejido de otros órganos que surgen del intestino primitivo, regulación de la función hematopoyética, regulación del crecimiento de pelo/cabello y piel, etc. Además, los métodos objeto pueden realizarse con células que se proporcionan en cultivo (*in vitro*), o con células en un animal completo (*in vivo*). Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 95/18856 y WO 96/17924.

35 En otro aspecto, la presente memoria descriptiva proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden, como principio activo, un antagonista de iARN de uno cualquiera de los componentes de señalización de HH tales como los descritos en el presente documento, formulados en una cantidad suficiente para inhibir, *in vivo*, la proliferación u otros consecuencias biológicas de la ganancia de función de *hedgehog*.

40 Los tratamientos objeto que usan antagonistas de iARN de los componentes de la ruta de HH pueden ser eficaces para células y sujetos tanto humanos como no humanos. Los sujetos animales a los que puede aplicarse la invención se extienden tanto a animales domésticos como a ganado, criados o bien como mascotas o bien con fines comerciales. Los ejemplos de tales animales no humanos incluyen primates no humanos, perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, ratones, ratas, conejos, ranas, peces, pollos, y similares.

II. Definiciones

45 Por conveniencia, determinados términos empleados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas se reúnen en esta sección.

50 La expresión "modificación o mutación aberrante" de un gen se refiere a lesiones genéticas tales como, por ejemplo, deleciones, sustitución o adición de nucleótidos a un gen, así como reordenamientos cromosómicos macroscópicos del gen y/o metilación anómala del gen. Asimismo, la expresión errónea de un gen se refiere a niveles aberrantes de transcripción del gen con relación a los niveles en una célula normal en condiciones similares, así como el corte y empalme de tipo no silvestre de transcritos de ARNm a partir del gen.

El término "adenocarcinoma" tal como se usa en el presente documento se refiere a un tumor maligno que se origina en epitelio glandular.

55 El término "angiogénesis", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la formación de vasos sanguíneos. Específicamente, la angiogénesis es un proceso de múltiples etapas en el que células endoteliales se degradan focalmente e invaden a través de su propia membrana basal, migran a través del estroma intersticial hacia un estímulo angiogénico, proliferan de manera proximal a la punta de migración, se organizan en vasos sanguíneos y vuelven a unirse de nuevo a membrana basal recién sintetizada (véase Folkman *et al.*, Adv. Cancer Res., vol. 43,

págs. 175-203 (1985)).

5 Los “carcinomas de células basales” existen en una variedad de formas clínicas e histológicas tales como nodular-ulceroso, superficial, pigmentado, similar a morfea, fibroepitelioma y síndrome nevoide. Los carcinomas de células basales son las neoplasias cutáneas más habituales que se encuentran en seres humanos. La mayoría de los nuevos casos de cánceres de piel distintos de melanoma se clasifican en esta categoría.

La “hiperplasia prostática benigna”, o HPB, es un aumento de tamaño benigno de la próstata que comienza normalmente después de la edad de 50 años probablemente secundario a los efectos de las hormonas masculinas. Si se produce un aumento de tamaño importante, puede estrangular la uretra haciendo que la micción sea difícil o imposible.

10 Las “heridas por quemadura” se refieren a casos en los que se han eliminado o perdido grandes áreas superficiales de la piel de un individuo debido al calor y/o agentes químicos.

15 El término “carcinoma” se refiere a un nuevo crecimiento maligno compuesto por células epiteliales que tienden a infiltrar tejidos circundantes y dar lugar a metástasis. Los carcinomas a modo de ejemplo incluyen: “carcinoma de células basales”, que es un tumor epitelial de la piel que, aunque apenas metastatiza, tiene potencialidades para invasión y destrucción local; “carcinoma de células escamosas”, que se refiere a carcinomas que surgen de epitelio escamoso y que tienen células cuboides; “carcinosarcoma”, que incluyen tumores malignos que se componen de tejidos carcinomatosos y sarcomatosos; “carcinoma adenoquístico”, carcinoma caracterizado por cilindros o bandas de estroma hialino o mucinoso separado o rodeado por nidos o cordones de pequeñas células epiteliales, que se producen en las glándulas mamarias o salivales y glándulas mucosas de las vías respiratorias; “carcinoma epidermoide”, que se refiere a células cancerosas que tienden a diferenciarse del mismo modo que las de la epidermis; es decir, tienden a formar células espinosas y experimentan cornificación; “carcinoma de nasofaringe”, que se refiere a un tumor maligno que surge en el revestimiento epitelial del espacio detrás de la nariz; y “carcinoma de células renales”, que pertenece al carcinoma del parénquima renal que se compone de células tubulares en disposiciones variables. Otros crecimientos epiteliales carcinomatosos son “papilomas”, que se refiere a tumores benignos derivados de epitelio y que tienen un virus del papiloma como agente causal; y “epidermoidomas”, que se refiere a un tumor cerebral o meníngeo formado por inclusión de elementos ectodérmicos en el momento del cierre del surco neural.

20 El “*corium*” o “dermis” se refiere a la capa de la piel más profunda que la epidermis, que consiste en un lecho denso de tejido conjuntivo vascular, y que contiene los nervios y órganos de los sentidos terminales. Las raíces del pelo, y las glándulas sebáceas y sudoríparas son estructuras de la epidermis que están incluidas de manera profunda en la dermis.

30 “Tejido dental” se refiere a tejido en la boca que es similar a tejido epitelial, por ejemplo tejido gingival. El método de la presente invención es útil para tratar la enfermedad periodontal.

35 “Úlceras dérmicas de la piel” se refieren a lesiones en la piel provocadas por pérdida superficial de tejido, habitualmente con inflamación. Las úlceras dérmicas de la piel que pueden tratarse mediante el método de la presente invención incluyen úlceras de decúbito, úlceras diabéticas, úlceras venosas por estasis y úlceras arteriales. Las heridas por decúbito se refieren a úlceras crónicas que resultan de la presión aplicada a zonas de la piel durante periodos de tiempo prolongados. Las heridas de este tipo se denominan a veces escaras de decúbito o escaras de presión. Las úlceras venosas por estasis resultan del estancamiento de sangre u otros fluidos de venas con defectos. Las úlceras arteriales se refieren a piel necrótica en la zona alrededor de arterias que tienen escaso flujo sanguíneo.

40 El término “DE₅₀” significa la dosis de un fármaco que produce el 50% de su respuesta o efecto máximo.

45 Una “cantidad eficaz” de, por ejemplo, un antagonista de *hedgehog*, con respecto al método objeto de tratamiento, se refiere a una cantidad del antagonista en una preparación que, cuando se aplica como parte de una pauta posológica deseada provoca, por ejemplo, un cambio en la tasa de proliferación celular y/o el estado de diferenciación de una célula y/o la tasa de supervivencia de una célula según criterios clínicamente aceptables para el trastorno que va a tratarse o para el fin cosmético.

50 Los términos “epitelios”, “epitelial” y “epitelio” se refieren a la cubierta celular de superficies corporales internas y externas (cutáneas, mucosas y serosas), incluyendo las glándulas y otras estructuras derivadas de las mismas, por ejemplo, células epiteliales corneales, esofágicas, epidérmicas y de folículo piloso. Otro tejido epitelial a modo de ejemplo incluye: epitelio olfativo, que es el revestimiento epitelial pseudoestratificado que reviste la región olfativa de la cavidad nasal, y que contiene los receptores para el sentido del olfato; epitelio glandular, que se refiere a epitelio que se compone de células secretoras; epitelio escamoso, que se refiere a epitelio que se compone de células similares a placas aplanadas. El término epitelio también puede referirse a epitelio de transición, como el que se encuentra de manera característica revistiendo órganos huecos que son objeto de un cambio mecánico debido a 55 contracción y distensión, por ejemplo, tejido que representa una transición entre epitelio columnar y escamoso estratificado.

El término “epitelización” se refiere a cicatrización mediante el crecimiento de tejido epitelial sobre una superficie afectada.

5 El término “glándula epidérmica” se refiere a una agregación de células asociadas con la epidermis y especializadas para secretar o excretar materiales no relacionados con sus necesidades metabólicas habituales. Por ejemplo, “glándulas sebáceas” son glándulas holocrinas en la dermis que secretan una sustancia oleosa y sebo. El término “glándula sudoríparas” se refiere a glándulas que secretan sudor, situadas en la dermis o el tejido subcutáneo, que se abren mediante un conducto en la superficie corporal.

10 El término “epidermis” se refiere a la capa avascular más externa de la piel, derivada del ectodermo embrionario, que varía de grosor entre 0,07-1,4 mm. En las superficies palmares y plantares comprende, desde dentro hacia fuera, cinco capas: capa basal que se compone de células columnares dispuestas en perpendicular; capa espinosa o de células espinosas que se compone de células poliédricas aplanadas con prolongaciones o espinas cortas; capa granular que se compone de células granulosas aplanadas; la capa clara que se compone de varias capas de células claras, transparentes en las que los núcleos están poco definidos o ausentes; y capa córnea que se compone de células no nucleadas, cornificadas y aplanadas. En la epidermis de la superficie corporal general, la capa clara está ausente habitualmente.

Las “heridas por escisión” incluyen desgarros, abrasiones, cortes, pinchazos o laceraciones en la capa epitelial de la piel y pueden extenderse a la capa dérmica e incluso a la grasa subcutánea y más allá. Las heridas por escisión pueden resultar de intervenciones quirúrgicas o de la penetración accidental de la piel.

20 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 de proliferación anómala, por ejemplo, una célula que presenta una tasa de proliferación aumentada o disminuida con relación a una célula normal.

25 El término “pelo/cabello” se refiere a una estructura filiforme, especialmente la estructura epidérmica especializada que se compone de queratina y que se desarrolla a partir de una papila hundida en la dermis, producida sólo por mamíferos y característica de ese grupo de animales. Además, “pelo/cabello” puede referirse al conjunto de tales pelos/cabellos. Un “folículo piloso” se refiere a una de las invaginaciones tubulares de la epidermis que encierran los pelos/cabellos y a partir de las que crecen los mismos. “Células epiteliales de folículo piloso” se refiere a células epiteliales que rodean la papila dérmica en el folículo piloso, por ejemplo, células madre, células de la vaina radicular externa, células de la matriz y células de la vaina radicular interna. Tales células pueden ser células no malignas normales, o células transformadas/inmortalizadas.

30 El término “*hedgehog*” se usa para referirse de manera genérica a cualquier miembro de la familia de *hedgehog*, incluyendo *sonic*, *indian*, *desert* y *tiggy-winkle*. El término puede usarse para indicar proteína o gen. El término también se usa para describir secuencias homólogas / ortólogas en diferentes especies de animales (véase más adelante).

35 Los términos “ruta de señalización de *hedgehog* (HH)”, “ruta de *hedgehog* (HH)” y “ruta de transducción de señales de *hedgehog* (HH)” se usan todos para referirse a la cadena de acontecimientos mediados normalmente por *hedgehog*, *smoothened*, *ptc* y *gli*, entre otros, y que da como resultado cambios en la expresión génica y otros cambios fenotípicos típicos de la actividad *hedgehog*. La ruta de *hedgehog* puede activarse incluso en ausencia de una proteína *hedgehog* mediante la activación de un componente posterior. Por ejemplo, la sobreexpresión de *smoothened* activará la ruta en ausencia de *hedgehog*. La expresión génica de *hedgehog*, *gli* y *ptc* son indicadores de una ruta de señalización de *hedgehog* activa.

40 El término “componente de señalización de HH” se refiere a productos génicos que participan en la ruta de señalización de HH. Frecuentemente un componente de señalización de HH afecta material o sustancialmente a la transmisión de la señal de HH en células / tejidos, que da normalmente como resultado cambios en el grado de cambios fenotípicos y/o del nivel de la expresión posterior.

45 Cada componente de señalización de HH, dependiendo de su función y efectos biológicos sobre el resultado de la activación / expresión génica posterior, puede dividirse en reguladores positivos y 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 acontecimientos biológicos posteriores cuando está presente HH. Los ejemplos incluyen (pero no se limitan a) aquellos genes enumerados en la tabla X a continuación. Un regulador negativo es un componente de señalización de HH que afecta negativamente a la transmisión de la señal de HH, es decir, inhibe acontecimientos biológicos posteriores cuando está presente HH. Los ejemplos incluyen (pero no se limitan a) aquellos genes enumerados en la tabla Y a continuación.

55 El término “antagonista de iARN de *hedgehog*” se refiere a un agente de iARN que inhibe la actividad biológica de un componente de señalización de HH (tal como *hedgehog*, *patched* o *gli1*), de tal manera que reprime la expresión del componente de señalización de HH diana. Por ejemplo, determinados antagonistas de iARN de *hedgehog* preferidos pueden usarse para superar una pérdida de función de *ptc* y/o una ganancia de función de *smoothened*. Otros antagonistas de iARN preferidos pueden usarse para superar un aumento inapropiado de la transducción de

señales de *hedgehog*, ya sea dicho aumento de la transducción de señales el resultado de una mutación/lesión en un componente de la ruta de señalización de *hedgehog* (por ejemplo, *ptc*, *gli1*, *gli3*, *smoothened*, etc.) o ya se produzca dicho aumento de la transducción de señales en el contexto de una célula que no comprende una mutación/lesión en un componente de la ruta de señalización de *hedgehog* (por ejemplo, una célula silvestre con respecto a componentes de la ruta de señalización de *hedgehog*). Un antagonista de iARN puede dirigirse a una proteína codificada por cualquiera de los genes en la ruta de *hedgehog*, incluyendo (pero sin limitarse a) *sonic*, *indian* o *desert hedgehog*, *smoothened*, *ptc-1*, *ptc-2*, *gli-1*, *gli-2*, *gli-3*, etc. En la mayor parte de los casos, el antagonista de iARN inhibirá la actividad de la proteína diana disminuyendo, por ejemplo, la producción de una proteína codificada por cualquiera de los genes en la ruta de *hedgehog*, por tanto o bien regulando por incremento o bien regulando por disminución la señalización de HH. Cuando el antagonista de iARN inhibe la expresión de una proteína diana que funciona normalmente como regulador positivo de la ruta de señalización de *hedgehog*, el efecto global es una disminución o inhibición de señalización de *hedgehog*. Cuando el antagonista de iARN inhibe la expresión de una proteína diana que funciona normalmente como regulador negativo de la ruta de señalización de *hedgehog*, el efecto global es un aumento o fomento de señalización de *hedgehog*.

Además, puede administrarse más de un antagonista, incluyendo antagonistas distintos de iARN de la ruta de señalización de HH, tales como nucleótidos antisentido, anticuerpos frente a proteínas de la ruta de HH, moléculas orgánicas pequeñas, etc. La solicitud estadounidense en tramitación junto con la presente 10/652.298, presentada el 29 de agosto de 2003, describe en detalle diversos moduladores de la ruta de señalización de HH. Por tanto, se contempla además que cuando se administra más de un antagonista de *hedgehog*, dichos agentes pueden inhibir la señalización de *hedgehog* a través del mismo mecanismo o a través de mecanismos diferentes.

El término "ganancia de función de *hedgehog*" se refiere a una modificación o mutación aberrante de un gen *ptc*, gen *hedgehog* o gen *smoothened*, o una disminución (o pérdida) en el nivel de expresión de tal gen, lo que da como resultado un fenotipo que se asemeja a la puesta en contacto de una célula con una proteína *hedgehog*, por ejemplo, la activación aberrante de una ruta de *hedgehog*. La ganancia de función puede incluir una pérdida de la capacidad del producto del gen *ptc* para regular el nivel de expresión de genes de Ci, por ejemplo, *Gli1*, *Gli2* y *Gli3*. El término "ganancia de función de *hedgehog*" también se usa en el presente documento para referirse a cualquier fenotipo celular similar (por ejemplo, que presenta una proliferación excesiva) que se produce debido a una alteración en cualquier sitio en la ruta de transducción de señales de *hedgehog*, incluyendo, pero sin limitarse a, una modificación o mutación del propio *hedgehog*. Por ejemplo, una célula tumoral con una tasa de proliferación anómalamente alta debido a la activación de la ruta de señalización de *hedgehog* tendría un fenotipo de "ganancia de función de *hedgehog*" aunque no esté mutado *hedgehog* en esa célula.

Tal como se usa en el presente documento, "células inmortalizadas" se refiere a células que se han alterado mediante medios químicos y/o recombinantes de tal manera que las células tienen la capacidad de crecer a través de un número infinito de divisiones en cultivo.

"Tejido epitelial interno" se refiere a tejido en el interior del cuerpo que tiene características similares a la capa epidérmica en la piel. Los ejemplos incluyen el revestimiento del intestino. El método de la presente invención es útil para fomentar la cicatrización de determinadas heridas internas, por ejemplo heridas que resultan de cirugía.

El término "queratosis" se refiere a un trastorno proliferativo de la piel caracterizado por hiperplasia de la capa córnea de la epidermis. Los trastornos queratósicos a modo de ejemplo incluyen queratosis folicular, queratosis palmar y plantar, queratosis faríngea, queratosis pilar y queratosis actínica.

"Cuerpos lamelares" se refiere a una estructura subcelular que se encuentra en células pulmonares que son productoras de surfactantes. Se cree que los cuerpos lamelares están en el sitio de la biosíntesis de surfactante pulmonar. Los cuerpos tienen un aspecto membranoso multicapa en una micrografía electrónica.

El término "DL₅₀" significa la dosis de un fármaco que es letal en el 50% de los sujetos de prueba.

El término "uña" se refiere a la placa cutánea córnea en la superficie dorsal del extremo distal de un dedo de la mano o del pie.

El término "sobrexpresión" tal como se usa en referencia a los niveles de expresión génica significa cualquier nivel de expresión génica en células de un tejido que es mayor que el nivel normal de expresión para ese tejido. El nivel normal de expresión para un tejido puede evaluarse midiendo la expresión génica en una parte sana de ese tejido.

El término "pérdida de función de *patched*" se refiere a una modificación o mutación aberrante de un gen *ptc*, o un nivel disminuido de expresión del gen, lo que da como resultado un fenotipo que se asemeja a la puesta en contacto de una célula con una proteína *hedgehog*, por ejemplo, la activación aberrante de una ruta de *hedgehog*. La pérdida de función puede incluir una pérdida de la capacidad del producto del gen *ptc* para regular el nivel de expresión de genes de Ci, por ejemplo, *Gli1*, *Gli2* y *Gli3*.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención, es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto original y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo.

“Condiciones de hibridación convencionales” se refieren a condiciones de sal y temperatura sustancialmente equivalentes a de 0,5 SSC a aproximadamente 5 x SSC y 65°C tanto para la hibridación como para el lavado. Por tanto, el término “condiciones de hibridación convencionales” tal como se usa en el presente documento es una definición operativa y engloba una variedad de condiciones de hibridación. No obstante, con los fines de esta presente divulgación condiciones de “alta rigurosidad” incluyen hibridación con tampón de detección de placas de lisis (polivinilpirrolidona al 0,2%, Ficoll 400 al 0,2%; albúmina sérica bovina al 0,2%, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5); NaCl 1M; pirofosfato de sodio al 0,1%; SDS al 1%); sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón desnaturalizado, sonificado 100 ug/ml a 65°C durante 12-20 horas, y lavado con NaCl 75 mM / citrato de sodio 7,5 mM (0,5 x SSC)/SDS al 1% a 65°C. Condiciones de “baja rigurosidad” incluyen hibridación con tampón de detección de placas de lisis, sulfato de dextrano al 10% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado, sonificado 110 ug/ml a 55°C durante 12-20 horas, y lavado con NaCl 300 mM / citrato de sodio 30 mM (2,0 x SSC)/SDS al 1% a 55°C. Véase también Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, secciones 6.3.1-6.3.6, (1989).

Un “paciente” o “sujeto” que va a tratarse mediante el método objeto puede significar o bien un ser humano o bien un animal no humano.

El término “profármaco” pretende englobar compuestos que, en condiciones fisiológicas, se convierten en los agentes terapéuticamente activos de la presente invención. Un método habitual para producir un profármaco es incluir restos seleccionados que se hidrolizan en condiciones fisiológicas para revelar la molécula deseada. En otras realizaciones, el profármaco se convierte mediante una actividad enzimática del animal huésped.

Tal como se usa en el presente documento, “proliferar” y “proliferación” se refieren a células que experimentan mitosis.

En la totalidad de esta solicitud, el término “trastorno proliferativo de la piel” se refiere a cualquier enfermedad/trastorno de la piel caracterizado por la proliferación no deseada o aberrante de tejido cutáneo. Estos estados se caracterizan normalmente por la proliferación de células epidérmicas o diferenciación celular incompleta, e incluyen, por ejemplo, ictiosis ligada al cromosoma X, psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis alérgica de contacto, hiperqueratosis epidermolítica y dermatitis seborreica. Por ejemplo, la epidermodisplasia es una forma de desarrollo defectuoso de la epidermis. Otro ejemplo es la “epidermolisis”, que se refiere a un estado flácido de la epidermis con formación de vesículas y ampollas o bien espontáneamente o bien en el sitio de traumatismo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “psoriasis” se refiere a un trastorno 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 engrosada, queratinización anómala, infiltrados de células inflamatorias en la capa de la dermis e infiltración de leucocitos polimorfonucleares en la capa de la epidermis que da como resultado un aumento del ciclo de células basales. Adicionalmente, están presentes células hiperqueratósicas y paraqueratósicas.

El término “piel” se refiere a la cubierta protectora exterior del cuerpo, que consiste en la dermis y la epidermis, y se entiende que incluye glándulas sudoríparas y sebáceas, así como estructuras de folículo piloso. En la totalidad de la presente solicitud, puede usarse el adjetivo “cutáneo”, y debe entenderse que se refiere, en general, a atributos de la piel, según sea apropiado para el contexto en que se usan.

El término “carcinoma de células pequeñas” se refiere a un tipo de neoplasia maligna, habitualmente de los bronquios. Las células del tumor tienen características de tipo endocrino y pueden secretar una o más de una amplia variedad de hormonas, especialmente péptidos reguladores como bombesina.

El término “ganancia de función de *smoothened*” se refiere a una modificación o mutación aberrante de un gen *smo*, o un nivel aumentado de expresión del gen, lo que da como resultado un fenotipo que se asemeja a la puesta en contacto de una célula con una proteína *hedgehog*, por ejemplo, la activación aberrante de una ruta de *hedgehog*. Aunque no se desea limitarse por ninguna teoría particular, se indica que *ptc* no puede señalar directamente en la célula, sino interactuar más bien con *smoothened*, otra proteína unida a membrana ubicada de manera posterior a *ptc* en la señalización de *hedgehog* (Marigo *et al.*, (1996) Nature 384: 177-179). El gen *smo* es un gen de polaridad de segmento requerido para la formación de patrones correctos de cada segmento en *Drosophila* (Alcedo *et al.*, (1996) Cell 86: 221-232). Se han identificados homólogos humanos de *smo*. Véanse, por ejemplo, Stone *et al.* (1996) Nature 384:129-134, y el registro de GenBank U84401. El gen *smoothened* codifica para una proteína integral de membrana con características de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricos; es decir, regiones de 7 cruces transmembrana. Esta proteína muestra homología con la proteína *Frizzled* (Fz) de *Drosophila*, un miembro de la ruta de *wingless*. Originariamente, se pensaba que *smo* codifica para un receptor de la señal de Hh. Sin embargo, posteriormente se rebatió esta sugerencia, al obtenerse evidencias de que *ptc* era el receptor de Hh. Las células que expresan *Smo* no pueden unirse a Hh, lo que indica que *smo* no interactúa directamente con Hh (Nusse, (1996) Nature 384: 119-120). Más bien, se cree que la unión de *Sonic hedgehog* (SHH) a su receptor, *PTCH*, impide la inhibición normal por *PTCH* de *smoothened* (SMO), una proteína de 7 cruces transmembrana.

Recientemente, se ha notificado que se producen mutaciones de *smoothened* activantes en carcinoma de células basales esporádico, Xie *et al.* (1998) Nature 391: 90-2, y tumores neuroectodérmicos primitivos del sistema nervioso central, Reifenger *et al.* (1998) Cancer Res 58: 1798-803.

El término “índice terapéutico” se refiere al índice terapéutico de un fármaco definido como DL₅₀/DE₅₀.

5 Tal como se usa en el presente documento, “células transformadas” se refiere a células que se han convertido espontáneamente a un estado de crecimiento incontrolado, es decir, han adquirido la capacidad para crecer a través de un número infinito de divisiones en cultivo. Las células transformadas pueden caracterizarse mediante términos tales como neoplásicas, anaplásicas y/o hiperplásicas, con respecto a su pérdida de control del crecimiento.

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

III. *Dianas a modo de ejemplo de la ruta de señalización de hedgehog*

15 *Hedgehog*, que codifica para una molécula de señalización secretada, se identificó originariamente en *Drosophila* como gen esencial de formación de patrones embrionarios. Posteriormente, se descubrieron miembros de la familia de Hh en diversas especies, incluyendo en ser humano, en el que ejercen una amplia variedad de efectos de desarrollo (véanse, por ejemplo, Ho y Scott, Curr. Opin. Neurobiol. 12, 57-63, 2002; Ingham y McMahon, Genes Dev. 15, 3059-3087, 2001). De interés adicional, la señalización aberrante de HH se asocia con varias enfermedades humanas, incluyendo varios tipos de cáncer (para su revisión, véanse Bale, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 3, 47-65, 2002; Taipale y Beachy, Nature 411, 349-354, 2001). A partir de intensas investigaciones genéticas y bioquímicas, ha surgido la siguiente visión de la ruta de señalización de Hh (figura 1) (para su revisión, véase Nybakken y Perrimon, Curr. Opin. Genet. Dev. 12, 503-511, 2002).

25 En ausencia de Hh, el receptor transmembrana, Patched (Ptc), inhibe una segunda proteína unida a membrana, Smoothened (Smo). Este proceso permite que un complejo de proteína de alto peso molecular intracelular (que incluye la molécula relacionada con kinesina, Costal2 (Cos2), la proteína cinasa serina-treonina Fused (Fu), y la proteína supresora de fused [Su(fu)]), fomente el procesamiento proteolítico de Cubitus interruptus de longitud completa (Ci155), generando de ese modo un represor transcripcional Ci75. Aunque no se ha demostrado aún que interactúe directamente con el complejo inhibidor, la proteína cinasa A (PKA), glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) y caseína cinasa 1α (CK1α) también modifican Ci para regular su escisión. Este proceso también depende de Slimb. La unión de Hh a Ptc libera la inhibición de Smo y, mediante un mecanismo desconocido, Smo suprime la actividad de procesamiento de Ci del complejo citoplasmático. Entonces el Ci155 sin procesar se transloca al núcleo, en el que activa la expresión de genes diana específicos.

30 Recientemente, Lum *et al.* (Science 299: 2039-2045, 2003) identificaron varios miembros adicionales de la ruta de señalización de HH. Usando ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, estos autores identificaron cuatro genes cuyos productos no se había reconocido previamente que tuviesen papeles específicos en la señalización de Hh: *CK1α*, *dally-like (dlp)*, *caupolican (caup)* y el gen predicho, *CG9211*. Entre ellos, *CK1α* es un regulador negativo, mientras que *dlp*, *caup* y *CG9211* son todos reguladores positivos.

35 Todos los genes de la ruta de señalización de HH en diversas especies pueden obtenerse de manera rutinaria de bases de datos públicas y privadas, tales como GenBank, EMBL, FlyBase, por mencionar sólo algunas. En determinados organismos, tales como ser humano y *Drosophila*, se secuencian el genoma completo, y pueden usarse programas de comparación de secuencias, tales como la serie de programas BLAST ofrecida en Internet en el sitio web de NCBI para recuperar las secuencias más actualizadas de cualquier gen conocido de la ruta de señales de HH. Las siguientes tablas enumeran varios miembros representativos de los genes conocidos de la ruta de señalización de HH en diversas especies. No es exhaustivo en modo alguno, y no deben considerarse limitativas en ningún sentido. Más bien, sirven como punto de partida útil para una búsqueda exhaustiva, pudiendo un experto en la técnica realizar estas búsquedas usando técnicas biológicas de rutina. Algunos genes pueden tener varias entradas en bases de datos diferentes con números de registro diferentes, pero no obstante tiene una secuencia igual o casi igual. Independientemente, sólo se proporciona una entrada para cada gen en las tablas a continuación.

40 Los genes se enumeran como reguladores o bien positivos o bien negativos de la ruta de señalización de HH. Por tanto, un antagonista de iARN que inhibe un regulador positivo será útil para regular por disminución la señalización de HH, por ejemplo, en condiciones que implican hiperactividad de la señalización de HH. En cambio, un antagonista de iARN que inhibe un regulador negativo será útil para regular por incremento la señalización de HH, por ejemplo, en condiciones que implican hipoactividad de la señalización de HH.

Tabla X. Reguladores positivos de la señalización de HH

<i>Drosophila</i> (n.º de reg.)	Otras especies (n.º de reg.)
------------------------------------	------------------------------

Hh (NM_079735)	Shh humano (NM_000193); Ihh humano (XM_050846); Dhh humano (NM_021044). Shh de ratón (NM_009170); Shh de rata (NM_017221); Shh de vaca (AF144100); Shh de musaraña casera (AB081406); Shh de pollo (L28099); Shh de tritón de vientre de fuego japonés (D63339); Shh de falso halibut del Japón (AB029748); Shh de pintarroja (AF393835); Shh de <i>Eleutherodactylus coqui</i> (AF113403); proteína relacionada con Shh de gallipato (AF003532); Shh de <i>Xenopus</i> (L39213); Shh de <i>Takifugu rubripes</i> (AJ507296); Shh de pez cebra (NM_131063); Ihh de ratón (NM_010544.); Ihh de rata (XM_237298); Ihh de pollo (U58511); banded HH de <i>Xenopus</i> (U26404); Twhh de pez cebra (NM_131199).
Smo (NM_078719)	Smo humano (U84401); Smo de rata (U84402); Smo de ratón (XM_133018); Smo de <i>Xenopus</i> (AF302766); Smo de pez cebra (AF395809); Smo de pollo (AF019977).
dip (AF317090)	Homólogo humano (AF030186); homólogo de ratón (X83577); homólogo de rata (L02896); homólogo de pez cebra (AF354754); homólogo de pollo (L29089).
CG9211 (Proteína: AAF52461; véase AE003615 para el nucleótido)	Homólogo humano (AY027658); homólogo de ratón (AF388037); homólogo de rata (U68726); homólogo de <i>Xenopus</i> (AF388036); homólogo de pez cebra (AF461120).
Caup (X95178)	Homólogo humano (AF124733); homólogo de ratón (AF124732); homólogo de <i>Xenopus</i> (AF338157); homólogo de pollo (AF091504); homólogo de pez cebra (AY017309).
Ci (X54360)	Gli humano (NM_005269); Gli2 humano (4 variantes: NM_030379, NM_030380, NM_030381, NM_005270); Gli3 humano (NM_000168); Gli4 humano (NM_138465); Gli de ratón (NM_010296); Gli1 de rata (XM_235221); Gli1 de caballo (AF510668); Gli1 de pollo (U60762); Gli1 de <i>Xenopus</i> (U57454); Gli1 de pez cebra (NM_178296); Gli2 de ratón (XM_196215); Gli2 de rata (XM_222557); Gli2 de pollo (AF022818); Gli2 de pez cebra (AF085746); Gli3 de ratón (NM_008130); Gli3 de rata (XM_225412); Gli3 de pollo (U60763); Gli3 de codorniz común (AF231112); Gli3 de <i>Xenopus</i> (U42461); Gli3 de tritón del este (AF316110); Gli4 de <i>Xenopus</i> (U42462).
Fu (Proteína P23647, véase X80468 para el gen)	Homólogo humano (AF200815); homólogo de ratón (AF195272, AK006827, AF124142); homólogo de rata (NM_019232, D49836); homólogo de conejo (AF139639); homólogo de <i>Xenopus</i> (AF057138); homólogo de mielga (AJ223715); homólogo de pollo (AF039943); homólogo de vaca (X61036); homólogo de pez cebra (BC052134).

* Se enumeran los números de registro de secuencia de nucleótidos de las bases de datos públicas entre “()”.

Tabla Y. Reguladores negativos de la señalización de HH

<i>Drosophila</i> (n.º de reg.)	Otras especies (n.º de reg.)
Ptc (M28999)	PTC1 humano (U59464); PTC2 humano (AF091501); Ptc1 de ratón (U46155); Ptc1 de rata (AF079162); Ptc1 de <i>Xenopus</i> (AF302765); Ptc1 de pollo (U40074); Ptc1 de pez cebra (X98883); Ptc1 de tritón de vientre de fuego japonés (AB000848); Ptc2 de ratón (AB010833); Ptc2 de pollo (AF409095); Ptc2 de <i>Xenopus</i> (AB037688); Ptc2 de pez cebra (AJ007742); Ptc2 de tritón de vientre de fuego japonés (AB000846)
Cos2 (AF019250)	Homólogo humano (AY237538); homólogo de rata (XM_218828); homólogo de ratón (XM_133575); homólogo de <i>Anopheles gambiae</i> cepa PEST (XM_309818).
Su(fu) (NM_080502)	SUFU humano (NM_016169); homólogo de ratón (AJ131692); homólogo de rata (XM_219957); homólogo de pollo (AF487888); homólogo de <i>Anopheles gambiae</i> cepa PEST (XM_321114); homólogo de pez cebra (BC045348).
Sgg (X70862)	GSK3β humano (L33801); GSK3β de ratón (AF156099); GSK3β de rata (X53428); GSK3β de pez cebra (AB032265); GSK3β de <i>Xenopus</i> (U31862).
Pka-C1 (AY069425)	PKA-C1 humano (X07767, M34181, M34182); homólogo de rata (X57986); homólogo de ratón (BC003238); homólogo de oveja (AF238979); homólogo bovino (X67154); homólogo de cerdo (X05998); homólogo de conejo (AF367428); homólogo de hámster (M63311); homólogo de <i>Xenopus</i> (AJ413219).

CK1 α (A Ψ 069346)	Homólogo humano (X80693); homólogo de ratón (BC019740); homólogo de rata (U77582); homólogo de pollo (AF042862); homólogo de oveja (AB050945); homólogo bovino (AB050944); homólogo de cerdo (F22872).
Slmb (AF032878)	Homólogo humano (AF101784; AF176022); homólogo de ratón (AF391190); de <i>Xenopus</i> (M98268); de pollo (AF113946).

* Se enumeran los números de registro de secuencia de nucleótidos de las bases de datos públicas entre “()”.

5 *Patched* se identificó originariamente en *Drosophila* como gen de polaridad de segmento, uno de un grupo de genes de desarrollo que afectan a la diferenciación celular dentro de los segmentos individuales que se producen en una serie homóloga a lo largo del eje anterior-posterior del embrión. Véanse Hooper, J.E. *et al.* (1989) Cell 59:751; y Nakano, Y. *et al.* (1989) Nature 341:508. Los patrones de expresión del homólogo de vertebrados de *patched* sugieren su implicación en el desarrollo del tubo neural, el esqueleto, los miembros, la estructura craneofacial y la piel.

10 Unos estudios genéticos y funcionales demuestran que *patched* forma parte de la cascada de señalización de *hedgehog*, una ruta conservada evolutivamente que regula la expresión de varios genes posteriores. Véanse Perrimon, N. (1995) Cell 80:517; y Perrimon, N. (1996) Cell 86:513. *Patched* participa en la represión transcripcional constitutiva de los genes diana; a su efecto se opone una glicoproteína secretada, codificada por *hedgehog*, o un homólogo de vertebrados, que induce activación transcripcional. Los genes bajo el control de esta ruta incluyen miembros de las familias de Wnt y TGF-beta.

15 Las proteínas *Patched* presentan dos grandes dominios extracelulares, doce segmentos transmembrana y varios segmentos citoplasmáticos. Véanse Hooper, citado anteriormente; Nakano, citado anteriormente; Johnson, R.L. *et al.* (1996) Science 272:1668; y Hahn, H. *et al.* (1996) Cell 85:841. El papel bioquímico de *patched* en la ruta de señalización de *hedgehog* es poco claro. Sin embargo, se ha notificado la interacción directa con la proteína *hedgehog* (Chen, Y. *et al.* (1996) Cell 87:553), y *patched* puede participar en un complejo de receptor de *hedgehog* junto con otra proteína transmembrana codificada por el gen *smoothed*. Véanse Perrimon, citado anteriormente; y Chen, citado anteriormente.

20 El homólogo humano de *patched* se clonó y se mapeó en el cromosoma 9q22.3. Véanse Johnson, citado anteriormente; y Hahn, citado anteriormente. Se ha implicado esta región en síndrome del nevo de células basales (SNCB), que se caracteriza por anomalías del desarrollo incluyendo alteraciones de las costillas y craneofaciales, anomalías de las manos y los pies y espina bífida.

25 Algunos tumores esporádicos también demostraron una pérdida de ambos alelos funcionales de *patched*. De doce tumores en los que se identificaron mutaciones de *patched* con un ensayo de detección de polimorfismos conformacionales de cadena única, nueve tuvieron una delección cromosómica del segundo alelo y los otros tres tuvieron mutaciones inactivantes en ambos alelos (Gailani, citado anteriormente). Las alteraciones no se produjeron en el ADN de línea germinal correspondiente.

30 La mayor parte de las mutaciones identificadas dieron como resultado codones de terminación prematuros o desplazamientos del marco (Lench, N.J., *et al.*, Hum. Genet. Oct. de 1997; 100(5-6): 497-502). Sin embargo, varias fueron mutaciones puntuales que condujeron a sustituciones de aminoácidos en dominios o bien extracelulares o bien citoplasmáticos. Estos sitios de mutación pueden indicar importancia funcional para la interacción con proteínas extracelulares o con miembros citoplasmáticos de ruta de señalización posterior.

35 La implicación de *patched* en la inhibición de la expresión génica y la aparición de frecuentes deleciones alélicas de *patched* en BCC respaldan una función de supresión tumoral para este gen. Su papel en la regulación de familias de genes que se sabe que están implicadas en la señalización celular y comunicación intercelular proporciona un posible mecanismo de supresión tumoral.

40 *CK1 α* es un regulador positivo de la escisión de Ci, un proceso que genera su forma represora (Price y Kalderon, Cell 108, 823-835, 2002, figura 1). Por tanto, *CK1 α* es un regulador negativo de la señalización de Hh. En cambio, *dlp* es un transductor positivo de la señal de Hh. Este último resultado concuerda con que *dlp* codifica para un proteoglicano de sulfato de heparano (HSPG) de superficie celular de la clase de glicoproteínas, porque se sabe que tales moléculas funcionan como correceptores para diversos ligandos extracelulares (Nybakken y Perrimon, Biochim. Biophys. Acta 1573, 280-291, 2002). Lum *et al.* presentaron evidencias adicionales de que Dlp actúa de manera anterior o junto con Ptc, posiblemente concentrando Hh libre en la superficie celular o presentando Hh al receptor de Ptc.

50 De interés es que Lum *et al.* notificaron que un inhibidor de *dlp* no tenía ningún efecto en el ensayo en cultivo celular específico de Wg. Este resultado sugiere que, en contraposición a su participación en la señalización de Hh, Dlp media en efectos de Wg que no son autónomos de la célula. Este modelo concuerda con experimentos genéticos previos que implicaron la participación de *dlp* en la regulación de la distribución extracelular de Wg. Por tanto, Dlp parece desempeñar diferentes papeles en las rutas de señalización de Hh y Wg, y puede usarse como diana específica de la ruta de HH.

El gen *caup* se había descrito previamente como mediador posterior de la señalización de Hh durante el desarrollo de las alas (Gomez-Skarmeta y Modolell, *Genes Dev.* 10, 2935-2945, 1996), por tanto su detección como regulador positivo de la ruta de Hh fue algo sorprendente. *Caup*, que es un factor de transcripción de homeodominio, podría estar implicado de manera concebible en un bucle de realimentación positiva que amplifica la señal de Hh, quizás mediante la activación de la expresión de componentes de señalización positiva proximales (figura 1).

Se predice que *CG9211* codifica para una proteína de superficie celular que tiene repeticiones de dominio de inmunoglobulina y repeticiones de fibronectina tipo III. Es posible que este factor pueda funcionar como regulador positivo de Hh interaccionando con y modulando la actividad de otros componentes unidos a membrana de la ruta de Hh tal como *Ptc* y *Smo*. Alternativamente, *CG9211* podría mediar en una ruta de señalización paralela que influye en las respuestas a Hh (figura 1).

La identificación de nuevos componentes de la ruta de señalización en *Drosophila* también tiene implicaciones para la enfermedad humana. Por ejemplo, el papel de *CK1 α* en la regulación de la actividad basal de las rutas de señalización tanto de Wg como de Hh sugiere que podría actuar como supresor tumoral en cáncer de colon, carcinoma de células basales, rhabdomyosarcoma o meduloblastoma. Estos tumores se asocian con la actividad inapropiada de una u otra ruta, excepto el meduloblastoma, que se asocia con la activación de ambas (Taipale y Beachy, *Nature* 411, 349, 2001). En el caso de *Dlp*, *GPC4* y *GPC6* son los miembros más estrechamente relacionados de los seis miembros de la familia de glicoproteínas de mamíferos (De Cat y David, *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 117, 2001). *GPC6* se mapea en 13q32 (Paine-Saunders *et al.*, *Genomics* 57, 455, 1999), un locus cromosómico humano cuya delección (síndrome de 13q32) se asocia con defectos, incluyendo holoprosencefalia (HPE), malformaciones anogenitales y ausencia de pulgar (Brown *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 57, 859, 1995); todas estas malformaciones concuerdan con la pérdida de grados variables de señalización de Sonic hedgehog (Ramalho-Santos *et al.*, *Development* 127, 2763, 2000; Chiang *et al.*, *Nature* 383, 407, 1996). Si los niveles de *GPC6* son limitantes en la capacidad de respuesta a Hh de mamíferos, entonces la pérdida de la función de *GPC6* puede desempeñar un papel en malformaciones por el síndrome de 13q32, posiblemente junto con otros genes de HPE en o cerca de esta región (Brown *et al.*, *Nature Genet.* 20, 180, 1998). Finalmente, la mutación de *CDO*, el homólogo de mamíferos de *CG9211*, da como resultado una forma de HPE (Cole y Krauss, *Curr. Biol.* 13, 411, 2003), que concuerda con un papel de *CDO* en la señalización.

IV. Método para identificar componentes adicionales de la ruta de señalización de HH

El enfoque de iARN usado en Lum *et al.* (citado anteriormente) puede extenderse para cubrir el genoma completo de cualquier organismo dado, especialmente en organismos modelo tales como gusano, *Drosophila*, peces, roedores y ser humano cuando están disponibles fácilmente numerosas líneas celulares establecidas. Lum *et al.* (citado anteriormente) proporcionan un ejemplo de tal examen a gran escala de bibliotecas de iARN de cinasa-fosfatasa, usando la información proporcionada por el genoma de *Drosophila* secuenciado (Morrison *et al.*, *J. Cell Biol.* 150, F57, 2000). Como resultado, se identificaron 4 componentes adicionales de la señalización de HH. Tal examen *in vitro* preliminar puede realizarse en un modo con alto rendimiento para permitir el rápido examen de todos los genes dentro de un organismo, o al menos un subconjunto específico de genes dentro de ese organismo, tal como todas las cinasas, etc. (véase Lum *et al.*, citado anteriormente). Los resultados obtenidos de estos exámenes *in vitro* pueden verificarse *in vivo*, o en otros ensayos independientes para validar el papel de cualquier componente de la ruta de señalización de HH identificado. Estos componentes validados pueden seleccionarse entonces para exámenes de antagonistas de iARN específicos para lograr el objetivo final de modular la señalización de HH, tanto *in vitro* como *in vivo*. Obviamente, también pueden usarse medios genéticos, bioquímicos tradicionales, o bien solos o bien en combinación, para identificar componentes adicionales de la ruta de señalización de HH.

En teoría, puede examinarse cualquier proceso biológico usando este método siempre que pueda desarrollarse un rápido procedimiento de examen para monitorizar su función. Por ejemplo, ensayos basados en fluorescencia de proliferación celular, apoptosis, división celular, fagocitosis, interacciones entre proteínas, fusión celular o entrada viral son susceptibles de estudios de iARN. En el presente caso, las funciones biológicas de los componentes de señalización de HH se han estudiado bien, y está dentro de la práctica rutinaria de un experto en la técnica desarrollar ensayos funcionales para cualquiera de los componentes de señalización de HH. También es factible adaptar iARN para estudiar células primarias en cultivo, con lo que podrían examinarse diversos acontecimientos de diferenciación. Además, debe ser posible concebir esquemas de examen en los que puedan analizarse fenotipos sintéticos, modificadores genéticos y efectos farmacológicos particulares con métodos de iARN.

No ha sido posible hasta hace poco aplicar enfoques de iARN a células de mamífero porque ARNbc largos estimulan una respuesta antiviral en la que participa interferón y otras rutas intracelulares que provocan conjuntamente una inhibición generalizada de la síntesis de proteínas y posterior apoptosis. Sin embargo, ARNbc específicos de genes de 21 a 23 nucleótidos inhiben eficazmente la función génica en células de mamífero sin estimular la respuesta de interferón (Watanabe *et al.*, *J. Cell. Biol.* 130, 1207, 1995; Song y Filmus, *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 241, 2002). Estos ARNip o de interferencia cortos pueden sintetizarse *in vitro* y transfectarse directamente en células. Alternativamente, pueden transformarse de manera estable células de mamífero con un vector de ADN que dirige la expresión de un precursor en horquilla correspondiente a la región codificante de interés; el transcrito resultante se procesa posteriormente para dar un ARNip específico que selecciona como diana el gen deseado. Con estos avances, y bibliotecas de ARNip apropiadas, es posible emprender exámenes

informativos de iARN en células de mamífero, incluyendo estrategias diseñadas para identificar dianas farmacológicas novedosas. Sin embargo, incluso en ausencia de examen directo en células de mamífero, también puede aplicarse la información sobre la ruta de Hh recopilada de los estudios llevados a cabo en otros organismos modelo tales como *Drosophila* a las eucariotas superiores, debido al alto grado de conservación funcional en esta ruta de señalización.

V. Antagonistas de iARN a modo de ejemplo y síntesis de los mismos

Los constructos de iARN comprenden ARN bicatenario que puede bloquear específicamente la expresión de un gen diana. Por consiguiente, los constructos de iARN pueden actuar como antagonistas bloqueando específicamente la expresión de un gen particular. “Interferencia de ARN” o “iARN” es un término aplicado inicialmente a un fenómeno observado en plantas y gusanos en el que ARN bicatenario (ARNbc) bloquea la expresión génica de manera específica y postranscripcional. Sin querer limitarse por la teoría, iARN parece participar en la degradación de ARNm; sin embargo, los mecanismos bioquímicos son actualmente un área de investigación activa. A pesar de cierta incertidumbre con respecto al mecanismo de acción, iARN proporciona un método útil de inhibición de la expresión génica *in vitro* o *in vivo*.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ARNbc” se refiere a moléculas de ARNip, u otras moléculas de ARN que incluyen una característica bicatenaria y pueden procesarse para dar ARNip en células, tales como restos de ARN en horquilla.

El término “pérdida de función”, cuando se refiere a genes inhibidos por el método de iARN objeto, se refiere a una disminución del nivel de expresión de un gen en comparación con el nivel en ausencia de constructos de iARN.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “media en iARN” se refiere a (indica) la capacidad para distinguir qué ARN van a degradarse mediante el procedimiento de iARN, por ejemplo, se produce degradación de manera específica de secuencia en vez de mediante una respuesta de ARNbc independiente de secuencia, por ejemplo, una respuesta de PKR.

Tal como se usa en el presente documento, el término “constructo de iARN” es un término genérico usado en la totalidad de la memoria descriptiva para incluir los ARN interferentes pequeños (ARNip), ARN en horquilla y otras especies de ARN que pueden escindirse *in vivo* para formar ARNip. Los constructos de iARN en el presente documento también incluyen vectores de expresión (también denominados vectores de expresión de iARN) que pueden dar lugar a transcritos que forman los ARNbc o ARN en horquilla en células, y/o transcritos que pueden producir ARNip *in vivo*.

“Vector de expresión de iARN” (también denominado en el presente documento “plásmido que codifica para ARNbc”) se refiere a constructos de ácido nucleico replicables usados para expresar (transcribir) ARN que producen restos de ARNip en la célula en la que se expresa el constructo. Tales vectores incluyen una unidad transcripcional que comprende un ensamblaje de (1) elemento(s) genético(s) que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores, operadores o potenciadores, operativamente unidos a (2) una secuencia “codificante” que se transcribe para producir un ARN bicatenario (dos restos de ARN que hibridan en la célula para formar un ARNip, o un ARN en horquilla simple que puede procesarse para dar un ARNip), y (3) secuencias de iniciación y terminación de la transcripción apropiadas. La elección del promotor y otros elementos reguladores varía generalmente según la célula huésped pretendida. En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de “plásmidos” que se refieren a bucles de ADN bicatenario circular que, en su forma de vector, no se unen en el cromosoma. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” se usan de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma usada más habitualmente de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión que sirven para funciones equivalentes y que se conozcan posteriormente en la técnica para ello.

Los constructos de iARN contienen una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones fisiológicas de la célula con la secuencia de nucleótidos de al menos una parte del transcrito de ARNm para que se inhiba el gen (es decir, el gen “diana”). Sólo es necesario que el ARN bicatenario sea suficientemente similar al ARN natural que tiene la capacidad para mediar en iARN. Por tanto, la invención tiene la ventaja de poder tolerar variaciones de secuencia que podrían esperarse debido a mutación genética, polimorfismo de cepa o divergencia evolutiva. El número de apareamientos erróneos de nucleótidos tolerados entre la secuencia diana y la secuencia del constructo de iARN es de no más de 1 de cada 5 pares de bases, o 1 de cada 10 pares de bases, o 1 de cada 20 pares de bases, o 1 de cada 50 pares de bases. Los apareamientos erróneos en el centro del dúplex de ARNip son los más críticos y pueden suprimir esencialmente la escisión del ARN diana. En cambio, los nucleótidos en el extremo 3' de la cadena de ARNip que es complementaria al ARN diana no contribuyen significativamente a la especificidad del reconocimiento de la diana.

Puede optimizarse la identidad de secuencia mediante algoritmos de comparación y alineación de secuencias conocidos en la técnica (véase Gribskov y Devereux, Sequence Analysis Primer, Stockton Press, 1991, y las referencias citadas en ese documento) y calculando la diferencia en porcentaje entre las secuencias de nucleótidos mediante, por ejemplo, el algoritmo de Smith-Waterman implementado en el programa de software BESTFIT usando

los parámetros por defecto (por ejemplo, Grupo de Computación Genética de la Universidad de Wisconsin). Se prefiere una identidad de secuencia de más del 90% o incluso una identidad de secuencia del 100%, entre el ARN inhibidor y la parte del gen diana. Alternativamente, la región de dúplex del ARN puede definirse funcionalmente como una secuencia de nucleótidos que puede dar hibridación con una parte del transcrito del gen diana (por ejemplo, NaCl 400 mM, PIPES 40 mM, pH 6,4, EDTA 1 mM, hibridación a 50°C o 70°C durante 12-16 horas; seguido por lavado).

La producción de constructos de iARN puede llevarse a cabo mediante métodos de síntesis química o mediante técnicas de ácido nucleico recombinantes. La ARN polimerasa endógena de la célula tratada puede mediar en la transcripción *in vivo*, o puede usarse ARN polimerasa clonada para la transcripción *in vitro*. Los constructos de iARN pueden incluir modificaciones o bien de la estructura principal de fosfato-azúcar o bien del nucleósido, por ejemplo, para reducir la susceptibilidad a nucleasas celulares, mejorar la biodisponibilidad, mejorar las características de formulación, y/o cambiar otras propiedades farmacocinéticas. Por ejemplo, pueden modificarse las uniones fosfodiéster de ARN natural para que incluyan al menos uno de un heteroátomo de nitrógeno o azufre. Pueden personalizarse las modificaciones en la estructura de ARN para permitir una inhibición genética específica mientras que se evita una respuesta general a ARNbc. Asimismo, pueden modificarse bases para bloquear la actividad de adenosina desaminasa. El constructo de iARN puede producirse de manera enzimática o mediante síntesis orgánica parcial/total, puede introducirse cualquier ribonucleótido modificado mediante síntesis orgánica o enzimática *in vitro*.

Pueden adaptarse métodos de modificación química de moléculas de ARN para modificar constructos de iARN (véanse, por ejemplo, Heidenreich *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res*, 25:776-780; Wilson *et al.* (1994) *J Mol Recog* 7:89-98; Chen *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res* 23:2661-2668; Hirschbein *et al.* (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7:55-61). Meramente para ilustrarlo, la estructura principal de un constructo de iARN puede modificarse con fosforotioatos, fosforamidato, fosfoditioatos, metilfosfonato-fosfodiésteres quiméricos, ácidos nucleicos peptídicos, oligómeros que contienen 5-propinil-pirimidina o modificaciones de azúcares (por ejemplo, ribonucleósidos 2'-sustituídos, configuración a).

La estructura bicatenaria puede estar formada por una única cadena de ARN autocomplementaria o dos cadenas de ARN complementarias. Puede iniciarse la formación de dúplex de ARN o bien en el interior o bien en el exterior de la célula. El ARN puede introducirse en una cantidad que permite el suministro de al menos un copia por célula. Dosis mayores (por ejemplo, al menos 5, 10, 100, 500 ó 1000 copias por célula) de material bicatenario pueden producir una inhibición más eficaz, mientras que dosis menores también pueden ser para aplicaciones específicas. La inhibición es específica de secuencia porque se seleccionan como diana secuencias de nucleótidos correspondientes a la región de dúplex de ARN para la inhibición genética.

En determinadas realizaciones, los constructos de iARN objeto son "los ARN interferentes pequeños" o "ARNip". Estos ácidos nucleicos tienen aproximadamente 19-30 nucleótidos de longitud, e incluso más preferiblemente 21-23 nucleótidos de longitud, por ejemplo, correspondientes en cuanto a longitud a los fragmentos generados por el "corte con nucleasa Dicer" de ARN bicatenarios más largos. Los ARNip son bicatenarios, y pueden incluir proyecciones cortas en cada extremo. Preferiblemente, las proyecciones tienen 1-6 nucleótidos de longitud en el extremo 3'. Se conoce en la técnica que los ARNip pueden sintetizarse químicamente, o derivarse de un ARN bicatenario más largo o un ARN en horquilla. Los ARNip tienen una similitud de secuencia significativa con un ARN diana de modo que los ARNip pueden aparearse con el ARN diana y dan como resultado degradación específica de secuencia del ARN diana a través de un mecanismo de interferencia de ARN. Se entiende que los ARNip reclutan complejos de nucleasa y guían los complejos hasta el ARNm diana mediante apareamiento con las secuencias específicas. Como resultado, el ARNm diana se degrada por las nucleasas en el complejo de proteína. En una realización particular, las moléculas de ARNip de 21-23 nucleótidos comprenden un grupo 3'-hidroxilo.

Las moléculas de ARNip de la presente invención pueden obtenerse usando varias técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el ARNip puede sintetizarse químicamente o producirse de manera recombinante usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden sintetizarse oligómeros de ARN sentido y antisentido cortos e hibridar para formar estructuras de ARN bicatenario con proyecciones de 2 nucleótidos en cada extremo (Caplen, *et al.* (2001) *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:9742-9747; Elbashir, *et al.* (2001) *EMBO J*, 20:6877-88). Estas estructuras de ARNip bicatenario pueden introducirse entonces directamente en células, o bien mediante captación pasiva o bien un sistema de suministro de elección, tal como se describe más adelante.

En determinadas realizaciones, los constructos de ARNip pueden generarse mediante procesamiento de ARN bicatenarios más largos, por ejemplo, en presencia de la enzima Dicer. En una realización, se usa el sistema de *Drosophila in vitro*. En esta realización, se combina ARNbc con un extracto soluble derivado de embrión de *Drosophila*, produciendo de ese modo una combinación. La combinación se mantiene en condiciones en las que se procesa el ARNbc para dar moléculas de ARN de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos.

Las moléculas de ARNip pueden purificarse usando varias técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse electroforesis en gel para purificar los ARNip. Alternativamente, pueden usarse métodos no desnaturizantes, tales como cromatografía en columna no desnaturizante, para purificar los ARNip. Además, puede usarse cromatografía (por ejemplo, cromatografía de exclusión molecular), centrifugación en gradiente de glicerol, purificación de afinidad con anticuerpo para purificar los ARNip.

En determinadas realizaciones preferidas, al menos una cadena de las moléculas de ARNip tiene una proyección en 3' de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 6 nucleótidos de longitud, aunque puede tener desde 2 hasta 4 nucleótidos de longitud. Más preferiblemente, las proyecciones en 3' tienen 1-3 nucleótidos de longitud. En determinadas realizaciones, una cadena que tiene una proyección en 3' y siendo la otra cadena de extremos romos o que tiene también una proyección. La longitud de las proyecciones puede ser igual o diferente para cada cadena. Para potenciar adicionalmente la estabilidad del ARNip, las proyecciones en 3' pueden estabilizarse frente a la degradación. En una realización, el ARN se estabiliza incluyendo nucleótidos de purina, tales como los nucleótidos adenosina o guanosina. Alternativamente, se tolera la sustitución de nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, por ejemplo, la sustitución de proyecciones en 3' de nucleótido de uridina por 2'-desoxitimidina, y no afecta a la eficiencia del iARN. La ausencia de un 2'-hidroxilo potencia significativamente la resistencia a nucleasa de la proyección en medio de cultivo tisular y puede ser beneficioso *in vivo*.

En otras realizaciones, el constructo de iARN está en forma de un ARN bicatenario largo. En determinadas realizaciones, el constructo de iARN tiene al menos 25, 50, 100, 200, 300 ó 400 bases. En determinadas realizaciones, el constructo de iARN tiene 400-800 bases de longitud. Los ARN bicatenarios se digieren a nivel intracelular, por ejemplo, para producir secuencias de ARNip en la célula. Sin embargo, el uso de ARN bicatenarios largos *in vivo* no siempre es práctico, presumiblemente debido a efectos perjudiciales que pueden estar provocados por la respuesta a ARNbc independiente de secuencia. En tales realizaciones, se prefiere el uso de sistemas de suministro local y/o agentes que reducen los efectos de interferón o PKR.

En determinadas realizaciones, el constructo de iARN está en forma de una estructura en horquilla (es decir, ARN en horquilla). Los ARN en horquilla pueden sintetizarse de manera exógena o puede formarse mediante la transcripción de promotores de ARN polimerasa III *in vivo*. Se describen ejemplos de preparación y uso de tales ARN en horquilla para silenciamiento génico en células de mamífero, por ejemplo, en Paddison *et al.*, Genes Dev, 2002, 16:948-58; McCaffrey *et al.*, Nature, 2002, 418:38-9; McManus *et al.*, RNA, 2002, 8:842-50; Yu *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99:6047-52). Preferiblemente, tales ARN en horquilla se modifican por ingeniería genética en células o en un animal para garantizar la supresión continua y estable de un gen deseado. Se conoce en la técnica que pueden producirse ARNip mediante el procesamiento de un ARN en horquilla en la célula.

Aún en otras realizaciones, se usa un plásmido para suministrar el ARN bicatenario, por ejemplo, como producto transcripcional. En tales realizaciones, el plásmido está diseñado para que incluya una "secuencia codificante" para cada una de las cadenas sentido y antisentido del constructo de iARN. Las secuencias codificantes pueden ser la misma secuencia, por ejemplo, flanqueada por promotores invertidos, o pueden ser dos secuencias independientes cada una bajo el control transcripcional de promotores independientes. Después de transcribirse la secuencia codificante, se aparean las bases de los transcritos de ARN complementarios para formar el ARN bicatenario.

La solicitud PCT WO01/77350 describe un vector a modo de ejemplo para la transcripción bidireccional (o convergente) de un transgén para producir transcritos de ARN tanto sentido como antisentido del mismo transgén en una célula eucariota. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un vector recombinante que tiene las siguientes características únicas: comprende un replicón viral que tiene dos unidades de transcripción solapantes dispuestas en una orientación opuesta y que flanquean un transgén para un constructo de iARN de interés, en el que las dos unidades de transcripción solapantes producen transcritos de ARN tanto sentido como antisentido del mismo fragmento de transgén en una célula huésped. Véase también Tran *et al.*, BMC Biotechnology 3: 21, 2003.

Los constructos de iARN pueden comprender o bien tramos largos de ARN bicatenario idéntico o sustancialmente idéntico a la secuencia diana de ácido nucleico o bien tramos cortos de ARN bicatenario idéntico a sustancialmente idéntico únicamente a una región de la secuencia diana de ácido nucleico. Pueden hallarse métodos a modo de ejemplo de preparación y suministro de constructos de iARN o bien largos o bien cortos, por ejemplo, en los documentos WO01/68836 y WO01/75164.

Pueden seleccionarse constructos de iARN a modo de ejemplo que reconocen específicamente un gen particular, o una familia de genes particular usando la metodología expuesta en detalle anteriormente con respecto a la selección de oligonucleótido antisentido. De manera similar, los métodos de suministro de constructos de iARN incluyen los métodos para el suministro de oligonucleótidos antisentido expuestos en detalle anteriormente.

En general, se prevé que cualquiera de los antagonistas de iARN anteriores que disminuyen la presencia o traducción de proteínas de señalización de HH positivas, activantes, tales como *hedgehog*, *smoothened* o *gli-1*, actúan como antagonistas de la señalización de HH, mientras que los antagonistas de iARN que disminuyen la producción de proteínas de señalización de HH negativas, inhibitoras, tales como *patched*, tendrán un efecto agonista en la señalización de HH.

Los antagonistas de iARN objeto pueden elegirse basándose en su selectividad por la ruta de *hedgehog*. Esta selectividad puede ser para la ruta de *hedgehog* frente a otras rutas, tales como la ruta de *wingless* que comparte determinados componentes con la ruta de HH; o para la selectividad entre rutas de *hedgehog* particulares usando uno de varios homólogos, por ejemplo, *ptc-1* frente a *ptc-2*, etc.

El antagonista de iARN se elige para su uso porque es más selectivo para una isoforma de *patched* con respecto al siguiente, por ejemplo, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, y más preferiblemente al menos 100 o incluso 1000 veces más selectivo para una ruta de *patched* (*ptc-1*, *ptc-2*) con respecto a otro.

5 Preferiblemente, los inhibidores objeto inhiben la transducción de señales mediada por *hedgehog* con una DE₅₀ de 1 mM o menos, más preferiblemente de 1 μM o menos, e incluso más preferiblemente de 1 nM o menos.

10 Un antagonista de iARN que es un antagonista de la ruta de *hedgehog* puede elegirse para antagonizar selectivamente la actividad de *hedgehog* con respecto a proteína cinasas distintas de PKA, tales como PKC, por ejemplo, el antagonista de iARN modula la actividad de la ruta de *hedgehog* al menos un orden de magnitud de manera más fuerte que modula la actividad de otra proteína cinasa, preferiblemente al menos dos órdenes de magnitud más fuerte, incluso más preferiblemente al menos tres órdenes de magnitud más fuerte. Por tanto, por ejemplo, un inhibidor preferido de la ruta de *hedgehog* puede inhibir la actividad de *hedgehog* con una K_i al menos un orden de magnitud menor que su K_i para la inhibición de PKC, preferiblemente al menos dos órdenes de magnitud menor, incluso más preferiblemente al menos tres órdenes de magnitud menor. La K_i para la inhibición de PKA puede ser menor de 10 nM, preferiblemente menor de 1 nM, incluso más preferiblemente menor de 0,1 nM.

15 VI. Aplicaciones a modo de ejemplo de métodos y composiciones

Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos de modulación de un estado diferenciado, supervivencia y/o proliferación de una célula.

20 Por ejemplo, se contempla que el método objeto pueda usarse para inhibir la angiogénesis. Se sabe que *Hedgehog* estimula la angiogénesis. Taponos de Matrigel impregnados con proteína *hedgehog* e insertados en ratones evidencian una neovascularización sustancial, mientras que taponos de Matrigel que no portan *hedgehog* muestran comparativamente poca vascularización. La proteína *Hedgehog* también puede aumentar la vascularización de la cornea de ratón normalmente avascular. El gen *ptc-1* se expresa en tejidos vasculares normales, incluyendo las células endoteliales de la aorta, células de músculo liso vascular, fibroblastos adventicios de la aorta, la vasculatura coronaria y cardiomiocitos de las aurículas y los ventrículos. Estos tejidos también son sensibles a proteína *hedgehog*. El tratamiento con *hedgehog* exógeno provoca la regulación por incremento de la expresión de *ptc-1*. Además, las proteínas *hedgehog* estimulan la proliferación de células de músculo liso vascular *in vivo*. Las proteínas *Hedgehog* también hacen que los fibroblastos aumenten la expresión de factores de crecimiento angiogénicos tales como VEGF, bFGF, Ang-1 y Ang-2. Por último, se sabe que las proteínas *hedgehog* estimulan la recuperación de lesión isquémica y estimulan la formación de vasos colaterales.

30 Dado que *hedgehog* fomenta la angiogénesis, se espera que los antagonistas de *hedgehog* actúen como inhibidores de la angiogénesis, particularmente en situaciones en las que es necesario cierto nivel de señalización de *hedgehog* para la angiogénesis.

35 La angiogénesis es fundamental en muchos trastornos. Se produce angiogénesis persistente, no regulada en una variedad de estados de enfermedad, metástasis tumorales y crecimientos anómalos por células endoteliales. La vasculatura creada como resultado de procesos angiogénicos respalda el daño patológico observado en estos estados. Los diversos estados patológicos creados debido a angiogénesis no regulada se han agrupado conjuntamente como enfermedades dependientes de la angiogénesis o asociadas a la angiogénesis. Las terapias dirigidas a controlar los procesos angiogénicos podrían conducir a la supresión o mitigación de estas enfermedades.

40 Las enfermedades provocadas por, respaldadas mediante o asociadas con la angiogénesis incluyen enfermedad ocular neovascular, degeneración macular asociada a la edad, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, rechazo de injerto corneal, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolenticular, queratoconjuntivitis epidérmica, deficiencia de vitamina A, uso excesivo de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, queratitis seca de pterigión, síndrome de Sjogren, acné rosácea, flictenulosis, sífilis, infecciones por *Mycobacteria*, degeneración lipoidea, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por herpes simple, infecciones por herpes zóster, infecciones protozoarias, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis marginal, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliarteritis, traumatismo, granulomatosis de Wegener, sarcoidosis, escleritis, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide queratotomía radial, rechazo de injerto corneal, artritis reumatoide, osteoartritis inflamación crónica (por ejemplo, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn), hemangioma, enfermedad de Osler-Weber-Rendu y telangiectasia hemorrágica hereditaria.

50 Además, la angiogénesis desempeña un papel crítico en el cáncer. Un tumor no puede expandirse sin un suministro de sangre para proporcionar nutrientes y retirar desechos celulares. Los tumores en los que la angiogénesis es importante incluyen tumores sólidos tales como rhabdomyosarcomas, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma y osteosarcoma, y tumores benignos tales como neuroma acústico, neurofibroma, tracomas y granulomas piógenos. Se han hallado factores angiogénicos asociados con varios tumores sólidos. La prevención de angiogénesis podría detener el crecimiento de estos tumores y el daño resultante al animal debido a la presencia del tumor. La angiogénesis también se asocia con tumores de transmisión hemática tales como leucemias, cualquiera de diversas enfermedades neoplásicas agudas o crónicas de la médula ósea en las que se produce una proliferación incontrolada de glóbulos blancos, habitualmente acompañada de anemia, afectación de la coagulación

sanguínea y aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, el hígado y bazo. Se cree que la angiogénesis desempeña un papel en las anomalías en la médula ósea que dan lugar a tumores de tipo leucémico.

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

La angiogénesis también está implicada en procesos fisiológicos normales tales como reproducción y cicatrización de heridas. La angiogénesis es una etapa importante en ovulación y también en implantación de la blástula después de la fecundación. La prevención de la angiogénesis podría usarse para inducir amenorrea, para bloquear la ovulación o para prevenir la implantación por la blástula.

Se prevé que la invención será útil para el tratamiento y/o la prevención del síndrome de dificultad respiratoria u otros trastornos que resultan de una tensión superficial pulmonar inapropiada. El síndrome de dificultad respiratoria resulta de insuficiente surfactante en los alveolos de los pulmones. Los pulmones de vertebrados contienen surfactante, una mezcla compleja de lípidos y proteína que hace que se eleve la tensión superficial durante la insuflación pulmonar y disminuya durante el desinflamamiento de los pulmones. Durante el desinflamamiento de los pulmones, el surfactante disminuye de tal manera que no existen fuerzas superficiales que fomentarian de otro modo el colapso alveolar. Los alveolos oxigenados que no han colapsado durante la espiración permiten el transporte continuo de oxígeno y dióxido de carbono entre la sangre y el gas alveolar y requieren mucha menos fuerza para la insuflación durante la inspiración posterior. Durante la insuflación, el surfactante pulmonar aumenta la tensión superficial a medida que aumenta el área superficial alveolar. Una tensión superficial creciente en alveolos en expansión se opone a la insuflación excesiva en esos espacios de aire y tiende a desviar el aire inspirado a alveolos menos oxigenados, facilitando de ese modo incluso la oxigenación pulmonar.

El síndrome de dificultad respiratoria es particularmente prevalente entre bebés prematuros. El surfactante pulmonar se sintetiza normalmente a una velocidad muy baja hasta las últimas seis semanas de vida fetal. Los bebés humanos nacidos más de seis semanas antes del plazo normal de un embarazo tienen un alto riesgo de nacer con cantidades inadecuadas del surfactante pulmonar y velocidades inadecuadas de síntesis de surfactante. Cuanto más prematuro nazca un bebé, es probable que la deficiencia de surfactante sea más intensa. La deficiencia de surfactante intensa puede conducir a insuficiencia respiratoria en el plazo de unos pocos minutos u horas desde el parto. La deficiencia de surfactante produce un colapso progresivo de los alveolos (atelectasia) debido a la capacidad cada vez menor del pulmón para expandirse a pesar de un esfuerzo inspiratorio máximo. Como resultado, cantidades inadecuadas de oxígeno alcanzan la sangre del bebé. También puede producirse SDR en adultos, normalmente como consecuencia de fracaso en la biosíntesis de surfactante.

El tejido pulmonar de bebés prematuros muestra alta actividad de la ruta de señalización de *hedgehog*. La inhibición de esta ruta usando antagonistas de *hedgehog* aumenta la formación de cuerpos lamelares y aumenta la expresión de genes implicados en la biosíntesis de surfactante. Los cuerpos lamelares son estructuras subcelulares asociadas con la biosíntesis de surfactante. Por estos motivos, el tratamiento de bebés prematuros con un antagonista de *hedgehog* debe estimular la biosíntesis de surfactante y mejorar el SDR. En casos en los que se asocia SDR de adulto con la activación de una ruta de *hedgehog*, el tratamiento con antagonistas de *hedgehog* también debe ser eficaz.

Se contempla además que el uso de antagonistas de *hedgehog* puede seleccionar como diana específicamente trastornos en los que el tejido y/o las células afectados evidencian una alta activación de una ruta de *hedgehog*. Se activa la expresión de genes *gli* mediante la ruta de señalización de *hedgehog*, incluyendo *gli-1*, *gli-2* y *gli-3*. La expresión de *gli-1* se correlaciona de la manera más sistemática con la actividad de señalización de *hedgehog* a través de una amplia variedad de tejidos y trastornos, mientras que *gli-3* lo hace algo menos. Los genes *gli* codifican para factores de transcripción que activan la expresión de muchos genes necesarios para provocar los efectos totales de señalización de *hedgehog*. Sin embargo, el factor de transcripción de *Gli-3* también puede actuar como represor de genes efectores de *hedgehog*, y por tanto, la expresión de *gli-3* puede provocar un efecto disminuido de la ruta de señalización de *hedgehog*. Si *Gli-3* actúa como activador o represor transcripcional depende de acontecimientos postraduccionales, y por tanto se espera que métodos para detectar la forma activante (frente a la forma de represión) de la proteína *Gli-3* también será una medida fiable de la activación de la ruta de *hedgehog*. Se espera que la expresión génica de *gli-2* proporcione un marcador fiable para la activación de una ruta de *hedgehog*. El gen *gli-1* se expresa intensamente en una amplia variedad de cánceres, hiperplasias y pulmones inmaduros, y sirve como marcador para la activación relativa de la ruta de *hedgehog*. Además, tejidos, tales como pulmón inmaduro, que tienen alta expresión de genes *gli* se ven fuertemente afectados por inhibidores de *hedgehog*. Por consiguiente, se contempla que la detección de la expresión de genes *gli* puede usarse como potente herramienta predictiva para identificar tejidos y trastornos que se beneficiarán particularmente del tratamiento con un antagonista de *hedgehog*.

Preferiblemente, se detectan los niveles de expresión de *gli-1*, o bien mediante detección directa del transcrito o bien

mediante detección de niveles o actividad de proteína. Los transcritos pueden detectarse usando cualquiera de una amplia variedad de técnicas que dependen principalmente de la hibridación de sondas a los transcritos de *gli-1* o a ADNc sintetizados a partir de los mismos. Las técnicas bien conocidas incluyen transferencia de tipo Northern, PCR con transcriptasa inversa y análisis con microalineamientos de los niveles de transcritos. Los métodos para detectar los niveles de proteína *Gli* incluyen inmunotransferencia de tipo Western, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (SDS-PAGE 2D) (preferiblemente en comparación frente a un patrón en el que se ha determinado la posición de las proteínas *Gli*), y espectroscopía de masas. La espectroscopía de masas puede acoplarse 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 SDS-PAGE 2D también pueden usarse para identificar modificaciones postranscripcionales en proteínas incluyendo acontecimientos proteolíticos, ubiquitinación, fosforilación, modificación lipídica, etc. También puede evaluarse la actividad de *Gli* analizando la unión a ADN sustrato o la activación transcripcional *in vitro* de promotores diana. Los ensayos de cambio en la movilidad electroforética, los ensayos de obtención de huella de ADN y los ensayos de reticulación de ADN-proteína son todos métodos que pueden usarse para evaluar la presencia de una proteína que puede unirse a sitios de unión a *Gli* en el ADN. (J Mol Med jun. de 1999; 77(6):459-68; Cell 18 de feb. de 2000;100(4):423-34; Development 2000;127(19):4293-4301)

Se miden los niveles de transcritos de *Gli* y se tratan tejidos enfermos o que presentan un trastorno y que muestran niveles anómalamente altos de niveles de *gli* con un antagonista de *hedgehog*. Puede saberse que el estado que está tratándose tiene una correlación significativa con la activación aberrante de la ruta de *hedgehog*, aunque no se realice una medición de los niveles de expresión de *gli* en el tejido que está tratándose. El tejido pulmonar prematuro, los cánceres de pulmón (por ejemplo, adenocarcinomas, adenocarcinomas broncoalveolares, carcinomas de células pequeñas), cánceres de mama (por ejemplo, carcinomas ductales inferiores, carcinomas lobulillares inferiores, carcinomas tubulares), cánceres de próstata (por ejemplo, adenocarcinomas) e hiperplasias prostáticas benignas muestran todos una expresión fuertemente elevada de los niveles de *gli-1* en determinados casos. Por consiguiente, los niveles de expresión de *gli-1* son un potente dispositivo de diagnóstico para determinar cuál de estos tejidos debe tratarse con un antagonista de *hedgehog*. Además, existen evidencias correlativas sustanciales de que cánceres de células uroteliales (por ejemplo, cáncer de vejiga, otros cánceres genitourinarios) también tendrán niveles elevados de *gli-1* en determinados casos. Por ejemplo, se sabe que la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 9q22 es habitual en cánceres de vejiga. El gen *ptc-1* está ubicado en esta posición y la pérdida de función de *ptc-1* es probablemente una causa parcial de hiperproliferación, como en muchos otros tipos de cáncer. Por consiguiente, tales cánceres también mostrarán una alta expresión de *gli* y serán particularmente susceptibles al tratamiento con un antagonista de *hedgehog*.

También se activa la expresión de *ptc-1* y *ptc-2* mediante la ruta de señalización de *hedgehog*, pero estos genes son inferiores a los genes *gli* como marcadores de activación de la ruta de *hedgehog*. En determinados tejidos, sólo se expresa uno de *ptc-1* o *ptc-2* aunque la ruta de *hedgehog* sea altamente activa. Por ejemplo, en el desarrollo testicular, *desert hedgehog* desempeña un papel importante y se activa la ruta de *hedgehog*, pero sólo se expresa *ptc-2*. Por consiguiente, estos genes pueden no ser fiables individualmente como marcadores para activación de la ruta de *hedgehog*, aunque se contempla la medición simultánea de ambos genes como un indicador más útil para tejidos que van a tratarse con un antagonista de *hedgehog*.

Se prevé que cualquier grado de sobreexpresión de *gli* puede ser útil en la determinación de que un antagonista de *hedgehog* será un agente terapéutico eficaz. Preferiblemente, *gli* debe expresarse a un nivel al menos el doble de lo normal. De manera particularmente preferida, la expresión es cuatro, seis, ocho o diez veces la normal.

Por ejemplo, se contempla por la invención que, en vista de los hallazgos de una implicación aparentemente amplia de *hedgehog*, *ptc* y *smoothened* en la formación de disposiciones espaciales ordenadas de tejidos diferenciados en vertebrados, el método objeto podría usarse como parte de un procedimiento para generar y/o mantener una variedad de tejidos de vertebrados diferentes tanto *in vitro* como *in vivo*. El antagonista de *hedgehog*, ya sea inductivo o anti-inductivo con respecto a la proliferación o diferenciación de un tejido dado, puede ser, según resulte apropiado, cualquiera de las preparaciones descritas anteriormente.

Por ejemplo, el presente método es aplicable a técnicas de cultivo celular en las que se desea reducir el nivel de señalización de *hedgehog*. Los sistemas de cultivo neuronal *in vitro* han demostrado ser herramientas fundamentales e indispensables para el estudio del desarrollo neural, así como la identificación de factores neurotróficos tales como factor de crecimiento nervioso (NGF), factores tróficos ciliares (CNTF) y factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). Un uso del presente método puede ser en cultivos de células madre neuronales, tal como en el uso de tales cultivos para la generación de nuevas neuronas y glía. En tales realizaciones del método objeto, las células en cultivo pueden ponerse en contacto con un antagonista de *hedgehog* de la presente invención para alterar la tasa de proliferación de células madre neuronales en el cultivo y/o alterar la tasa de diferenciación, o mantener la integridad de un cultivo de determinadas células neuronales diferenciadas de manera terminal. En una realización a modo de ejemplo, el método objeto puede usarse para cultivar, por ejemplo, neuronas sensitivas o, alternativamente, neuronas motoras. Tales cultivos neuronales pueden usarse como sistemas de ensayo convenientes así como fuentes de células implantables para tratamientos terapéuticos.

Para ilustrar adicionalmente otros usos de los antagonistas de *hedgehog* objeto, se indica que han surgido injertos

intracerebrales como enfoque adicional para terapias en el 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.* (1987) *J Exp Biol* 123:265-289; y Freund *et al.* (1985) *J Neurosci* 5:603-616). Pueden incorporarse de manera satisfactoria neuronas fetales de una variedad de regiones cerebrales en el cerebro adulto, y tales injertos pueden aliviar defectos conductuales. Por ejemplo, puede prevenirse el trastorno del movimiento inducido por lesiones de proyecciones dopaminérgicas en los ganglios basales mediante injertos de neuronas dopaminérgicas embrionarias. También pueden restaurarse parcialmente funciones cognitivas complejas que se ven afectadas después de lesiones de la neocorteza mediante injertos de células corticales embrionarias. El método objeto puede usarse para regular el estado de crecimiento en el cultivo, o cuando se usa tejido fetal, especialmente células madre neuronales, puede usarse para regular la tasa de diferenciación de las células madre.

En general, se conocen células madre útiles en la presente invención. Por ejemplo, se han identificado varias células de la cresta neural, algunas de las cuales son multipotentes y representan probablemente células de la cresta neural no comprometidas, y otras de las cuales sólo pueden generar un tipo de célula, tal como neuronas sensitivas, y representan posiblemente células progenitoras comprometidas. El papel de los antagonistas de *hedgehog* empleados en el presente método para cultivar tales células madre puede ser regular la diferenciación de la célula progenitora no comprometida, o para la restricción adicional del destino de desarrollo de una célula progenitora comprometida hacia su conversión en una célula neuronal diferenciada de manera terminal. Por ejemplo, el presente método puede usarse *in vitro* para regular la diferenciación de células de la cresta neural en células de la glía, células de Schwann, células cromafines, neuronas colinérgicas del sistema nervioso simpático o parasimpático, así como neuronas peptidérgicas y serotonérgicas. Los antagonistas de *hedgehog* pueden usarse solos, o pueden usarse en combinación con otros factores neurotróficos que actúan para potenciar más particularmente un destino de diferenciación particular de la célula progenitora neuronal.

Además de la implantación de células en cultivo en presencia de los antagonistas de *hedgehog* objeto, aún otro aspecto de la presente invención se refiere a la aplicación terapéutica de un antagonista de *hedgehog* 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 de *ptc*, *hedgehog* y *smoothened* para regular la diferenciación neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso y también presumiblemente en el estado adulto indica que, en determinados casos, puede esperarse que los antagonistas de *hedgehog* objeto faciliten el control de neuronas adultas con respecto al mantenimiento, desempeño funcional y envejecimiento de células normales; procesos de reparación y regeneración en células con lesión química o mecánica; y tratamiento de degeneración en determinados estados patológicos. En vista de estos conocimientos, la presente invención contempla específicamente aplicaciones del método objeto en el protocolo de tratamiento de (prevención y/o reducción de la intensidad de) estados neurológicos que derivan de: (i) una lesión aguda, subaguda o crónica en el sistema nervioso, incluyendo lesión traumática, lesión química, lesión y déficits vasculares (tales como la isquemia que resulta de accidente cerebrovascular), junto con lesión infecciosa/inflamatoria e inducida por tumor; (ii) envejecimiento del sistema nervioso incluyendo enfermedad de Alzheimer; (iii) enfermedades neurodegenerativas crónicas del sistema nervioso, incluyendo enfermedad de Parkinson, corea de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y similares, así como degeneraciones espinocerebelosas; y (iv) enfermedades inmunológicas crónicas del sistema nervioso o que afectan al sistema nervioso, incluyendo esclerosis múltiple.

Según resulte apropiado, el método objeto también puede usarse en la generación de prótesis de nervio para la reparación de daño nervioso central y periférico. En particular, cuando se tubuliza un axón aplastado o seccionado mediante el uso de un dispositivo protésico, pueden añadirse antagonistas de *hedgehog* al dispositivo protésico para regular la tasa de crecimiento y regeneración de los procesos dendríticos. Se describen canales de guiado de nervios a modo de ejemplo en las patentes estadounidenses 5.092.871 y 4.955.892.

En otra realización, el método objeto puede usarse en el tratamiento de transformaciones neoplásicas o hiperplásicas tales como las que pueden producirse en el sistema nervioso central. Por ejemplo, los antagonistas de *hedgehog* pueden utilizarse para hacer que tales células transformadas se conviertan o bien en posmitóticas o bien en apoptóticas. Por tanto, el presente método puede usarse como parte de un tratamiento, por ejemplo, para gliomas malignos, meningiomas, meduloblastomas, tumores neuroectodérmicos y ependimomas.

En una realización preferida, el método objeto puede usarse como parte de un régimen de tratamiento para meduloblastoma maligno y otros tumores neuroectodérmicos malignos del SNC primarios.

En determinadas realizaciones, el método objeto se usa como parte del programa de tratamiento para meduloblastoma. El meduloblastoma, un tumor cerebral primario, es el tumor cerebral más habitual en niños. Un meduloblastoma es un tumor neuroectodérmico primitivo que surge en la fosa posterior. Representan aproximadamente el 25% de todos los tumores cerebrales pediátricos (Miller). Histológicamente, son tumores de células redondas pequeñas dispuestas habitualmente en rosetas verdaderas, pero pueden presentar cierta diferenciación en astrocitos, células ependimarias o neuronas (Rorke; Kleihues). Pueden surgir TNEP en otras áreas del cerebro incluyendo la glándula pineal (pineoblastoma) y el cerebro. Los que surgen en la región supratentorial generalmente evolucionan peor que sus equivalentes de PF.

Se sabe que los meduloblastomas/TNEP recidivan en cualquier parte del SNC después de su resección, e incluso

pueden metastatizar en hueso. Por tanto, la evaluación antes del tratamiento debe incluir un examen de la médula espinal para excluir la posibilidad de “masas de metástasis”. La IRM realizada con gadolinio ha reemplazado en gran medida a la mielografía para este fin, y se obtiene citología de LCR de manera posoperatoria como procedimiento de rutina.

- 5 En otras realizaciones, el método objeto se usa como parte del programa de tratamiento para ependimomas. Los ependimomas representan aproximadamente el 10% de los tumores cerebrales pediátricos en niños. A *grosso* modo, son tumores que surgen del revestimiento ependimario de los ventrículos y forman de manera microscópica rosetas, canales y rosetas perivasculares. En la serie de CHOP de 51 niños notificados con ependimomas, $\frac{3}{4}$ fueron histológicamente benignos. Aproximadamente surgieron $\frac{2}{3}$ de la región del 4^a ventrículo. Un tercio se presentó en la región supratentorial. La edad en la presentación alcanza un máximo entre el nacimiento y los 4 años, tal como se demostró mediante los datos de SEER así como los datos de CHOP. La mediana de la edad es aproximadamente de 5 años. Dado que muchos niños con esta enfermedad son bebés, a menudo requieren terapia multimodal.

15 Aún otro aspecto de la presente memoria descriptiva se refiere a la observación en la técnica de que *ptc*, *hedgehog* y/o *smoothened* están implicados en señales morfogénicas implicadas en otras rutas organogénicas de vertebrados además de la diferenciación neuronal tal como se describió anteriormente, que aparentemente desempeñan papeles en la formación de otros patrones endodérmicos, así como procesos de diferenciación tanto mesodérmica como endodérmica. Por tanto, se contempla por la memoria descriptiva que composiciones que comprenden antagonistas de *hedgehog* también pueden utilizarse para métodos tanto de cultivo celular como terapéuticos que implican la generación y el mantenimiento de tejido no neuronal.

20 La presente memoria descriptiva también describe el descubrimiento de que *ptc*, *hedgehog* y *smoothened* están implicados aparentemente en el control del desarrollo de células madre responsables de la formación del tracto digestivo, hígado, pulmones, y otros órganos que derivan del intestino primitivo. *Shh* sirve como señal inductiva desde el endodermo hasta el mesodermo, que es crítica para la morfogénesis intestinal. Por tanto, por ejemplo, pueden emplearse antagonistas de *hedgehog* del presente método para regular desarrollo y mantenimiento de un hígado artificial que puede tener las múltiples funciones metabólicas de un hígado normal. Por ejemplo, el método objeto puede usarse para regular la proliferación y diferenciación de células madre del tubo digestivo para formar cultivos de hepatocitos que pueden usarse para poblar matrices extracelulares, o que pueden encapsularse en polímeros biocompatibles, para formar hígados artificiales tanto implantables como extracorporales.

25 Pueden utilizarse composiciones terapéuticas de antagonistas de *hedgehog* junto con el trasplante de tales hígados artificiales, así como estructuras hepáticas embrionarias, para regular la fijación de la implantación intraperitoneal, vascularización y diferenciación *in vivo* y mantenimiento del tejido hepático injertado.

30 El método objeto puede emplearse terapéuticamente para regular tales órganos después de una agresión física, química o patológica. Por ejemplo, pueden utilizarse composiciones terapéuticas que comprenden antagonistas de *hedgehog* en reparación hepática de manera posterior a una hepatectomía parcial.

35 La generación del páncreas y el intestino delgado a partir del intestino embrionario depende de la señalización intercelular entre las células endodérmicas y mesodérmicas del intestino. En particular, se ha sugerido que la diferenciación del mesodermo intestinal en músculo liso depende de señales procedentes de células endodérmicas adyacentes. Un mediador candidato de señales derivadas de manera endodérmica en el intestino distal embrionario es Sonic *hedgehog*. Véase, por ejemplo, Apelqvist *et al.* (1997) *Curr Biol* 7:801-4. El gen *Shh* se expresa en la totalidad del endodermo intestinal embrionario con la excepción del endodermo de yema pancreática, que expresa en su lugar altos niveles de la proteína de homeodominio *lpx1/Pdx1* (factor promotor de insulina 1/homeocaja pancreática y duodenal 1), un regulador esencial del desarrollo pancreático temprano. Apelqvist *et al.*, citados anteriormente, han examinado si la expresión diferencial de *Shh* en el tubo intestinal embrionario controla la diferenciación del mesodermo circundante en derivados de mesodermo especializados del intestino delgado y el páncreas. Para someter esto a prueba, usaron el promotor del gen *lpx1/Pdx1* para expresar selectivamente *Shh* en el epitelio pancreático en desarrollo. En ratones transgénicos *lpx1/Pdx1-Shh*, el mesodermo pancreático se desarrolló en músculo liso y células intersticiales de Cajal, característicos del intestino, en vez de en mesénquima pancreático y bazo. Además, explantes pancreáticos expuestos a *Shh* experimentaron un programa similar de diferenciación intestinal. Estos resultados proporcionan evidencias de que la expresión diferencial de *Shh* derivado de manera endodérmica controla el destino del mesodermo adyacente en diferentes regiones del tubo intestinal.

40 En la presente memoria descriptiva, se contempla por tanto que los antagonistas de *hedgehog* objeto pueden usarse para controlar o regular la proliferación y/o diferenciación de tejido pancreático tanto *in vivo* como *in vitro*.

45 Se usan antagonistas de *hedgehog* para generar tejido endodérmico a partir de células madre no endodérmicas incluyendo células madre mesenquimatosas y células madre derivadas de tejidos mesodérmicos. Los tejidos mesodérmicos a partir de los que pueden aislarse células madre a modo de ejemplo incluyen músculo esquelético, músculo cardíaco, riñón, hueso, cartílago y grasa.

50 Existe una amplia variedad de estados patológicos de proliferación y diferenciación celular para los que los inhibidores de la presente invención pueden proporcionar beneficios terapéuticos, siendo la estrategia general, por

ejemplo, la corrección de la expresión aberrante de insulina, o la modulación de la diferenciación. Más generalmente, sin embargo, la presente invención se refiere a un método de inducción y/o mantenimiento de un estado diferenciado, potenciación de la supervivencia y/o afectación de la proliferación de células pancreáticas, poniendo en contacto las células con los inhibidores objeto. Por ejemplo, se contempla por la memoria descriptiva que, en vista de la aparente implicación de *ptc*, *hedgehog* y *smoothened* en la formación de disposiciones espaciales ordenadas de tejidos pancreáticos, el método objeto podría usarse como parte de una técnica para generar y/o mantener tal tejido tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, la modulación de la función de *hedgehog* puede emplearse tanto en cultivo celular como en métodos terapéuticos que implican la generación y el mantenimiento de células β y posiblemente también para tejido no pancreático, tal como en el control del desarrollo y mantenimiento de tejido del tracto digestivo, bazo, pulmones, órganos genitourinarios (por ejemplo, la vejiga), y otros órganos que derivan del intestino primitivo.

En una realización a modo de ejemplo, el presente método puede usarse en el tratamiento de trastornos hiperplásicos y neoplásicos que afectan al tejido pancreático, particularmente los caracterizados por la proliferación aberrante de células pancreáticas tal como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, los cánceres de páncreas se caracterizan por la proliferación anómala de células pancreáticas, lo que puede dar como resultado alteraciones de la capacidad secretora de insulina del páncreas. Por ejemplo, determinadas hiperplasias pancreáticas, tales como carcinomas de páncreas, pueden dar como resultado hipoinsulinemia debido a la disfunción de las células β o una masa disminuida de células del islote.

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*. La presente memoria descriptiva describe la aparente implicación de *ptc*, *hedgehog* y *smoothened* en la regulación del desarrollo de tejido pancreático. En general, el método objeto puede emplearse terapéuticamente para regular el páncreas después de una agresión física, química o patológica. Además, el método objeto puede aplicarse a técnicas de cultivo celular, y en particular, puede emplearse para potenciar la generación inicial de dispositivos protésicos de tejido pancreático. La manipulación de la proliferación y diferenciación de tejido pancreático, por ejemplo, alterando la actividad de *hedgehog*, puede proporcionar un medio para controlar más cuidadosamente las características de un tejido en cultivo. Por ejemplo, el método objeto puede usarse para aumentar la producción de dispositivos protésicos que requieren células β del islote, tal como pueden usarse en los dispositivos de encapsulación descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4.892.538 de Aebischer *et al.*, la patente estadounidense n.º 5.106.627 de Aebischer *et al.*, la patente estadounidense n.º 4.391.909 de Lim, y la patente estadounidense n.º 4.353.888 de Sefton. Las células progenitoras tempranas para los islotes pancreáticos son multipotenciales, y aparentemente activan conjuntamente todos los genes específicos de islote desde el momento en que aparecen por primera vez. A medida que avanza el desarrollo, la expresión de hormonas específicas de islote, tales como insulina, se vuelve restringida al patrón de expresión característico de células del islote maduras. El fenotipo de las células del islote maduras, sin embargo, no es estable en cultivo, ya que puede observarse la reaparición de rasgos embrionarios en células β maduras. Utilizando los antagonistas de *hedgehog* objeto, puede regularse la ruta de diferenciación o el índice de proliferación de las células.

Además, la manipulación del estado de diferenciación de tejido pancreático puede utilizarse junto con el trasplante de páncreas artificial. Por ejemplo, la manipulación de la función de *hedgehog* para afectar a la diferenciación de tejido puede utilizarse como medio de mantenimiento de la viabilidad del injerto.

Bellusci *et al.* (1997) *Development* 124:53 notifican que *Sonic hedgehog* regula la proliferación de células mesenquimatosas de pulmón *in vivo*. Por consiguiente, el presente método puede usarse para regular la regeneración de tejido pulmonar, por ejemplo, en el tratamiento de enfisema.

Fujita *et al.* (1997) *Biochem Biophys Res Commun* 238:658 notificaron que se expresa *Sonic hedgehog* en células de adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas de pulmón humano. La expresión de *Sonic hedgehog* también se detectó en los tejidos de carcinoma escamoso de pulmón humano, pero no en el tejido pulmonar normal del mismo paciente. También observaron que *Sonic hedgehog* estimula la incorporación de BrdU en las células de carcinoma y estimula su crecimiento celular, mientras que anti-Shh-N inhibió su crecimiento celular. Estos resultados sugieren que un *ptc*, *hedgehog* y/o *smoothened* está implicado en el crecimiento celular de tal tejido pulmonar transformado y, por tanto, indica que el método objeto puede usarse como parte de un tratamiento de carcinoma y adenocarcinomas de pulmón, y otros trastornos proliferativos que implican al epitelio pulmonar.

Muchos otros tumores, basándose en evidencias tales como la implicación de la ruta de *hedgehog* en estos tumores, o la expresión detectada de *hedgehog* o su receptor en estos tejidos durante el desarrollo, pueden verse afectados por el tratamiento con los compuestos objeto. Tales tumores incluyen, pero no se limitan en modo alguno a, tumores relacionados con el síndrome de Gorlin (por ejemplo, meduloblastoma, meningioma, etc.), tumores puestos de manifiesto en ratones deficientes en *ptc* (por ejemplo, hemangioma, rhabdomyosarcoma, etc.), tumores que resultan de la amplificación de *gli-1* (por ejemplo, glioblastoma, sarcoma, 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 hueso, etc.), tumores inducidos por Shh (por ejemplo, cáncer de pulmón, condrosarcomas, etc.), y otros tumores (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer genitourinario (por ejemplo, de riñón, vejiga, uréter, próstata, etc.), cáncer suprarrenal, cáncer gastrointestinal (por ejemplo, de estómago, intestino, etc.), etc.).

Las formas de cáncer que pueden tratarse mediante los métodos objeto a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer o bien de células pequeñas o bien de células no pequeñas), cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, endometrial u otro cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de pene, cáncer de vagina, cáncer de uretra, cáncer de vesícula biliar, cáncer de esófago o cáncer de páncreas. Formas de cáncer a modo de ejemplo adicionales que pueden tratarse mediante los métodos objeto incluyen, pero no se limitan a, cáncer de músculo liso o esquelético, cáncer de estómago, cáncer de intestino delgado, cáncer de glándula salival, cáncer anal, cáncer rectal, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer de hipófisis y cáncer de nasofaringe. Formas de cáncer a modo de ejemplo adicionales que pueden tratarse con los antagonistas de *hedgehog* de la presente invención incluyen cánceres que comprenden células que expresan *hedgehog*. Todavía formas de cáncer a modo de ejemplo adicionales que pueden tratarse con los antagonistas de *hedgehog* de la presente invención incluyen cánceres que comprenden células que expresan *gli*. En una realización, el cáncer no se caracteriza por una mutación en *patched-1*.

Además, pueden usarse composiciones que comprenden antagonistas de *hedgehog* en la generación *in vitro* de tejido esquelético, tal como a partir de células madre esqueléticas, así como el tratamiento *in vivo* de deficiencias de tejido esquelético. La presente memoria descriptiva contempla particularmente el uso de antagonistas de *hedgehog* para regular la tasa de condrogénesis y/u osteogénesis. Por “deficiencia de tejido esquelético”, quiere decirse una deficiencia de hueso u otro tejido conjuntivo esquelético en cualquier sitio en el que se desea restaurar el hueso o tejido conjuntivo, sin importar cómo se origine la deficiencia, por ejemplo, ya sea como resultado de intervención quirúrgica, extirpación de tumor, ulceración, implante, fractura, u otros estados traumáticos o degenerativos.

Por ejemplo, el método descrito en el presente documento puede usarse como parte de un régimen para restaurar la función del cartílago en un tejido conjuntivo. Tales métodos son útiles, por ejemplo, en la reparación de defectos o lesiones en tejido de cartílago que es el resultado del desgaste degenerativo tal como el que da como resultado artritis, así como otras alteraciones mecánicas que pueden estar provocadas por traumatismo al tejido, tal como un desplazamiento del tejido de menisco desgarrado, meniscectomía, una laxación de una articulación por un ligamento desgarrado, desalineación de articulaciones, fractura ósea o por una enfermedad hereditaria. El presente método de reparación también es útil para remodelar la matriz de cartílago, tal como en cirugía plástica o reparadora, así como cirugía periodontal. El presente método también puede aplicarse a mejorar un procedimiento de reparación previo, por ejemplo, tras la reparación quirúrgica de un menisco, ligamento o cartílago. Además, puede prevenir el inicio o el agravamiento de una enfermedad degenerativa si se aplica de manera lo suficientemente temprana después del traumatismo.

El método objeto comprende tratar el tejido conjuntivo afectado con una cantidad terapéuticamente suficiente de un antagonista de *hedgehog*, particularmente un antagonista selectivo para la transducción de señales de *Indian hedgehog*, para regular una respuesta de reparación de cartílago en el tejido conjuntivo mediante la manipulación de la tasa de diferenciación y/o proliferación de condrocitos incrustados en el tejido. Tales tejidos conjuntivos como cartílago articular, cartílago interarticular (meniscos), cartílago costal (que conecta las costillas verdaderas y el esternón), ligamentos y tendones son particularmente susceptibles de tratamiento en terapias reparadoras y/o regenerativas usando el método objeto. Tal como se usa en el presente documento, las terapias regenerativas incluyen el tratamiento de estados degenerativos que han progresado hasta el punto de que el deterioro del tejido es obviamente manifiesto, así como tratamientos preventivos de tejido en los que la degeneración está en sus fases más iniciales o es inminente.

De manera ilustrativa, el método objeto puede usarse como parte de una intervención terapéutica en el tratamiento de cartílago de una articulación diartrodial, tal como una rodilla, un tobillo, un codo, una cadera, una muñeca, un nudillo de un dedo o bien de la mano o bien del pie, o una articulación temporomandibular. El tratamiento puede dirigirse al menisco de la articulación, al cartílago articular de la articulación, o ambos. Para ilustrarlo adicionalmente, el método objeto puede usarse para tratar un trastorno degenerativo de una rodilla, tal como el que podría ser el resultado de lesión traumática (por ejemplo, una lesión deportiva o desgaste excesivo) u osteoartritis. Los antagonistas objeto pueden administrarse como una inyección en la articulación, por ejemplo, con una aguja artroscópica. En algunos casos, el agente inyectado puede estar en forma de un hidrogel u otro vehículo de liberación lenta descrito anteriormente para permitir un contacto más prolongado y regular del agente con el tejido tratado.

La presente memoria descriptiva contempla además el uso del método objeto en el campo de las terapias de trasplante de cartílago y aparatos protésicos. Sin embargo, surgen problemas, por ejemplo, debido a que las características del cartílago y fibrocartílago varían entre diferentes tejidos: tal como entre cartílago articular, de menisco, ligamentos y tendones, entre los dos extremos del mismo ligamento o tendón, y entre las partes superficiales y profundas del tejido. La disposición zonal de estos tejidos puede reflejar un cambio gradual en las propiedades mecánicas, y se produce un fracaso cuando el tejido implantado, que no se ha diferenciado en esas condiciones, carece de la capacidad para responder apropiadamente. Por ejemplo, cuando se usa cartílago de menisco para reparar ligamentos cruzados anteriores, el tejido experimenta una metaplasia para dar tejido fibroso puro. Regulando la tasa de condrogénesis, el método objeto puede usarse para abordar particularmente este problema, ayudando a controlar adaptativamente las células implantadas en el nuevo entorno y que se asemejan

eficazmente a condrocitos hipertróficos de una fase de desarrollo anterior del tejido.

De modo similar, el método objeto puede aplicarse a potenciar tanto la generación de dispositivos protésicos de cartílago como su implantación. La necesidad de un tratamiento mejorado ha motivado la investigación destinada a crear nuevo cartílago que se basa en plantillas de colágeno-glicosaminoglicano (Stone *et al.* (1990) Clin Orthop Relat Red 252:129), condrocitos aislados (Grande *et al.* (1989) J Orthop Res 7:208; y Takigawa *et al.* (1987) Bone Miner 2:449), y condrocitos unidos a polímeros naturales o sintéticos (Walitani *et al.* (1989) J Bone Jt Surg 71B:74; Vacanti *et al.* (1991) Plast Reconstr Surg 88:753; von Schroeder *et al.* (1991) J Biomed Mater Res 25:329; Freed *et al.* (1993) J Biomed Mater Res 27:11; y la patente estadounidense n.º 5.041.138 de Vacanti *et al.*). Por ejemplo, pueden hacerse crecer condrocitos en cultivo sobre andamiajes altamente porosos biodegradables, biocompatibles formados a partir de polímeros tales como poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), gel de agarosa, u otros polímeros que se degradan a lo largo del tiempo en función de la hidrólisis de la estructura principal del polímero para dar monómeros inocuos. Las matrices están diseñadas para permitir un intercambio adecuado de nutrientes y gases a las células hasta que se produce el injerto. Las células pueden cultivarse *in vitro* hasta que se ha desarrollado la densidad y el volumen celular adecuados para las células que van a implantarse. Una ventaja de las matrices es que pueden colarse o moldearse en una forma deseada de manera individual, de modo que el producto final se asemeja estrechamente a la oreja o la nariz (a modo de ejemplo) del propio paciente, o pueden usarse matrices flexibles que permiten la manipulación en el momento de la implantación, como en una articulación.

Los implantes pueden ponerse en contacto con un antagonista de *hedgehog* durante determinadas fases del procedimiento de cultivo para manipular la tasa de diferenciación de condrocitos y la formación de condrocitos hipertróficos en el cultivo.

El dispositivo implantado puede tratarse con un antagonista de *hedgehog* para remodelar activamente la matriz implantada y hacer que sea más adecuada para su función pretendida. Tal como se expuso anteriormente con respecto a trasplantes de tejido, los trasplantes artificiales presentan la misma deficiencia de no derivarse en un ambiente 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 objeto puede permitir que el implante adquiera características similares a las del tejido que se pretende reemplazar.

Además, el método objeto puede usarse para potenciar la unión de dispositivos protésicos. Para ilustrarlo, el método objeto puede usarse en la implantación de una prótesis periodontal, en el que el tratamiento del tejido conjuntivo circundante estimula la formación de ligamento periodontal alrededor de la prótesis.

Además, el método objeto puede emplearse como parte de un régimen para la generación de hueso (osteogénesis) en un sitio en el animal que es deficiente en tal tejido esquelético. Indian *hedgehog* se asocia particularmente con los condrocitos hipertróficos que se reemplazan en última instancia por osteoblastos. Por ejemplo, la administración de un antagonista de *hedgehog* de la presente invención puede emplearse como parte de un método para regular la tasa de pérdida de hueso en un sujeto. Por ejemplo, pueden emplearse preparaciones que comprenden antagonistas de *hedgehog*, por ejemplo, para controlar la osificación endocondral en la formación de un "modelo" para osificación.

Además, puede usarse un antagonista de *hedgehog* para regular la espermatogénesis. Se ha mostrado que las proteínas *hedgehog*, particularmente Dhh, están implicadas en la diferenciación y/o proliferación y el mantenimiento de células germinales testiculares. Se inicia la expresión de Dhh en precursores de células de Sertoli poco después de la activación de Sry (gen de determinación testicular) y persiste en los testículos en el adulto. Los machos son viables pero infértiles, debido a una ausencia completa de esperma maduro. El examen de los testículos en desarrollo en diferentes contextos genéticos sugiere que Dhh regula fases tanto tempranas como tardías de la espermatogénesis. Bitgood *et al.* (1996) Curr Biol 6:298. Preferiblemente, el antagonista de *hedgehog* puede usarse como anticonceptivo. De modo similar, antagonistas de *hedgehog* del método objeto son potencialmente útiles para modular la función ovárica normal.

El método objeto también tiene amplia aplicabilidad para el tratamiento o la profilaxis de trastornos que afectan a tejido epitelial, así como en usos cosméticos. En general, el método puede caracterizarse como que incluye una etapa de administrar a un animal una cantidad de un antagonista de *hedgehog* eficaz para alterar el estado de crecimiento de un tejido epitelial tratado. El modo de administración y las pautas posológicas variarán dependiendo del/de los tejido(s) epitelial(es) que va(n) a tratarse. Por ejemplo, se preferirán formulaciones tópicas cuando el tejido tratado es tejido epidérmico, tal como tejidos dérmicos o mucosos.

Un método que "fomenta la cicatrización de una herida" da como resultado la cicatrización de heridas más rápidamente como resultado del tratamiento de lo que cicatriza una herida similar en ausencia del tratamiento. "Fomento de la cicatrización de heridas" también puede significar que el método regula la proliferación y/o crecimiento de, entre otros, queratinocitos, o que la herida cicatriza con menos cicatrización patológica, menos contracción de la herida, menos deposición de colágeno y más área superficial de la superficie. En determinados casos, "fomento de la cicatrización de heridas" también puede significar que determinados métodos de cicatrización de heridas tienen tasas de éxito mejoradas, (por ejemplo, las tasas en que prenden los injertos de piel) cuando se usan junto con el método de la presente invención.

A pesar del avance significativo en las técnicas de cirugía reparadora, la cicatrización patológica puede ser un importante obstáculo al recuperar la función y aspecto normales de la piel cicatrizada. Esto es particularmente verdadero cuando cicatrización patológica tal como queloides o cicatrices hipertróficas de las manos o la cara provocan discapacidad funcional o deformidad física. En las circunstancias más severas, tal cicatrización patológica puede precipitar malestar psicosocial y una vida con privaciones económicas. La reparación de heridas incluye las fases de hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación. La fase proliferativa implica la multiplicación de fibroblastos y células endoteliales y epiteliales. A través del uso del método objeto, la tasa de proliferación de células epiteliales en y de manera proximal a la herida puede controlarse para acelerar el cierre de la herida y/o minimizar la formación de tejido cicatricial.

El presente tratamiento también puede ser eficaz como parte de un régimen terapéutico para tratar úlceras orales y paraorales, por ejemplo, que resultan de radioterapia y/o quimioterapia. Tales úlceras se desarrollan habitualmente en el plazo de días después de la quimioterapia o radioterapia. Estas úlceras comienzan habitualmente como pequeñas lesiones de forma irregular, dolorosas cubiertas habitualmente por una delicada membrana necrótica de color gris y rodeadas por tejido inflamatorio. En muchos casos, la falta de tratamiento da como resultado la proliferación de tejido alrededor de la periferia de la lesión de manera inflamatoria. Por ejemplo, el epitelio que delimita la úlcera demuestra habitualmente actividad proliferativa, lo que da como resultado la pérdida de continuidad del epitelio de superficie. Estas lesiones, debido a su tamaño y pérdida de integridad epitelial, predisponen al cuerpo a una infección secundaria potencial. La ingesta rutinaria de alimentos y agua se convierte en un acontecimiento muy doloroso y, si las úlceras proliferan por la totalidad del tubo digestivo, habitualmente es evidente diarrea con todos sus factores intercurrentes. Según la presente invención, un tratamiento para tales úlceras que incluye la aplicación de un antagonista de *hedgehog* según se reivindica puede reducir la proliferación y diferenciación anómalas del epitelio afectado, ayudando a reducir la intensidad de acontecimientos inflamatorios posteriores.

El método y las composiciones objeto también pueden usarse para tratar heridas que resultan de enfermedades dermatológicas, tales como lesiones que resultan de trastornos autoinmunitarios tales como psoriasis. Dermatitis atópica se refiere a un traumatismo de la piel que resulta de alergias asociadas con una respuesta inmunitaria provocada por alérgenos tales como pólenes, alimentos, caspa, venenos de insectos y toxinas de plantas.

Además, pueden usarse preparaciones antiproliferativas de antagonistas de *hedgehog* para inhibir la proliferación de células del epitelio del cristalino para prevenir complicaciones posoperatorias de la extracción extracapsular de cataratas. Las cataratas es una enfermedad ocular intratable y se han realizado diversos estudios sobre un tratamiento de cataratas. Pero en la actualidad, el tratamiento de cataratas se logra mediante intervenciones quirúrgicas. La cirugía de cataratas se ha aplicado durante un largo tiempo y se han examinado diversos métodos quirúrgicos. La extracción extracapsular del cristalino se ha convertido en el método de elección para eliminar cataratas. Las principales ventajas médicas de esta técnica con respecto a la extracción intracapsular son una menor incidencia de edema macular quistoide afáquico y desprendimiento de retina. También se requiere la extracción extracapsular para la implantación de lentes intraoculares del tipo de cámara posterior, que se considera ahora que son las lentes de elección en la mayor parte de los casos.

Sin embargo, una desventaja de la extracción extracapsular de cataratas es la alta incidencia de opacificación de la cápsula posterior del cristalino, denominada a menudo cataratas secundarias, que puede producirse hasta en el 50% de los casos en el plazo de tres años después de la cirugía. Las cataratas secundarias están provocadas por la proliferación de células epiteliales de la cápsula anterior y ecuatorial del cristalino que permanecen después de la extracción extracapsular del cristalino. Estas células proliferan para provocar anillos de Sommerling, y junto con fibroblastos, que también se depositan y se producen en la cápsula posterior, provocan opacificación de la cápsula posterior, que interfiere en la visión. La prevención de cataratas secundarias será preferible al tratamiento. Para inhibir la formación de cataratas secundarias, el método objeto proporciona medios para inhibir la proliferación de las células epiteliales del cristalino restantes. Por ejemplo, puede inducirse que tales células permanezcan quiescentes instilando una disolución que contiene una preparación de antagonista de *hedgehog* en la cámara anterior del ojo después de la extirpación del cristalino. Además, la disolución puede equilibrarse de manera osmótica para proporcionar una dosificación eficaz mínima cuando se instila en la cámara anterior del ojo, inhibiendo de ese modo el crecimiento epitelial subcapsular con cierta especificidad.

El método objeto también puede usarse en el tratamiento de corneopatías caracterizadas por proliferación de células epiteliales corneales, como por ejemplo en trastornos epiteliales oculares tales como deficiencia de crecimiento epitelial o carcinomas de células escamosas de la superficie ocular.

Levine *et al.* (1997) *J Neurosci* 17:6277 muestran que las proteínas *hedgehog* pueden regular la mitogénesis y diferenciación de fotorreceptores en la retina de vertebrados, e *Ihh* es un factor candidato del epitelio pigmentado para fomentar la proliferación de células progenitoras retinianas y la diferenciación de fotorreceptores. Asimismo, Jensen *et al.* (1997) *Development* 124:363 demostraron que el tratamiento de cultivos de células retinianas de ratón perinatales con el fragmento amino-terminal de la proteína Sonic *hedgehog* da como resultado un aumento de la proporción de células que incorporan bromodesoxiuridina, en el número total de células, y en fotorreceptores de tipo bastón, células amacrinas y células de Muller de la glía, lo que sugiere que Sonic *hedgehog* fomenta la proliferación de células precursoras retinianas. Por tanto, el método objeto puede usarse en el tratamiento de enfermedades

proliferativas de células retinianas y regular la diferenciación de fotorreceptores.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del método objeto para controlar el crecimiento del pelo/cabello. El pelo/cabello se compone básicamente de queratina, una proteína dura e insoluble; su gran fortaleza reside en su enlace disulfuro de cistina. Cada pelo/cabello individual comprende un vástago cilíndrico y una raíz, y está contenido en un folículo, una depresión en forma de matraz en la piel. El fondo del folículo contiene una proyección en forma de dedo denominada papila, que consiste en tejido conjuntivo desde el que crece el pelo/cabello, y a través del que los vasos sanguíneos suministran nutrientes a las células. El vástago es la parte que se extiende hacia fuera desde la superficie de la piel, mientras que se ha descrito la raíz como la parte enterrada del pelo/cabello. La base de la raíz se expande hacia el bulbo piloso, que descansa sobre la papila. Las células a partir de las que se produce el pelo/cabello crecen en el bulbo del folículo; se extruyen en forma de fibras a medida que proliferan las células en el folículo. El "crecimiento" de pelo/cabello se refiere a la formación y alargamiento de la fibra capilar por las células en división.

Tal como se conoce bien en la técnica, el ciclo capilar habitual se divide en tres fases: 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 hacia arriba y se diferencian para formar las capas concéntricas del propio pelo/cabello. La fase de transición, catágena, se caracteriza por el cese de la mitosis de las células madre en el folículo. La fase de reposo se conoce como telógena, en la que se retiene el pelo/cabello dentro del cuero cabelludo durante varias semanas antes de que un nuevo pelo/cabello emergente que se desarrolla por debajo del mismo expulse el vástago de la fase telógena de su folículo. A partir de este modelo, ha quedado claro que cuanto mayor sea la reserva de células madre en división que se diferencian en células capilares, más crecimiento de pelo/cabello se produce. Por consiguiente, pueden llevarse a cabo métodos para aumentar o reducir el crecimiento de pelo/cabello potenciando o inhibiendo, respectivamente, la proliferación de estas células madre.

En determinadas realizaciones, el método objeto tal como se define en las reivindicaciones puede emplearse como un modo de reducir el crecimiento de pelo/cabello humano en oposición a su eliminación convencional mediante corte, afeitado o depilación. Por ejemplo, el presente método puede usarse en el tratamiento de tricosis caracterizada por crecimiento anómalamente rápido o denso de pelo/cabello, por ejemplo, hipertricosis. En una realización a modo de ejemplo, pueden usarse antagonistas de *hedgehog* para tratar hirsutismo, un trastorno caracterizado por pilosidad anómala. El método objeto también puede proporcionar un procedimiento para ampliar la duración de la depilación.

Además, debido a que un antagonista de *hedgehog* será a menudo citostático para las células epiteliales, en vez de citotóxico, tales agentes pueden usarse para proteger células del folículo piloso frente a agentes citotóxicos que requieren progresión en la fase S del ciclo celular para su eficacia, por ejemplo, muerte inducida por radiación. El tratamiento mediante el método objeto puede proporcionar protección al hacer que las células del folículo piloso se vuelvan quiescentes, por ejemplo, inhibiendo que las células entren en la fase S, e impidiendo de ese modo que las células del folículo experimenten una catástrofe mitótica o muerte celular programada. Por ejemplo, pueden usarse antagonistas de *hedgehog* para pacientes que se someten a quimio o radioterapias que dan como resultado normalmente la caída de pelo/cabello. Al inhibir la progresión del ciclo celular durante tales terapias, el tratamiento objeto puede proteger células del folículo piloso frente a la muerte, que resultaría si no de la activación de programas de muerte celular. Después de haber concluido la terapia, también puede retirarse el presente método con el alivio concomitante de la inhibición de la proliferación de células del folículo.

El método objeto también puede usarse en el tratamiento de foliculitis, tal como foliculitis decalvante, foliculitis uleritematosa reticulada o foliculitis queiloide. Por ejemplo, puede aplicarse una preparación cosmética de un antagonista de *hedgehog* de manera apical en el tratamiento de pseudofoliculitis, un trastorno crónico que se produce con la mayor frecuencia en la región submandibular del cuello y asociado con el afeitado, cuyas lesiones características son pápulas y pústulas eritematosas que contienen pelos/cabellos enterrados.

Además, el método objeto puede emplearse como modo de aumentar el crecimiento de pelo/cabello humano. Sato *et al.* (J Clin Invest 104: 855-864, octubre de 1999) notificaron que la regulación por incremento de la actividad de *Shh* en piel posnatal funciona como interruptor biológico que induce que folículos pilosos en reposo entren en la fase anágena con el consiguiente crecimiento de pelo/cabello. Sato *et al.* usaron un vector adenoviral, AdShh, para transferir el ADNc de *Shh* murino a la piel de ratones C57BL/6 del día 19 posnatal. La piel tratada mostró una expresión aumentada de ARNm de *Shh*, Patched (el receptor de *Shh*) y *Gli1* (un factor de transcripción en la ruta de *Shh*). En ratones que recibieron AdShh, pero no en los controles, fue evidente la aceleración en la fase anágena, puesto que aumentaron el tamaño del folículo piloso y la melanogénesis y se acumularon queratina ghHb-1 específica de pelo/cabello y ARNm de tirosinasa relacionada con la síntesis de melanina. Finalmente, ratones C57BL/6 mostraron una notable aceleración del inicio del crecimiento de nuevo pelo/cabello en la región de la administración de AdShh a la piel 2 semanas después del tratamiento, pero no en zonas no tratadas o tratadas con vector de control. Después de 6 meses, la piel tratada con AdShh mostró una morfología de la piel normal y pelo/cabello normal. Por tanto, puede ser útil en determinadas situaciones estimular el crecimiento de pelo/cabello inhibiendo determinados reguladores negativos de la ruta de *Hh* (véase la tabla Y anteriormente).

En otro aspecto de la invención, el método objeto puede usarse para inducir la diferenciación y/o inhibir la

proliferación de tejido derivado de manera epitelial. Tales formas de estas moléculas pueden proporcionar la base para la terapia de diferenciación para el tratamiento de estados hiperplásicos y/o neoplásicos que implican a tejido epitelial. Por ejemplo, tales preparaciones pueden usarse para el tratamiento de enfermedades cutáneas en las que existe una proliferación o crecimiento anómalos de células de la piel.

5 Por ejemplo, las preparaciones farmacéuticas descritas en el presente documento están destinadas para el tratamiento de estados epidérmicos hiperplásicos, tales como queratosis, así como para el tratamiento de estados epidérmicos neoplásicos tales como los caracterizados por una alta tasa de proliferación para diversos cánceres de piel, como por ejemplo carcinoma de células escamosas. El método objeto también puede usarse en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias que afectan a la piel, en particular, de enfermedades dermatológicas que implican la proliferación y/o queratinización patológica de la epidermis, como por ejemplo, provocada por psoriasis o dermatosis atópica.

Muchas enfermedades habituales de la piel, tales como psoriasis, carcinoma de células escamosas, queratoacantoma y queratosis actínica se caracterizan por proliferación y crecimiento anómalos localizados. Por ejemplo, en psoriasis, que se caracteriza por escamas, enrojecimientos, placas elevadas sobre la piel, se sabe que los queratinocitos proliferan mucho más rápidamente de lo normal y se diferencian de manera menos completa.

Las preparaciones de la presente invención pueden ser adecuadas para el tratamiento de dolencias dermatológicas vinculadas con trastornos de la queratinización que provocan una proliferación anómala de células de la piel, trastornos que pueden estar caracterizados por componentes o bien inflamatorios o bien no inflamatorios. Para ilustrarlo, pueden usarse preparaciones terapéuticas de un antagonista de *hedgehog*, por ejemplo, que fomenta la quiescencia o diferenciación para tratar formas variables de psoriasis, ya sean cutáneas, mucosas o ungueales. La psoriasis, tal como se describió anteriormente, se caracteriza normalmente por queratinocitos epidérmicos que presentan una activación proliferativa y diferenciación notables a lo largo de una ruta "regenerativa". El tratamiento con una realización antiproliferativa del método objeto puede usarse para revertir la activación epidérmica patológica y puede proporcionar la base para la remisión sostenida de la enfermedad.

Una variedad de otras lesiones queratósicas también son candidatas para el tratamiento con el método objeto. Las queratosis actínicas, por ejemplo, son tumores precancerosos inflamatorios superficiales que surgen en la piel expuesta al sol e irradiada. Las lesiones son de eritematosas a marrones con descamación variable. Las terapias actuales incluyen cirugía por escisión y criocirugía. Sin embargo, estos tratamientos son dolorosos, y a menudo producen cicatrización patológica inaceptable a nivel cosmético. Por consiguiente, el tratamiento de queratosis, tal como queratosis actínica, puede incluir la aplicación, preferiblemente tópica, de una composición de antagonista de *hedgehog* en cantidades suficientes para inhibir la hiperproliferación de células epidérmicas/epidermoides de la lesión.

El acné representa aún otra dolencia dermatológica que puede tratarse mediante el método objeto. El acné vulgar, por ejemplo, es una enfermedad multifactorial que se produce de la manera más habitual en adolescentes y adultos jóvenes, y se caracteriza por la aparición de lesiones inflamatorias y no inflamatorias en la cara y la parte superior del torso. El defecto básico que da lugar al acné vulgar es la hipercornificación del conducto de una glándula sebácea hiperactiva. La hipercornificación bloquea la movilidad normal de microorganismos de la piel y el folículo, y al pasar esto, estimula la liberación de lipasas por las bacterias *Propionobacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis*, y *Pitrosporum ovale*, una levadura. El tratamiento con un antagonista de *hedgehog* antiproliferativo, particularmente preparaciones tópicas, puede ser útil para prevenir las características transicionales de los conductos, por ejemplo, hipercornificación, que conduce a la formación de lesiones. El tratamiento objeto puede incluir además, por ejemplo, antibióticos, retinoides y antiandrógenos.

La presente memoria descriptiva también proporciona un método para tratar diversas formas de dermatitis. La dermatitis es un término descriptivo que hace referencia a lesiones escasamente delimitadas que son o bien pruriginosas, eritematosas, escamosas, con ampollas, exudativas, agrietadas o bien con costra. Estas lesiones surgen de cualquiera de una amplia variedad de causas. Los tipos más habituales de dermatitis son dermatitis atópica, de contacto y del pañal. Por ejemplo, la dermatitis seborreica es una dermatitis crónica, habitualmente pruriginosa, con eritema, descamación seca, húmeda o grasa, y manchas con costra de color amarillo en diversas zonas, especialmente el cuero cabelludo, con exfoliación de una cantidad excesiva de escamas secas. El método objeto también puede usarse en el tratamiento de dermatitis por estasis, una dermatitis a menudo crónica, habitualmente eccematosa. La dermatitis actínica es dermatitis que se debe a la exposición a radiación actínica tal como la procedente del sol, ondas ultravioletas, o radiación x o gamma. Según la presente invención, el método objeto puede usarse en el tratamiento y/o la prevención de determinados síntomas de dermatitis provocados por la proliferación no deseada de células epiteliales. Tales terapias para estas diversas formas de dermatitis también pueden incluir corticosteroides, antipruriginosos y antibióticos tópicos y sistémicos.

Las dolencias que pueden tratarse mediante el método objeto son trastornos específicos de seres no humanos, tales como sarna.

Todavía en otra realización, el método objeto puede usarse en el tratamiento de cánceres humanos, tales como tumores de tejidos epiteliales tales como la piel. Por ejemplo, pueden emplearse antagonistas de *hedgehog* en el

método objeto como parte de un tratamiento para carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas humanos y similares. Las formas de cáncer que pueden tratarse mediante los métodos objeto a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer o bien de células pequeñas o bien de células no pequeñas), cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, endometrial u otro cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de pene, cáncer de vagina, cáncer de uretra, cáncer de vesícula biliar, cáncer de esófago o cáncer de páncreas. Formas de cáncer a modo de ejemplo adicionales que pueden tratarse mediante los métodos objeto incluyen, pero no se limitan a, cáncer de músculo liso o esquelético, cáncer de estómago, cáncer de intestino delgado, cáncer de glándula salival, cáncer anal, cáncer rectal, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer de hipófisis y cáncer de nasofaringe. Formas de cáncer a modo de ejemplo adicionales que pueden tratarse con los antagonistas de *hedgehog* de la presente invención incluyen cánceres que comprenden células que expresan *hedgehog*. Todavía formas de cáncer a modo de ejemplo adicionales que pueden tratarse con los antagonistas de *hedgehog* de la presente invención incluyen cánceres que comprenden células que expresan *gli*. En una realización, el cáncer no se caracteriza por una mutación en *patched-1*.

Aún en otro aspecto, el método objeto puede usarse en la regulación de la actividad en una ruta de Shh no canónica que es independiente del complejo de receptor Patched-Smoothened y los factores de transcripción de Gli. En un informe reciente, Jarov *et al.* (Dev. Biol. 261(2): 520-536, 2003) describen que, cuando se inmovilizó Shh en el sustrato (matriz extracelular) o se produjo por las propias células neuroepiteliales después de transfección, explantes de placa neural no pudieron dispersarse y formaron en su lugar estructuras compactas. Los cambios en las capacidades adhesivas de las células neuroepiteliales provocados por Shh podrían explicarse por la inactivación de 1-integrinas de superficie combinada con un aumento de la adhesión celular mediada por N-cadherina. Esta adhesión mediada por Shh inmovilizada no contradice ni interfiere en las funciones inductivas, mitogénicas y tróficas mediadas por Shh (soluble) conocidas previamente, puesto que la Shh inmovilizada fomentó la diferenciación de células neuroepiteliales en neuronas motoras y células de la placa de suelo con la misma potencia que Shh soluble. Jarov *et al.* también demostraron que la regulación de Shh de propiedades de adhesión durante la morfogénesis del tubo neural es rápida y reversible, y no implica la ruta de señalización de Patched-Smoothened-Gli clásica, y es independiente y distinguible de la diferenciación celular mediada por Shh. Por tanto, las modificaciones de las propiedades adhesivas de células epiteliales neurales inducidas por Shh no pueden atribuirse a su efecto de fomento de la diferenciación, sino que revelan una función novedosa de Shh en este tejido que no se había descrito nunca anteriormente.

Por tanto, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para regular esta ruta de *hedgehog* no canónica que no depende de Ptc, Smo y/o Gli. Más específicamente, pueden usarse antagonistas de *hedgehog* (tal como inhibidores de iARN de Shh) para perturbar esta función en tejidos neuronales u otros aplicables, preferiblemente en fases de desarrollo específicas.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden antagonistas de *hedgehog*. Los antagonistas de *hedgehog* para su uso en el método objeto pueden formularse convenientemente para la administración con un medio biológicamente aceptable, tal como agua, solución salina tamponada, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) o mezclas adecuadas de los mismos. La concentración óptima del/de los principio(s) activo(s) en el medio elegido puede determinarse empíricamente, según procedimientos bien conocidos por los químicos farmacéuticos. Tal como se usa en el presente documento, "medio biológicamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, y similares que pueden ser apropiados para la vía de administración deseada de la preparación farmacéutica. El uso de tales medios para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en la medida que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con la actividad del antagonista de *hedgehog*, se contempla su uso en la preparación farmacéutica de la invención. Se describen vehículos adecuados y su formulación incluyendo otras proteínas, por ejemplo, en el libro *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company, Easton, Pa., EE.UU. 1985). Estos vehículos incluyen "formulaciones de depósito" inyectables.

Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden incluir composiciones veterinarias, por ejemplo, preparaciones farmacéuticas de los antagonistas de *hedgehog* adecuados para usos veterinarios, por ejemplo, para el tratamiento de ganado o animales domésticos, por ejemplo, perros.

También pueden proporcionarse métodos de introducción mediante dispositivos recargables o biodegradables. Diversos dispositivos poliméricos de liberación lenta se han desarrollado y sometido a prueba *in vivo* en los últimos años para la administración controlada de fármacos, incluyendo productos biofarmacéuticos proteicos. Una variedad de polímeros biocompatibles (incluyendo hidrogeles), incluyendo polímeros tanto biodegradables como no degradables, pueden usarse para formar un implante para la liberación sostenida de un antagonista de *hedgehog* en un sitio diana particular.

Las preparaciones descritas en el presente documento pueden administrarse por vía oral, por vía parenteral, de manera tópica o por vía rectal. Naturalmente, se administran mediante formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en forma de comprimidos o cápsula, mediante inyección, inhalación, loción ocular, pomada, supositorio, parche de liberación controlada, etc. administración mediante inyección, infusión

o inhalación; tópica mediante loción o pomada; y rectal mediante supositorios. Se prefieren las administraciones oral y tópica.

5 Las expresiones “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral” tal como se usa en el presente documento significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

10 Las expresiones “administración sistémica”, “administrado por vía sistémica”, “administración periférica” y “administrado por vía periférica” tal como se usan en el presente documento significan la administración de un compuesto, fármaco u otro material de manera distinta a directamente en el sistema nervioso central, de tal manera que entra en el sistema del paciente y, por tanto, está sujeto a metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

15 Estos compuestos pueden administrarse a seres humanos y otros animales para terapia por cualquier vía de administración adecuada, incluyendo por vía oral, por vía nasal, como mediante, por ejemplo, una pulverización, por vía rectal, por vía intravaginal, por vía parenteral, por vía intracisternal y de manera tópica, como mediante polvos, pomadas o gotas, incluyendo por vía bucal y por vía sublingual.

20 Independientemente de la vía de administración seleccionada, los antagonistas de iARN de la presente invención, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables tales como las descritas más adelante o mediante otros métodos convencionales que conocen los expertos en la técnica.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden variarse de modo que se obtenga una cantidad del principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particulares, sin ser tóxicos para el paciente.

25 El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto particular de la presente invención empleado, o el éster, la sal o amida del mismo, la vía de administración, el momento de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que está empleándose, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el antagonista de *hedgehog* particular empleado, la edad, el sexo, peso, estado, la salud general e historia médica previa del paciente que está tratándose, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

30 Un médico o veterinario experto habitual en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría iniciar el tratamiento con dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles menores a lo requerido para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado.

35 En general, una dosis diaria adecuada de un antagonista de iARN de la invención será aquella cantidad del compuesto que es la menor dosis eficaz que produce un efecto terapéutico. Tal dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Generalmente, las dosis intravenosas, intracerebroventriculares y subcutáneas de los compuestos de esta invención para un paciente oscilarán entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal al día.

40 Si se desea, la dosis diaria eficaz del compuesto activo puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados durante todo el día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria.

El término “tratamiento” pretende englobar también la profilaxis, terapia y cura.

45 El paciente que recibe este tratamiento es cualquier animal que lo necesite, incluyendo primates, en particular seres humanos, y otros mamíferos no humanos tales como animales equinos, ganado, cerdos y ovejas; y aves de corral y mascotas en general.

50 El antagonista de iARN descrito en el presente documento y/o al que se hace referencia en las reivindicaciones puede administrarse tal cual o en mezclas con portadores farmacéuticamente aceptables y/o estériles y también puede administrarse junto con otros agentes antimicrobianos tales como penicilinas, cefalosporinas, aminoglicósidos y glicopéptidos. Por tanto, la terapia conjunta incluye la administración secuencial, simultánea e independiente del compuesto activo de modo que los efectos terapéuticos de la primera administrada no haya desaparecido por completo cuando se administra la siguiente.

VII. Farmacogenómica

La capacidad para evaluar rápidamente la expresión génica en pacientes promete cambiar radicalmente los medios

mediante los que un médico selecciona un producto farmacéutico apropiado para tratar una enfermedad particular. Pueden obtenerse perfiles de expresión génica de tejido enfermo y pueden seleccionarse medidas terapéuticas basándose en el perfil de expresión génica. Esta metodología es particularmente eficaz cuando se conoce el mecanismo de acción molecular para un agente terapéutico dado. Dicho de otro modo, si un agente antitumoral actúa inhibiendo una oncoproteína particular, se desea saber si un cáncer particular expresa ese oncogén antes de intentar tratar el cáncer con el agente antitumoral. Como la obtención de perfiles de expresión se acelera, se abarata y se hace que sea más fiable, tal información puede llegar a ser una parte rutinaria de la selección de tratamiento, minimizando protocolos de tratamiento infructuosos y permitiendo la aplicación más rápida de agentes terapéuticos apropiados.

Además, si un conjunto de pacientes que presentan un determinado tipo de trastorno puede segregarse en subgrupos basándose en perfiles de expresión génica, pueden volver a someterse a prueba fármacos para determinar su capacidad para afectar a estos subgrupos definidos de pacientes. Por tanto, puede haberse encontrado ahora que fármacos que parecían inservibles en el grupo de pacientes en su totalidad son útiles para subgrupos de pacientes. Este tipo de examen puede permitir la resurrección de compuestos fallidos, la identificación de nuevos compuestos y la identificación de nuevos usos para compuestos bien conocidos.

La expresión de un gen particular puede evaluarse de muchos modos. Puede determinarse el nivel de transcrito de genes o el nivel de proteína codificada. La presencia de una proteína puede determinarse directamente, a través de métodos tales como unión a anticuerpos, espectroscopia de masas y electroforesis en gel bidimensional, o indirectamente, detectando una actividad de la proteína, ya sea una actividad biológica o un efecto sobre los niveles de otra proteína o la expresión de uno o más genes.

Se conocen bien en la técnica métodos para medir los niveles de transcritos de genes y dependen en su mayor parte de la hibridación de una sonda monocatenaria con el transcrito en cuestión (o un ADNc del mismo). Tales métodos incluyen transferencia de tipo Northern, usando una sonda marcada, o amplificación por PCR del ADNc (también conocida como RT-PCR). Pueden marcarse ARNm y ADNc según diversos métodos e hibridarse con un alineamiento de oligonucleótido. Tales alineamientos pueden contener sondas ordenadas correspondientes a uno o más genes, y en realizaciones preferidas, el alineamiento contiene sondas correspondientes a todos los genes en el genoma del organismo del que se obtuvo el ARN.

Actualmente se usan varias metodologías para la medición de la expresión génica. La más sensible de estas metodologías utiliza la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cuyos detalles se proporcionan en la patente estadounidense n.º 4.683.195, la patente estadounidense n.º 4.683.202, y la patente estadounidense n.º 4.965.188, todas concedidas a Mullis *et al.* Los detalles de la tecnología de PCR, por tanto, no se incluyen en el presente documento. Recientemente, se han descrito tecnologías adicionales para la amplificación de ácidos nucleicos, que se basan en su mayoría en estrategias de amplificación isotérmica en oposición a los ciclos de temperatura requeridos para PCR. Estas estrategias incluyen, por ejemplo, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA, *Strand Displacement Amplification*) (patentes estadounidenses n.ºs 5.455.166 y 5.457.027 ambas concedidas a Walker; Walker *et al.* (1992) PNAS 89:392) y amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA, *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) (patente estadounidense n.º 5.130.238 concedida a Malek *et al.*; patente europea 525882 concedida a Kievits *et al.*). Cada una de estas tecnologías de amplificación son similares en que emplean el uso de cebadores de ácido desoxirribonucleico cortos, para definir la región de amplificación, independientemente de las enzimas o condiciones específicas usadas.

Hasta recientemente, la amplificación de ARN requería una etapa independiente, adicional y el uso de enzimas transcriptasa inversa no termoestables para generar un ADNc que pudiese amplificarse por una ADN polimerasa termoestable, tal como Taq. El descubrimiento de una enzima termoestable recombinante (rTth) que puede acoplar la transcripción inversa del ARN con amplificación de ADN en un procedimiento con una única enzima: una única reacción simplificó enormemente y potenció la amplificación de ARN (véanse, Myers & Gelfand (1991) *Biochemistry* 30:7661-7666; la patente estadounidense n.º 5.407.800 concedida a Gelfand y Myers).

En el análisis de expresión génica con microalineamientos, un alineamiento de oligonucleótidos de "sonda" se pone en contacto con una muestra de ácido nucleico de interés, es decir, diana, tal como ARNm de poliA de un tipo de tejido particular. Se lleva a cabo el contacto en condiciones de hibridación y entonces se retira el ácido nucleico no unido. El patrón resultante de ácido nucleico hibridado proporciona información referente al perfil genético de la muestra sometida a prueba. El análisis de expresión génica encuentra uso en una variedad de aplicaciones, incluyendo: la identificación de expresión novedosa de genes, la correlación de expresión génica con un fenotipo particular, examen para determinar predisposición a enfermedad, identificando el efecto de un agente particular sobre la expresión génica celular, tal como en pruebas de toxicidad; entre otras aplicaciones. Se describen métodos detallados para analizar los niveles de transcritos en las siguientes patentes: la patente estadounidense n.º 5.082.830 y el documento WO 97/27317.

Otros referencias de interés incluyen: Schena *et al.*, *Science* (1995) 467-470; Schena *et al.*, P.N.A.S. U.S.A. (1996) 93: 10614-10616; Pietu *et al.*, *Genome Res.* (junio de 1996) 6: 492-503; Zhao *et al.*, *Gene* (24 de abril de 1995) 156: 207-213; Soares, *Curr. Opin. Biotechnol.* (octubre de 1997) 8: 542-546; Raval, J. *Pharmacol Toxicol Methods* (noviembre de 1994) 32: 125-127; Chalifour *et al.*, *Anal. Biochem* (1 de febrero de 1994) 216: 299-304; Stolz & Tuan,

Mol. Biotechnol. (diciembre de 1996) 6: 225-230; Hong *et al.*, Bioscience Reports (1982) 2: 907; y McGraw, Anal. Biochem. (1984) 143: 298.

VIII. Composiciones y formulaciones farmacéuticas

5 Los constructos de iARN descritos en el presente documento y/o a los que se hace referencia en las reivindicaciones también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, polímeros, moléculas dirigidas a receptores, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Los constructos de iARN objeto pueden proporcionarse en formulaciones que también incluyen potenciadores de la penetración, compuestos portadores y/o agentes de transfección.

10 Las patentes estadounidenses representativas que enseñan sobre la preparación de formulaciones que ayudan en la captación, distribución y/o absorción que pueden adaptarse para la administración de constructos de iARN incluyen, pero no se limitan a, los documentos U.S. 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.1543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 15 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.

Aunque es posible que un compuesto descrito en el presente documento se administre solo, se prefiere administrar el compuesto como formulación farmacéutica (composición). Los antagonistas de *hedgehog* según la memoria descriptiva pueden formularse para la administración de cualquier modo conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria. El compuesto incluido en la preparación farmacéutica puede ser activo por sí mismo, o puede ser un profármaco, por ejemplo, que puede convertirse en un compuesto activo en un ambiente fisiológico.

Por tanto, otro aspecto de la presente memoria descriptiva proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos descritos anteriormente, formulados junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables (aditivos) y/o diluyentes. Tal como se describe en detalle más adelante, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse especialmente para la administración en forma sólida o líquida, incluyendo las adaptadas para lo siguiente: (1) administración oral, por ejemplo, soluciones orales (disoluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua; (2) administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa como, por ejemplo, una disolución o suspensión estéril; (3) aplicación tópica, por ejemplo, como crema, pomada o pulverización aplicada a la piel; o (4) por vía intravaginal o por vía intrarrectal, por ejemplo, como óvulo vaginal, crema o espuma. Sin embargo, en determinadas realizaciones los compuestos objeto pueden simplemente disolverse o suspenderse en agua estéril. En determinadas realizaciones, la preparación farmacéutica no es pirogénica, es decir, no eleva la temperatura corporal de un paciente.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en el presente documento significa aquella cantidad de un compuesto, material o una composición que comprende un compuesto de la presente invención que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado al superar un fenotipo de ganancia de función de *hedgehog* en al menos una subpoblación de células en un animal y bloqueando de ese modo las consecuencias biológicas de esa ruta en las células tratadas, a una relación riesgo/beneficio razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del criterio médico fundado, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación riesgo/beneficio razonable.

La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento significa un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, un diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación líquido o sólido, implicado en portar o transportar los antagonistas objeto desde un órgano, o una parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás componentes de la formulación y no dañino para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) goma tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua apirógena; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) disoluciones de tampón fosfato; y (21) otras sustancias no tóxicas compatibles empleadas en las formulaciones farmacéuticas.

Tal como se expuso anteriormente, determinados aspectos de los presentes antagonistas de *hedgehog* pueden

contener un grupo funcional básico, tal como amino o alquilamino y, por tanto, pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con ácidos farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" a este respecto, se refiere a las sales de adición de ácido inorgánicas y orgánicas, relativamente no tóxicas de compuestos de la presente invención. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos de la invención, o haciendo reaccionar por separado un compuesto purificado de la invención en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal así formada. Las sales representativas incluyen las sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato y similares. (Véase, por ejemplo, Berge *et al.* (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19)

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos objeto incluyen las sales no tóxicas convencionales o sales de amonio cuaternario de los compuestos, por ejemplo, de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico, y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isotiónico, y similares.

En otros casos, los compuestos de la presente memoria descriptiva pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por tanto, pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" en estos casos se refiere a las sales de adición de base inorgánicas y orgánicas, relativamente no tóxicas de compuestos de la presente invención. Estas sales pueden prepararse asimismo *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos, o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de ácido libre con una base adecuada, tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, con amoniaco, o con una amina primaria, secundaria o terciaria orgánica farmacéuticamente aceptable. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares. Las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares. (Véase, por ejemplo, Berge *et al.*, citado anteriormente).

Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se forman con metales o aminas, tales como metales alcalinos o alcalinotérreos o aminas orgánicas. Ejemplos de metales usados como cationes son sodio, potasio, magnesio, calcio, y similares. Ejemplos de aminas adecuadas son N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, dicitlohexilamina, etilendiamina, N-metilglucamina, y procaína (véase, por ejemplo, Berge *et al.*, "Pharmaceutical Salts", J. of Pharma Sci., 1977, 66,1-19). Las sales de adición de base de dichos compuestos ácidos se preparan poniendo en contacto la forma de ácido libre con una cantidad suficiente de la base deseada para producir la sal de manera convencional. La forma de ácido libre puede regenerarse poniendo en contacto la forma de sal con un ácido y aislando el ácido libre de manera convencional. Las formas de ácido libre difieren algo de sus formas de sal respectivas en determinadas propiedades físicas tales como solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a su ácido libre respectivo para los fines de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, una "sal de adición farmacéutica" incluye una sal farmacéuticamente aceptable de una forma de ácido de uno de los componentes de las composiciones de la invención. Estas incluyen sales de ácido orgánico o inorgánico de las aminas. Sales de ácido preferidas son los clorhidratos, acetatos, salicilatos, nitratos y fosfatos. Otras sales farmacéuticamente aceptables adecuadas las conocen bien los expertos en la técnica e incluyen sales básicas de una variedad de ácidos inorgánicos y orgánicos.

Para oligonucleótidos de ARNip, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen pero no se limitan a (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina, etc.; (b) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; (c) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido algínico, poli(ácido glutámico), ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, poli(ácido galacturónico), y similares; y (d) sales formadas a partir de aniones elementales tales como cloro, bromo y yodo.

También pueden estar presentes en las composiciones agentes humidificantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes liposolubles, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alpha-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Las formulaciones incluyen las adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del huésped que esté tratándose, el modo de administración particular. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación individual será generalmente aquella cantidad del compuesto que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por cien, esta cantidad oscilará entre aproximadamente el 1 por ciento y aproximadamente el noventa y nueve por ciento de principio activo, preferiblemente entre aproximadamente el 5 por ciento y aproximadamente el 70 por ciento, lo más preferiblemente entre aproximadamente el 10 por ciento y aproximadamente el 30 por ciento.

Los métodos de preparación de estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de poner en asociación un compuesto de la presente invención con el portador y, opcionalmente, uno o más componentes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente un compuesto de la presente invención con portadores líquidos, o portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si es necesario, conformando el producto.

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o goma tragacanto), polvos, gránulos, o como disolución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como colutorios y similares, que contienen, cada uno, una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como principio activo. Un compuesto de la presente invención también puede administrarse como bolo, electuario o pasta.

En formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), se mezcla el principio activo con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humidificantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de tipo bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina de relleno blando o duro usando excipientes tales como lactosa o azúcares de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Puede producirse un comprimido mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes auxiliares. Pueden prepararse comprimidos sometidos a compresión usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa sódica reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Pueden producirse comprimidos moldeados mediante moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos, y otras formas de dosificación sólidas de las composiciones farmacéuticas, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden ranurarse opcionalmente o prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. También pueden formularse de modo que se proporcione la liberación lenta o controlada del principio activo en los mismos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices de polímero, liposomas y/o microsferas. Pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden tener una composición tal que liberan el/los principio(s) activo(s) sólo, o preferentemente, en una parte determinada del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de incrustación que pueden usarse incluyen ceras y sustancias poliméricas. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados habitualmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como

alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, los aceites de semilla de algodón, maní, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos.

- 5 Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humidificantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de polioxietileno-sorbitol y sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y goma tragacanto, y mezclas de los mismos.

Se sabe que los esteroides, tales como el colesterol, formarán complejos con ciclodextrinas. Por tanto, en realizaciones preferidas, cuando el inhibidor es un alcaloide esteroideo, puede formularse con ciclodextrinas, tales como α , β y γ -ciclodextrina, dimetil- β -ciclodextrina y 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.

15 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas para administración rectal o vaginal pueden presentarse como supositorio, que puede prepararse mezclando uno o más compuestos de la invención con uno o más portadores o excipientes no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para supositorios o un salicilato, y que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a la temperatura corporal y, por tanto, se fundirá en el recto o la cavidad vaginal y liberará el antagonista de *hedgehog* activo.

20 Las formulaciones que son adecuadas para administración vaginal también incluyen óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones para pulverización que contienen tales portadores que se sabe en la técnica que son apropiados.

25 Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un compuesto incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo puede mezclarse en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propelente que pueda requerirse.

Las pomadas, pastas, cremas y los geles pueden contener, además de un compuesto activo de esta invención, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, goma tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos.

30 Los polvos y las pulverizaciones pueden contener, además de un compuesto de esta invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Las pulverizaciones pueden contener adicionalmente propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos no sustituidos volátiles, tales como butano y propano.

35 Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar la administración controlada de un compuesto de la presente invención al cuerpo. Tales formas de dosificación pueden producirse disolviendo o dispersando los antagonistas de *hedgehog* en el medio apropiado. Los potenciadores de la absorción también pueden usarse para aumentar el flujo de los antagonistas de *hedgehog* a través de la piel. La velocidad de tal flujo puede controlarse o bien proporcionando una membrana de control de velocidad o bien dispersando el compuesto en un gel o una matriz de polímero.

40 Otro aspecto de la memoria descriptiva proporciona aerosoles para la administración de constructos de iARN a las vías respiratorias. Las vías respiratorias incluyen las vías respiratorias altas, incluyendo la orofaringe y la laringe, seguidas por las vías respiratorias bajas, que incluyen la tráquea seguida por bifurcaciones para dar los bronquios y bronquiolos. Las vías respiratorias altas y bajas se denominan las vías respiratorias de conducción. Los bronquiolos terminales se dividen entonces en bronquiolos respiratorios que conducen luego a la zona respiratoria final, los alveolos, o zona profunda del pulmón.

45 En el presente documento, la administración mediante inhalación puede ser oral y/o nasal. Los ejemplos de dispositivos farmacéuticos para la administración en aerosol incluyen inhaladores dosificadores (MDI, *metered-dose inhaler*), inhaladores de polvo seco (DPI, *dry powder inhaler*) y nebulizadores de chorro de aire. Los sistemas de suministro de ácido nucleico a modo de ejemplo mediante inhalación que pueden adaptarse fácilmente para el suministro de los constructos de iARN objeto se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses 5.756.353; 5.858.784; y las solicitudes PCT WO98/31346; WO98/10796; WO00/27359; WO01/54664; WO02/060412. Otras formulaciones en aerosol que pueden usarse para suministrar los ARN bicatenarios se describen en las patentes estadounidenses 6.294.153; 6.344.194; 6.071.497, y las solicitudes PCT WO02/066078; WO02/053190; WO01/60420; WO00/66206. Además, pueden adaptarse métodos para suministrar constructos de iARN de los usados en el suministro de otros oligonucleótidos (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) mediante inhalación, tales como descritos en Templin *et al.*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2000, 10:359-68; Sandrasagra *et al.*, *Expert Opin Biol Ther*, 2001, 1:979-83; Sandrasagra *et al.*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2002, 12:177-81.

- Los pulmones humanos pueden retirar o degradar rápidamente aerosoles depositados escindibles hidrolíticamente a lo largo de periodos que oscilan entre minutos y horas. En las vías respiratorias altas, epitelios ciliados contribuyen a la “escalera mucociliar” mediante la cual se barren partículas de las vías respiratorias hacia la boca. Pavia, D., “Lung Mucociliary Clearance”, en *Aerosols and the Lung: Clinical and Experimental Aspects*, Clarke, S. W. y Pavia, D., Eds., Butterworths, Londres, 1984. En las zonas profundas del pulmón, los macrófagos alveolares pueden fagocitar partículas poco después de su deposición. Warheit *et al.* *Microscopy Res. Tech.*, 26: 412-422 (1993); y Brain, J. D., “Physiology and Pathophysiology of Pulmonary Macrophages”, en *The Reticuloendothelial System*, S. M. Reichard y J. Filkins, Eds., Plenum, Nueva York., págs. 315-327, 1985. La zona profunda del pulmón, o los alveolos, son la diana principal de los aerosoles terapéuticos inhalados para el suministro sistémico de constructos de iARN.
- 5
- 10 Preferiblemente, en particular cuando se desea la dosificación sistémica con el constructo de iARN, los constructos de iARN aerosolizados se formulan como micropartículas. Las micropartículas que tienen un diámetro de entre 0,5 y diez micrómetros pueden penetrar en los pulmones, atravesando la mayor parte de las barreras naturales. Se requiere un diámetro de menos de diez micrómetros para sortear la garganta; se requiere un diámetro de 0,5 micrómetros o mayor para evitar su exhalación.
- 15 Otro aspecto de la memoria descriptiva se refiere a dispositivos médicos recubiertos. Por ejemplo, la memoria descriptiva objeto proporciona un dispositivo médico que tiene un recubrimiento adherido al menos a una superficie, en el que el recubrimiento incluye la matriz de polímero objeto y un constructo de iARN que contiene modificaciones tal como se da a conocer en el presente documento. Opcionalmente, el recubrimiento comprende además proteína asociada de manera no covalente con el constructo de iARN (o que se selecciona para interactuar con el
- 20 constructo de iARN tras su liberación del recubrimiento). Tales recubrimientos pueden aplicarse a instrumental quirúrgico tal como tornillos, placas, arandelas, suturas, anclajes de prótesis, clavos, grapas, cables eléctricos, válvulas, membranas. Los dispositivos pueden ser catéteres, dispositivos intraluminales, hilos, vías vasculares centrales implantables, bolsas de sangre, tubos para sangre, catéteres venosos centrales, catéteres arteriales, injertos vasculares, bombas de balón intraaórtico, válvulas cardíacas, suturas cardiovasculares, corazones artificiales, un marcapasos, bombas de asistencia ventricular, dispositivos extracorporales, filtros para sangre,
- 25 unidades de hemodiálisis, unidades de hemoperfusión, unidades de plasmaféresis y filtros adaptados para el despliegue en un vaso sanguíneo.
- Pueden combinarse monómeros para formar un polímero con un constructo de iARN y se mezclan para producir una dispersión homogénea del constructo de iARN en la disolución de monómeros. Luego se aplica la dispersión a una endoprótesis u otro dispositivo según un procedimiento de recubrimiento convencional, después de que se inicie el
- 30 procedimiento de reticulación mediante un iniciador convencional, tal como luz UV. También puede combinarse una composición de polímero con un constructo de iARN para formar una dispersión. Luego se aplica la dispersión a una superficie de un dispositivo médico y se reticula el polímero para formar un recubrimiento sólido. Además pueden combinarse un polímero y un constructo de iARN con un disolvente adecuado para formar una dispersión, que luego se aplica a una endoprótesis de modo convencional. Luego se elimina el disolvente mediante un procedimiento convencional, tal como evaporación con calor, con el resultado de que el polímero y el constructo de iARN (que forman juntos un sistema de administración de fármacos de liberación sostenida) permanecen sobre la endoprótesis como recubrimiento. Puede usarse un procedimiento análogo cuando el constructo de iARN se disuelve en la
- 35 composición de polímero. Cuando el iARN va a premezclarse con una proteína, se seleccionan preferiblemente disolventes para preservar la estructura terciaria de la proteína.
- 40 El sistema puede comprender un polímero que es relativamente rígido. El sistema también puede comprender un polímero que es blando y maleable. El sistema puede incluir un polímero que tiene un carácter adhesivo. La dureza, elasticidad, adhesividad, y otras características del polímero son ampliamente variables, dependiendo de la forma física final particular del sistema, tal como se analiza en más detalle a continuación.
- 45 El sistema descrito en el presente documento puede adoptar muchas formas diferentes. El sistema puede consistir en el constructo de iARN en suspensión o disperso en el polímero. El sistema también puede consistir en un constructo de iARN y un polímero semisólido o en gel, que está adaptado para inyectarse mediante una jeringa a un cuerpo. El sistema puede consistir alternativamente en un constructo de iARN y un polímero flexible blando, que está adaptado para insertarse o implantarse en un cuerpo mediante un método quirúrgico adecuado. Además, el
- 50 sistema puede consistir en un polímero sólido, duro que está adaptado para insertarse o implantarse en un cuerpo mediante un método quirúrgico adecuado. Todavía más, el sistema puede comprender un polímero que tiene el constructo de iARN en suspensión o disperso en el mismo, en el que la mezcla del constructo de iARN y del polímero forma un recubrimiento sobre un instrumento quirúrgico, tal como un tornillo, endoprótesis, marcapasos, etc. Además, el dispositivo puede consistir en un polímero sólido, duro que está conformado en forma de un instrumento quirúrgico tal como un tornillo quirúrgico, placa, endoprótesis, etc., o alguna parte de los mismos. Además, el sistema puede incluir un polímero que está en forma de una sutura que tiene el constructo de iARN disperso o en suspensión en la misma.
- 55
- Se proporciona por la memoria descriptiva un dispositivo médico que comprende un sustrato que tiene una superficie, tal como una superficie exterior, y un recubrimiento sobre la superficie exterior. El recubrimiento
- 60 comprende un polímero y un constructo de iARN disperso en el polímero, en el que el polímero es permeable para el constructo de iARN o se biodegrada para liberar el constructo de iARN. Opcionalmente, el recubrimiento comprende

además una proteína que se asocia con el constructo de iARN. El dispositivo puede comprender un constructo de iARN en suspensión o disperso en un polímero adecuado, en el que el constructo de iARN y el polímero se recubren sobre la totalidad de un sustrato, por ejemplo, un instrumento quirúrgico. Tal recubrimiento puede lograrse mediante recubrimiento por pulverización o recubrimiento por inmersión.

- 5 Además, el dispositivo puede comprender un constructo de iARN y la suspensión o dispersión de polímero, en el que el polímero es rígido, y forma una parte constituyente de un dispositivo que va a insertarse o implantarse en un cuerpo. Opcionalmente, la suspensión o dispersión comprende además un polipéptido que interacciona de manera no covalente con el constructo de iARN. Por ejemplo, el dispositivo es un tornillo quirúrgico, endoprótesis, marcapasos, etc. recubierto con el constructo de iARN en suspensión o disperso en el polímero. Además, el
- 10 polímero en el que el constructo de iARN está en suspensión puede formar una punta o un cabezal, o parte de los mismos, de un tornillo quirúrgico. El polímero en el que el constructo de iARN también puede estar en suspensión o disperso se recubre sobre un instrumento quirúrgico tal como tubos quirúrgicos (tales como tubos para colostomía, lavado peritoneal, catéter e intravenosos). El dispositivo puede ser una aguja intravenosa que tiene el polímero y el constructo de iARN recubiertos sobre la misma.
- 15 Tal como se analizó anteriormente, el recubrimiento descrito en el presente documento comprende un polímero que es bioerosionable o no bioerosionable. La elección de polímero bioerosionable frente a no bioerosionable se realiza basándose en el uso final pretendido del sistema o dispositivo. El polímero puede ser ventajosamente bioerosionable. Por ejemplo, cuando el sistema es un recubrimiento sobre un dispositivo implantable quirúrgicamente, tal como un tornillo, endoprótesis, marcapasos, etc., el polímero es ventajosamente bioerosionable.
- 20 Otros aspectos según la presente memoria descriptiva en los que el polímero es ventajosamente bioerosionable incluyen dispositivos que son implantables, inhalables o suspensiones o dispersiones inyectables de constructo de iARN en un polímero, en el que no se utilizan los elementos adicionales (tales como tornillos o anclajes).

En algunos aspectos según la presente memoria descriptiva en los que el polímero es escasamente permeable y bioerosionable, la velocidad de bioerosión del polímero ventajosamente es suficientemente más lenta que la

25 velocidad de liberación de constructo de iARN de modo que el polímero permanece en su lugar durante un periodo de tiempo sustancial después de haberse liberado el constructo de iARN, pero se bioerosiona eventualmente y se reabsorbe en el tejido circundante. Por ejemplo, cuando el dispositivo es una sutura bioerosionable que comprende el constructo de iARN en suspensión o disperso en un polímero bioerosionable, la velocidad de bioerosión del polímero es ventajosamente lo suficientemente lenta como para que se libere el constructo de iARN de manera

30 lineal a lo largo de un periodo de aproximadamente tres a aproximadamente 14 días, pero las suturas persisten durante un periodo de aproximadamente tres semanas a aproximadamente seis meses. Dispositivos similares según la presente invención incluyen grapas quirúrgicas que comprenden un constructo de iARN en suspensión o disperso en un polímero bioerosionable.

La velocidad de bioerosión del polímero puede ser ventajosamente del mismo orden que la velocidad de liberación de constructo de iARN. Por ejemplo, cuando el sistema comprende un constructo de iARN en suspensión o disperso en un polímero que se recubre sobre un instrumento quirúrgico, tal como un tornillo ortopédico, una endoprótesis, un marcapasos o una sutura no bioerosionable, el polímero se bioerosiona ventajosamente a tal velocidad que el área superficial del constructo de iARN que está expuesta directamente al tejido corporal circundante permanece sustancialmente constante a lo largo del tiempo.

40 El vehículo de polímero puede ser permeable al agua en el tejido circundante, por ejemplo en plasma sanguíneo. En tales casos, la disolución acuosa puede permear el polímero, poniendo de ese modo en contacto el constructo de iARN. La velocidad de disolución puede estar regida por un conjunto complejo de variables, tales como la permeabilidad del polímero, la solubilidad del constructo de iARN, el pH, la fuerza iónica y la composición de proteínas, etc. del líquido fisiológico.

45 El polímero también puede ser no bioerosionable. Los polímeros no bioerosionables son especialmente útiles cuando el sistema incluye un polímero destinado a recubrirse sobre, o formar una parte constituyente, de un instrumento quirúrgico que está adaptado para insertarse o implantarse de manera permanente, o semipermanente, en un cuerpo. Los dispositivos en los que el polímero forma ventajosamente un recubrimiento permanente sobre un instrumento quirúrgico a modo de ejemplo incluyen un tornillo ortopédico, una endoprótesis, una articulación

50 protésica, una válvula artificial, una sutura permanente, un marcapasos, etc.

Existe una multiplicidad de diferentes endoprótesis que pueden utilizarse tras angioplastia coronaria transluminal percutánea. Aunque puede utilizarse cualquier número de endoprótesis según la presente memoria descriptiva, por simplicidad, se describirá un número limitado de endoprótesis en realizaciones a modo de ejemplo de la presente memoria descriptiva. El experto en la técnica reconocerá que puede utilizarse cualquier número de endoprótesis en

55 relación con la presente invención. Además, tal como se estableció anteriormente, pueden utilizarse otros dispositivos médicos.

Una endoprótesis se usa habitualmente como estructura tubular que se deja en el interior de la luz de un conducto para aliviar una obstrucción. Habitualmente, las endoprótesis se insertan en la luz en una forma no expandida y luego se expanden de manera autónoma, o con la ayuda de un segundo dispositivo *in situ*. Un método de expansión

típico se produce a través del uso de un balón de angioplastia montado en catéter que se infla dentro del paso corporal o vaso estenosado para someter a cizalladura y perturbar las obstrucciones asociadas con los componentes de pared del vaso y obtener una luz ampliada.

5 Las endoprótesis de la presente memoria descriptiva pueden fabricarse utilizando cualquier número de métodos. Por ejemplo, la endoprótesis puede fabricarse a partir de un tubo de acero inoxidable hueco o formado que puede mecanizarse usando láseres, fresado por descarga eléctrica, ataque químico u otros medios. La endoprótesis se inserta en el cuerpo y se coloca en el sitio deseado en una forma no expandida. Por ejemplo, puede efectuarse la expansión en un vaso sanguíneo mediante un catéter de balón, en el que el diámetro final de la endoprótesis es una función del diámetro del catéter de balón usado.

10 Debe apreciarse que una endoprótesis según la presente invención puede realizarse de un material con memoria de forma, incluyendo, por ejemplo, una aleación apropiada de níquel y titanio o acero inoxidable.

15 Puede hacerse que estructuras formadas a partir de acero inoxidable sean autoexpandibles configurando el acero inoxidable de una manera predeterminada, por ejemplo, retorciéndolo para dar una configuración trenzada. En este aspecto después de haberse formado la endoprótesis, puede comprimirse para ocupar un espacio lo suficientemente pequeño como para permitir su inserción en un vaso sanguíneo u otro tejido mediante medios de inserción, en el que los medios de inserción incluyen un catéter adecuado, o una varilla flexible.

Al salir del catéter, la endoprótesis puede estar configurada para expandirse en la configuración deseada en la que la expansión es automática o está desencadenada por un cambio de presión, temperatura o estimulación eléctrica.

20 Independientemente del diseño de la endoprótesis, se prefiere tener el constructo de iARN aplicado con suficiente especificidad y una concentración suficiente para proporcionar una dosificación eficaz en el área de lesión. A este respecto, el "tamaño de depósito" en el recubrimiento se dimensiona preferiblemente para aplicar adecuadamente el constructo de iARN en la locación deseada y en la cantidad deseada.

25 En un ejemplo alternativo, la totalidad de las superficies interior y exterior de la endoprótesis pueden recubrirse con el constructo de iARN en cantidades de dosificación terapéutica. Sin embargo, es importante observar que las técnicas de recubrimiento pueden variar dependiendo del constructo de iARN y cualquier proteína incluida. Además, las técnicas de recubrimiento pueden variar dependiendo del material que comprende la endoprótesis u otro dispositivo médico intraluminal.

30 El dispositivo médico intraluminal comprende el recubrimiento de administración de fármacos de liberación sostenida. El recubrimiento de constructo de iARN puede aplicarse a la endoprótesis mediante un procedimiento de recubrimiento convencional, tal como recubrimiento por impregnación, recubrimiento por pulverización y recubrimiento por inmersión.

35 Un dispositivo médico intraluminal puede comprender una endoprótesis tubular expandible radialmente alargada que tiene una superficie luminal interior y una superficie exterior opuesta que se extiende a lo largo del eje longitudinal de la endoprótesis. La endoprótesis puede incluir una endoprótesis implantable permanente, una endoprótesis recubierta implantable, o una endoprótesis temporal, en la que la endoprótesis temporal se define como una endoprótesis que puede expandirse en el interior de un vaso y después de eso puede retraerse del vaso. La configuración de endoprótesis puede comprender una endoprótesis en espiral, una endoprótesis en espiral con memoria, una endoprótesis de Nitinol, una endoprótesis de malla, una endoprótesis con andamiaje, una endoprótesis con manguito, una endoprótesis permeable, una endoprótesis que tiene un sensor de temperatura, una endoprótesis porosa, y similares. La endoprótesis puede desplegarse según una metodología convencional, tal como mediante un catéter de balón inflable, mediante un mecanismo de autodespliegue (después de la liberación de un catéter), o mediante otros medios apropiados. La endoprótesis tubular expandible radialmente alargada puede ser una endoprótesis recubierta, en el que la endoprótesis recubierta es un dispositivo compuesto que tiene una endoprótesis en el interior o en el exterior de un injerto. El injerto puede ser un injerto vascular, tal como un injerto de ePTFE, un injerto biológico o un injerto tejido.

45 El constructo de iARN, y cualquier molécula asociada, puede incorporarse sobre o fijarse a la endoprótesis de varios modos. Por ejemplo, el constructo de iARN se incorpora directamente en una matriz polimérica y se pulveriza sobre la superficie exterior de la endoprótesis. El constructo de iARN eluye de la matriz polimérica a lo largo del tiempo y entra en el tejido circundante. El constructo de iARN permanece preferiblemente sobre la endoprótesis durante al menos tres días hasta aproximadamente seis meses, y más preferiblemente entre siete y treinta días.

El polímero según la presente memoria descriptiva comprende cualquier polímero tolerado biológicamente que es permeable para el constructo de iARN y mientras que tiene una permeabilidad tal que no es el principal factor determinante de la velocidad en la velocidad de liberación del constructo de iARN del polímero.

55 El polímero puede ser no bioerosionable. Los ejemplos de polímeros no bioerosionables útiles en la presente invención incluyen poli(etileno-co-acetato de vinilo) (EVA), poli(alcohol vinílico) y poliuretanos, tales como poliuretanos basados en policarbonato. El polímero también puede ser bioerosionable. Los ejemplos de polímeros bioerosionables útiles incluyen polianhídrido, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), polioroéster, poli(cianoacrilato

de alquilo) o derivados y copolímeros de los mismos. El experto en la técnica reconocerá que la elección de bioerosionabilidad o no bioerosionabilidad del polímero depende de la forma física final del sistema, tal como se describe en mayor detalle a continuación. Otros polímeros a modo de ejemplo incluyen polisilicona y polímeros derivados de ácido hialurónico. El experto en la técnica entenderá que el polímero según la presente invención se prepara en condiciones adecuadas para conferir permeabilidad de tal manera que no sea el principal factor determinante de la velocidad en la liberación del constructo de iARN del polímero.

Además, los polímeros adecuados incluyen materiales que se producen de manera natural (colágeno, ácido hialurónico, etc.) o sintéticos que son biológicamente compatibles con los líquidos corporales y tejidos de mamíferos, y esencialmente insolubles en los líquidos corporales con los que entrará en contacto el polímero. Además, los polímeros adecuados impiden esencialmente la interacción entre el constructo de iARN disperso/en suspensión en el polímero y componentes proteicos en el líquido corporal. El uso de polímeros que se disuelven rápidamente o polímeros altamente solubles en el líquido corporal o que permiten la interacción entre el constructo de iARN y componentes proteicos endógenos ha de evitarse en determinados casos puesto que la disolución del polímero o la interacción con componentes proteicos afectará a la constancia de liberación de fármaco. La selección de polímeros puede diferir cuando el constructo de iARN se asocia previamente con proteína en el recubrimiento.

Otros polímeros adecuados incluyen polipropileno, poliéster, poli(etileno-acetato de vinilo) (PVA o EVA), poli(óxido de etileno) (PEO), poli(óxido de propileno), poli(ácidos carboxílicos), poli(acrilatos de alquilo), éteres de celulosa, silicona, poli(dl-lactida-co-glicolida), diversos Eudragit (por ejemplo, NE30D, RS PO y RL PO), copolímeros de poli(alquiacrilato de alquilo), copolímeros de bloque de poliéster-poliuretano, copolímeros de bloque de poliéter-poliuretano, polidioxanona, poli-(β-hidroxibutirato), poli(ácido láctico) (PLA), policaprolactona, poli(ácido glicólico) y copolímeros de PEO-PLA.

El recubrimiento descrito en el presente documento puede formarse mezclando uno o más monómeros adecuados y un constructo de iARN adecuado, polimerizando luego el monómero para formar el sistema de polímero. De este modo, el constructo de iARN, y cualquier proteína asociada, se disuelve o dispersa en el polímero. En otras realizaciones, el constructo de iARN, y cualquier proteína asociada, se mezcla en un polímero líquido o dispersión de polímero y luego se procesa adicionalmente el polímero para formar el recubrimiento de la invención. El procesamiento adicional adecuado puede incluir reticulación con constructos de iARN de reticulación adecuados, polimerización adicional del polímero líquido o la dispersión de polímero, copolimerización con un monómero adecuado, copolimerización de bloque con bloques de polímero adecuados, etc. El procesamiento adicional atrapa el constructo de iARN en el polímero de modo que el constructo de iARN está en suspensión o disperso en el vehículo de polímero.

Puede utilizarse cualquier número de polímeros no erosionables junto con el constructo de iARN. Polímeros formadores de película que pueden usarse para recubrimientos en esta solicitud pueden ser absorbibles o no absorbibles y deben ser biocompatibles para minimizar la irritación del vaso sanguíneo. El polímero puede ser o bien bioestable o bien bioabsorbible dependiendo de la velocidad de liberación deseada o el grado de estabilidad de polímero deseado, pero puede preferirse un polímero bioabsorbible puesto que, a diferencia de un polímero bioestable, no estará presente mucho tiempo después de la implantación para provocar cualquier respuesta local adversa, crónica. Además, los polímeros bioabsorbibles no presentan el riesgo de que a lo largo de periodos de tiempo prolongados pudiera haber una pérdida de adhesión entre la endoprótesis y el recubrimiento provocada por las tensiones del entorno biológico que podrían expulsar el recubrimiento e introducir problemas adicionales incluso después de encapsularse la endoprótesis en tejido.

Los polímeros bioabsorbibles formadores de película adecuados que podrían usarse incluyen polímeros seleccionados del grupo que consiste en poliésteres alifáticos, poli(aminoácidos), copoli(éter-ésteres), poli(oxalatos de alquileno), poliamidas, poli(iminocarbonatos), poliortoésteres, polioxaésteres, poliamidoésteres, polioxaésteres que contienen grupos amido, poli(anhídridos), polifosfazenos, biomoléculas y combinaciones de los mismos. Con el fin de esta invención, los poliésteres alifáticos incluyen homopolímeros y copolímeros de lactida (que incluye ácido láctico d, l y meso-lactida), ε-caprolactona, glicolida (incluyendo ácido glicólico), hidroxibutirato, hidroxivalerato, para-dioxanona, carbonato de trimetileno (y sus derivados de alquilo), 1,4-dioxepan-2-ona, 1,5-dioxepan-2-ona, 6,6-dimetil-1,4-dioxan-2-ona y combinaciones poliméricas de los mismos. Poli(iminocarbonato) con el fin de esta invención incluye tal como se describe por Kemnitzer y Kohn, en the Handbook of Biodegradable Polymers, editado por Domb, Kost y Wisemen, Hardwood Academic Press, 1997, páginas 251-272. Los copoli(éter-ésteres) con el fin de esta invención incluyen aquellos copoliéster-éteres descritos en Journal of Biomaterials Research, vol. 22, páginas 993-1009, 1988 por Cohn y Younes y Cohn, Polymer Preprints (ACS Division of Polymer Chemistry) vol. 30(1), página 498, 1989 (por ejemplo PEO/PLA). Los poli(oxalatos de alquileno) con el fin de esta invención incluyen las patentes estadounidenses n.ºs 4.208.511; 4.141.087; 4.130.639; 4.140.678; 4.105.034; y 4.205.399. Los polifosfazenos, polímeros basados en co, ter y monómero mixto de orden superior compuestos por L-lactida, D,L-lactida, ácido láctico, glicolida, ácido glicólico, para-dioxanona, carbonato de trimetileno y ε-caprolactona tal como se describe por Allcock en The Encyclopedia of Polymer Science, vol. 13, páginas 31-41, Wiley Intersciences, John Wiley & Sons, 1988 y por Vandorpe, Schacht, Dejardin y Lemmouchi en the Handbook of Biodegradable Polymers, editado por Domb, Kost y Wisemen, Hardwood Academic Press, 1997, páginas 161-182. Los polianhídridos procedentes de diácidos de la forma HOOC-C₆H₄-O-(CH₂)_m-O-C₆H₄-COOH en la que m es un número entero en el intervalo de 2 a 8 y copolímeros de los mismos con diácidos alfa-omega alifáticos de hasta 12 carbonos. Se

describen polioxaésteres, polioxaamidas y polioxaésteres que contienen grupos amido y/o aminos en uno o más de las siguientes patentes estadounidenses n.ºs 5.464.929; 5.595.751; 5.597.579; 5.607.687; 5.618.552; 5.620.698; 5.645.850; 5.648.088; 5.698.213 y 5.700.583. Poliortoésteres tales como los descritos por Heller en Handbook of Biodegradable Polymers, editado por Domb, Kost y Wisemen, Hardwood Academic Press, 1997, páginas 99-118.

- 5 Las biomoléculas poliméricas formadoras de película para el fin de esta invención incluyen materiales que se producen de manera natural que pueden degradarse de manera enzimática en el cuerpo humano o son inestables de manera hidrolítica en el cuerpo humano tal como fibrina, fibrinógeno, colágeno, elastina, y polisacáridos biocompatibles absorbibles tales como quitosano, almidón, ácidos grasos (y ésteres de los mismos), glucosoglicanos y ácido hialurónico.
- 10 También podrían usarse polímeros bioestables formadores de película adecuados con respuesta tisular crónica relativamente baja, tales como poliuretanos, siliconas, poli(met)acrilatos, poliésteres, poli(óxidos de alquilo) (poli(óxido de etileno)), poli(alcoholes vinílicos), polietilenglicoles y polivinilpirrolidona, así como, hidrogeles tales como los formados a partir de polivinilpirrolidona reticulada y poliésteres. También podrían usarse otros polímeros si pueden disolverse, curarse o polimerizarse sobre la endoprótesis. Estos incluyen poliolefinas, poliisobutileno y
- 15 copolímeros de etileno-alfa-olefina; polímeros (incluyendo metacrilato) y copolímeros acrílicos, polímeros y copolímeros de haluros de vinilo, tales como poli(cloruro de vinilo); poli(vinil éteres), tales como poli(vinil metil éter); poli(haluros de vinilideno) tales como poli(fluoruro de vinilideno) y poli(cloruro de vinilideno); poliacrilonitrilo, polivinilcetonas; polímeros de vinilo aromáticos tales como poliestireno; poli(ésteres vinílicos) tales como poli(acetato de vinilo); copolímeros de monómeros vinílicos entre sí y con olefinas, tales como copolímeros de etileno-metacrilato de metilo, copolímeros de acrilonitrilo-estireno, resinas de ABS y copolímeros de etileno-acetato de vinilo;
- 20 poliamidas, tales como nailon 66 y policaprolactama; resinas alquídicas; policarbonatos; polioximetilenos; poliimidias; poliéteres; resinas epoxídicas, poliuretanos; rayón; triacetato de rayón, celulosa, acetato de celulosa, acetato-butirato de celulosa; celofán; nitrato de celulosa; propionato de celulosa; éteres de celulosa (es decir, carboximetilcelulosa e hidroxialquilcelulosas); y combinaciones de los mismos. Las poliamidas con el fin de esta
- 25 solicitud también incluirán poliamidas de la forma $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}$ y $\text{NH-(CH}_2\text{)}_x\text{-NHCO-(CH}_2\text{)}_y\text{-CO}$, en las que n es preferiblemente un número entero de 6 a 13; x es un número entero en el intervalo de 6 a 12; y es un número entero en el intervalo de 4 a 16. La lista proporcionada anteriormente es ilustrativa pero no limitativa.

- Los polímeros usados para recubrimientos pueden ser polímeros formadores de película que tienen un peso molecular lo suficientemente alto como para no ser cerosos ni pegajosos. Los polímeros también deben adherirse a la
- 30 endoprótesis y no deben ser tan fácilmente deformables después de la deposición sobre la endoprótesis como para poder desplazarse por tensiones hemodinámicas. El peso molecular del polímero es preferiblemente lo suficientemente alto como para proporcionar suficiente tenacidad de modo que los polímeros no se eliminarán por frotamiento durante la manipulación o el despliegue de la endoprótesis ni se agrietarán durante la expansión de la endoprótesis. En determinadas realizaciones, el polímero tiene una temperatura de fusión superior a 40°C,
- 35 preferiblemente superior a aproximadamente 45°C, más preferiblemente superior a 50°C y lo más preferiblemente superior a 55°C.

- El recubrimiento puede formularse mezclando uno o más de los constructos de iARN terapéuticos con los polímeros de recubrimiento en una mezcla de recubrimiento. El constructo de iARN puede estar presente como un líquido, un
- 40 sólido finamente dividido, o cualquier otra forma física apropiada. Opcionalmente, la mezcla puede incluir una o más proteínas que se asocian con el constructo de iARN. Opcionalmente, la mezcla puede incluir uno o más aditivos, por ejemplo, sustancias auxiliares no tóxicas tales como diluyentes, portadores, excipientes, estabilizantes o similares. Otros aditivos adecuados pueden formularse con el polímero y el constructo de iARN. Por ejemplo, pueden añadirse
- 45 polímeros hidrófilos seleccionados de las listas descritas previamente de polímeros formadores de película biocompatibles a un recubrimiento hidrófobo biocompatible para modificar el perfil de liberación (o puede añadirse un polímero hidrófobo a un recubrimiento hidrófilo para modificar el perfil de liberación). Un ejemplo sería añadir un polímero hidrófilo seleccionado del grupo que consiste en poli(óxido de etileno), polivinilpirrolidona, polietilenglicol, carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa y una combinación de los mismos a un recubrimiento de poliéster alifático para modificar el perfil de liberación. Pueden determinarse cantidades relativas apropiadas monitorizando los perfiles de liberación *in vitro* y/o *in vivo* para los constructos de iARN terapéuticos.

- 50 El grosor del recubrimiento puede determinar la velocidad a la que el constructo de iARN eluye de la matriz. Esencialmente, el constructo de iARN eluye de la matriz mediante difusión a través de la matriz de polímero. Los polímeros son permeables, permitiendo de ese modo que se escapen sólidos, líquidos y gases de los mismos. El grosor total de la matriz polimérica está en el intervalo de desde aproximadamente un micrómetro hasta
- 55 aproximadamente veinte micrómetros o mayor. Es importante observar que pueden utilizarse tratamientos de capas de imprimación y superficie metálica antes de fijarse la matriz polimérica al dispositivo médico. Por ejemplo, pueden usarse limpieza con ácido, limpieza alcalina (con base), salinización y deposición de Parylene como parte del procedimiento global descrito.

- Para ilustrarlo adicionalmente, puede incorporarse una disolución de poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(metacrilato de butilo) y constructo de iARN en o sobre la endoprótesis de varios modos. Por ejemplo, la
- 60 disolución puede pulverizarse sobre la endoprótesis o la endoprótesis puede sumergirse en la disolución. Otros métodos incluyen recubrimiento por centrifugación y polimerización por plasma de RF. En otro ejemplo, se pulveriza la disolución sobre la endoprótesis y luego se permite que se seque. En otra realización a modo de ejemplo, la

disolución puede cargarse eléctricamente hasta una polaridad y cambiarse eléctricamente la endoprótesis a la polaridad opuesta. De esta manera, la disolución y la endoprótesis se unirán una a otra. Usando este tipo de procedimiento de pulverización, pueden reducirse los desechos y puede lograrse un control más preciso sobre el grosor del recubrimiento.

5 En otro ejemplo, el constructo de iARN puede incorporarse en un copolímero polifluorado formador de película que comprende una cantidad de un primer resto seleccionado del grupo que consiste en fluoruro de vinilideno polimerizado y tetrafluoroetileno polimerizado, y una cantidad de un segundo resto distinto del primer resto y que se copolimeriza con el primer resto, produciendo de ese modo el copolímero polifluorado, pudiendo el segundo resto proporcionar tenacidad o propiedades elastoméricas al copolímero polifluorado, en el que las cantidades relativas del primer resto y el segundo resto son eficaces para proporcionar al recubrimiento y la película producida a partir del mismo propiedades eficaces para su uso en el tratamiento de dispositivos médicos implantables.

10 La superficie exterior de la endoprótesis tubular expandible del dispositivo médico intraluminal descrito en el presente documento puede comprender un recubrimiento tal como se describe en el presente documento. La superficie exterior de una endoprótesis que tiene un recubrimiento es la superficie en contacto con tejido y es biocompatible. La "superficie recubierta del sistema de suministro de constructo de iARN de liberación sostenida" es sinónimo de "superficie recubierta", superficie que se recubre, cubre o impregna con un sistema de suministro de constructo de iARN de liberación sostenida.

15 Alternativamente, la superficie luminal interior o toda la superficie (es decir, ambas superficies interior y exterior) de la endoprótesis tubular expandible radialmente alargada del dispositivo médico intraluminal de la presente invención tiene la superficie recubierta. La superficie luminal interior que tiene el recubrimiento de sistema de suministro de constructo de iARN de liberación sostenida de la invención también es la superficie en contacto con fluido, y es biocompatible y compatible con la sangre.

20 Además, los complejos poliméricos pueden asociarse con uno o más ligandos eficaces para unirse a proteínas específicas de superficie celular o matriz en la célula diana, facilitando de ese modo el secuestro del complejo en células diana, y en algunos casos, potenciando la captación del constructo de iARN por la célula. Meramente para ilustrarlo, se enumeran ejemplos de ligandos adecuados para su uso en el direccionamiento de complejos supramoleculares y liposomas descritos en el presente documento a tipos de célula específicos en la tabla a continuación.

<i>Ligando</i>	<i>Receptor</i>	<i>Tipo de célula</i>
folato	receptor de folato	carcinomas epiteliales, células madre de médula ósea
vitaminas hidrosolubles	receptor de vitaminas	diversas células
fosfato de piridoxilo	CD4	linfocitos CD4 +
apolipoproteínas	LDL	hepatocitos hepáticos, células endoteliales vasculares
insulina	receptor de insulina	
transferrina	receptor de transferrina	células endoteliales
galactosa	receptor de asialoglicoproteína	hepatocitos hepáticos
sialil-Lewis _x	E, P-selectina	células endoteliales activadas
Mac-1	L-selectina	neutrófilos, leucocitos
VEGF	Flk-1, 2	células epiteliales tumorales
FGF básico	receptor de FGF	células epiteliales tumorales
EGF	receptor de EGF	células epiteliales
VCAM-1	integrina α ₄ β ₁	células endoteliales vasculares
ICAM-1	integrina α _L β ₂	células endoteliales vasculares
PECAM-1/CD31	integrina α _v β ₃	células endoteliales vasculares, plaquetas activadas
osteopontina	integrina α _v β ₁ integrina α _v β ₅	células endoteliales y células de músculo liso en placas ateroscleróticas
secuencias de RGD	integrina α _v β ₃	células endoteliales vasculares, células de músculo liso vascular
GP 120/41 de VIH	CD4	linfocitos CD4 +

30 La presente memoria descriptiva también contempla la derivatización de los complejos poliméricos objeto con ligandos que fomentan la transcitosis de los complejos. Para ilustrarlo adicionalmente, un complejo polimérico puede unirse de manera covalente a un péptido de internalización que dirige la translocación del complejo a través de una membrana celular para facilitar la localización intracelular del constructo de iARN. A este respecto, el péptido de internalización, por sí mismo, puede atravesar una membrana celular mediante, por ejemplo, transcitosis, a una tasa relativamente alta. El péptido de internalización se conjuga, por ejemplo, como grupo colgante covalente, al polímero.

El péptido de internalización puede derivarse de la proteína antepennepedia de *Drosophila*, u homólogos de la misma. Se ha demostrado que el homeodominio de 60 aminoácidos de longitud de la homeoproteína antepennepedia se transloca a través de membranas biológicas y puede facilitar la translocación de polipéptidos heterólogos con los que se acopla. Véase por ejemplo Derossi *et al.* (1994) J Biol Chem 269:10444-10450; y Perez *et al.* (1992) J Cell Sci 102:717-722. Recientemente, se ha demostrado que fragmentos de tan sólo 16 aminoácidos de longitud de esta proteína son suficientes para dirigir la internalización. Véase Derossi *et al.* (1996) J Biol Chem 271:18188-18193. La presente memoria descriptiva contempla un complejo polimérico que contiene iARN que está decorado con al menos una parte de la proteína antepennepedia (u homólogo de la misma) suficiente para aumentar el transporte transmembrana del complejo decorado, con relación al complejo sin decorar, en una cantidad estadísticamente significativa.

Otro ejemplo de un péptido de internalización es la proteína transactivadora (TAT) de VIH. Esta proteína parece estar dividida en cuatro dominios (Kuppuswamy *et al.* (1989) Nucl. Acids Res. 17:3551-3561). La proteína TAT purificada la captan células en cultivo tisular (Frankel y Pabo, (1989) Cell 55:1189-1193), y péptidos, tales como el fragmento correspondiente a los residuos 37 -62 de TAT, se captan rápidamente por la célula *in vitro* (Green y Loewenstein, (1989) Cell 55:1179-1188). La región altamente básica media en la internalización y el direccionamiento del resto de internalización al núcleo (Ruben *et al.*, (1989) J. Virol. 63:1-8). Péptidos o análogos que incluyen una secuencia presente en la región altamente básica, tales como CFITKALGISYGRKKRRQRRRPPQGS (SEQ ID NO: 1), se conjugan con el polímero para ayudar en la internalización y el direccionamiento de esos complejos al medio intracelular.

Puede generarse otro polipéptido transcelular a modo de ejemplo para que incluya una parte suficiente de mastoparano (T. Higashijima *et al.*, (1990) J. Biol. Chem. 265:14176) para aumentar el transporte transmembrana de los complejos de iARN.

Pueden generarse otros péptidos de internalización adecuados usando la totalidad o una parte de, por ejemplo, una histona, insulina, transferrina, albumina básica, prolactina y factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I), factor de crecimiento similar a insulina II (IGF-II) u otros factores de crecimiento. Por ejemplo, se ha encontrado que un fragmento de insulina, que muestra afinidad por el receptor de insulina en células capilares, y que es menos eficaz que la insulina en la reducción de la glucemia, puede producir transporte transmembrana mediante transcitosis mediada por receptor y, por tanto, puede servir como péptido de internalización para los polipéptidos transcelulares objeto. Los péptidos de internalización derivados de factor de crecimiento preferidos incluyen péptidos derivados de EGF (factor de crecimiento epidérmico), tales como CMHIESLDSYTC (SEQ ID NO: 2) y CMYIEALDKYAC (SEQ ID NO: 3); péptidos derivados de TGF-beta (factor de crecimiento transformante beta); péptidos derivados de PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) o PDGF-2; péptidos derivados de IGF-I (factor de crecimiento similar a insulina) o IGF-II; y péptidos derivados de FGF (factor de crecimiento de fibroblastos).

Otra clase de péptidos de translocación/internalización presenta unión a membrana dependiente del pH. Para un péptido de internalización que adopta una conformación helicoidal a pH ácido, el péptido de internalización adquiere la propiedad de anfifilia, por ejemplo, tiene superficies de contacto tanto hidrófobas como hidrófilas. Más específicamente, dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5,0-5,5, un péptido de internalización forma una estructura anfífila de hélice alfa que facilita la inserción del resto en una membrana diana. Puede hallarse un entorno de pH ácido de inducción de hélice alfa, por ejemplo, en el entorno de bajo pH presente dentro de los endosomas celulares. Tales péptidos de internalización pueden usarse para facilitar el transporte de complejos de iARN, captados mediante un mecanismo endocítico, de compartimentos endosómicos al citoplasma.

Aún otros péptidos de internalización preferidos incluyen péptidos de apo-lipoproteína A-1 y B; toxinas peptídicas, tales como melitina, bombolitina, delta-hemolisina y las pardaxinas; péptidos antibióticos, tales como alameticina; hormonas peptídicas, tales como calcitonina, factor liberador de corticotrofina, beta-endorfina, glucagón, hormona paratiroidea, polipéptido pancreático; y péptidos correspondientes a secuencias señal de numerosas proteínas secretadas. Además, pueden modificarse péptidos de internalización a modo de ejemplo a través de la unión de sustituyentes que potencian el carácter de hélice alfa del péptido de internalización a pH ácido.

Aún otra clase de péptidos de internalización adecuados para su uso dentro de la presente invención incluyen dominios hidrófobos que se "ocultan" a pH fisiológico, pero quedan expuestos en el entorno de bajo pH del endosoma de la célula diana. Tras el desplegamiento y la exposición inducidos por el pH del dominio hidrófobo, el resto se une a bicapas lipídicas y efectúa la translocación de los complejos unidos de manera covalente al citoplasma de la célula. Tales péptidos de internalización pueden modelarse basándose en secuencias identificadas, por ejemplo, en exotoxina A de *Pseudomonas*, clatrina o toxina diftérica.

Algunas proteínas o péptidos formadores de poros también pueden servir como péptidos de internalización en el presente documento. Pueden obtenerse proteínas o péptidos formadores de poros o derivarse de, por ejemplo, proteína del complemento C9, moléculas de células T citolíticas o moléculas de linfocitos citolíticos naturales. Estos restos pueden formar estructuras de tipo anular en membranas, permitiendo de ese modo el transporte de complejos unidos a través de la membrana y al interior de la célula.

La mera intercalación membranaria de un péptido de internalización puede ser suficiente para la translocación de los

complejos de iARN a través de membranas celulares. Sin embargo, puede mejorarse la translocación uniendo al péptido de internalización un sustrato para enzimas intracelulares (es decir, un "péptido auxiliar"). Se prefiere que se una un péptido auxiliar a una(s) parte(s) del péptido de internalización que sobresale a través de la membrana celular a la cara citoplasmática. El péptido auxiliar puede unirse ventajosamente a un extremo terminal de un resto de translocación/internalización o péptido de anclaje. Un resto auxiliar de la presente invención puede contener uno o más residuos de aminoácido. En una realización, un resto auxiliar puede proporcionar un sustrato para fosforilación celular (por ejemplo, el péptido auxiliar puede contener un residuo de tirosina).

Un resto auxiliar a modo de ejemplo a este respecto sería un sustrato peptídico para N-miristoil transferasa, tal como GNAAAARR, SEQ ID NO: 4 (Eubanks *et al.*, en: Peptides. Chemistry and Biology, Garland Marshall (ed.), ESCOM, Leiden, 1988, págs. 566-69) En este constructo, se uniría un péptido de internalización al extremo C-terminal del péptido auxiliar, puesto que la glicina N-terminal es crítica para la actividad del resto auxiliar. Este péptido híbrido, unido a un complejo polimérico que contiene iARN, se somete a N-miristilación y se ancla además a la membrana celular diana, por ejemplo, sirve para aumentar la concentración local del complejo en la membrana celular.

Los péptidos auxiliares adecuados incluyen péptidos que son sustratos de cinasa, péptidos que presentan una carga positiva individual, y péptidos que contienen secuencias que se glicosilan por glicotransferasas unidas a membrana. Los péptidos auxiliares que se glicosilan por glicotransferasas unidas a membrana pueden incluir la secuencia x-NLT-x, en la que "x" puede ser otro péptido, un aminoácido, agente de acoplamiento o molécula hidrófoba, por ejemplo. Cuando este tripéptido hidrófobo se incubaba con vesículas microsomaes, atraviesa membranas vesiculares, se glicosila en el lado luminal, y queda atrapado dentro de las vesículas debido a su hidrofiliidad (C. Hirschberg *et al.*, (1987) Ann. Rev. Biochem. 56:63-87). Los péptidos auxiliares que contienen la secuencia x-NLT-x potenciarán por tanto la retención por células diana de complejos correspondientes.

Tal como se describió anteriormente, los péptidos de internalización y auxiliares pueden añadirse cada uno, independientemente, a un complejo o liposoma que contiene constructo de iARN mediante reticulación química o a través de interacción no covalente (por ejemplo, uso de conjugados de estreptavidina-biotina, interacciones His₆-Ni, etc.). En determinados casos, pueden incluirse ligadores peptídicos no estructurados entre los restos peptídicos y el complejo o liposoma polimérico.

También se contempla que tales péptidos de internalización y auxiliares puedan asociarse directamente con un constructo de iARN, tal como a través de una unión covalente a un grupo hidroxilo en la estructura principal del ácido nucleico. En determinadas realizaciones, la unión es susceptible de escisión en condiciones fisiológicas, tal como mediante exposición a esterasas, o simples reacciones de hidrólisis. Tales composiciones pueden usarse solas (constructos de "iARN desnudos") o formularse en complejos o liposomas poliméricos.

También se contempla que están dentro del alcance de esta memoria descriptiva formulaciones oftálmicas, pomadas, polvos, soluciones oculares y similares.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento adecuadas para administración parenteral comprenden uno o más compuestos descritos en el presente documento en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas, isotónicas, estériles y farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse para dar disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre de receptor pretendido o agentes de suspensión o espesantes.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de surfactantes.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humidificantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Puede garantizarse que se impide la acción de microorganismos mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol ácido sórbico, y similares. También puede desearse incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, puede provocarse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, para prolongar el efecto de un fármaco, se desea ralentizar la absorción del fármaco a partir de inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene escasa solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que puede depender, a su vez, del tamaño cristalino y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada por vía parenteral se logra

disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.

5 Se preparan formas de depósito inyectables formando matrices de microencapsulación de los compuestos objeto en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la razón de fármaco con respecto a polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación de fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). También se preparan formulaciones de depósito inyectables atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal.

10 Cuando se administran los compuestos descritos en el presente documento como productos farmacéuticos, a seres humanos y animales, pueden administrarse *per se* o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, del 0,1 al 99,5% (más preferiblemente, del 0,5 al 90%) de principio activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

La adición del compuesto activo de la invención a pienso para animales se logra preferiblemente preparando una premezcla de pienso apropiada que contiene el compuesto activo en una cantidad eficaz e incorporando la premezcla a la ración completa.

15 Alternativamente, puede combinarse en el pienso un complemento de pienso o concentrado intermedio que contiene el principio activo. El modo en que pueden prepararse y administrarse tales premezclas de pienso y raciones completas se describe en libros de referencia (tal como "Applied Animal Nutrition", W.H. Freedman y CO., San Francisco, EE.UU., 1969 o "Livestock Feeds and Feeding" O y B books, Corvallis, Ore., EE.UU., 1977).

20 En cualquiera de las realizaciones anteriores, la invención contempla que las preparaciones farmacéuticas pueden ser apirógenas.

25 Las preparaciones farmacéuticas para su uso en los métodos de la presente invención pueden comprender combinaciones de dos o más antagonistas de *hedgehog*. Por ejemplo, dos antagonistas de iARN de la ruta de HH diferentes pueden combinarse con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los dos antagonistas de iARN pueden actuar de manera aditiva o sinérgica. En otro ejemplo, uno o más antagonistas de iARN pueden combinarse con uno o más antagonistas de *hedgehog* distintos de iARN (por ejemplo, una o más moléculas orgánicas pequeñas), y con un portador o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dicha combinación de antagonistas de *hedgehog* puede actuar de manera aditiva o sinérgica.

Ejemplos:

30 Describiéndose ahora la invención de manera general, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente con fines de ilustración de determinados aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1: Hedgehog, desarrollo pulmonar y producción de surfactante

35 El síndrome de dificultad respiratoria resulta de insuficiente surfactante en los alveolos de los pulmones. Los pulmones de vertebrados contienen surfactante, una mezcla compleja de lípidos y proteínas que hace que se eleve la tensión superficial durante la insuflación pulmonar y disminuya durante el desinflamamiento de los pulmones. Durante el desinflamamiento de los pulmones, el surfactante disminuye de tal manera que no existen fuerzas superficiales que fomentarían de otro modo el colapso alveolar. Los alveolos oxigenados que no han colapsado durante la espiración permiten el transporte continuo de oxígeno y dióxido de carbono entre la sangre y el gas alveolar y requieren mucha menos fuerza para la insuflación durante la inspiración posterior. Durante la insuflación, el surfactante pulmonar aumenta la tensión superficial a medida que aumenta el área superficial alveolar. Una tensión superficial creciente en alveolos en expansión se opone a la insuflación excesiva en esos espacios de aire y tiende a desviar el aire inspirado a alveolos menos oxigenados, facilitando de ese modo incluso la oxigenación pulmonar.

40 El síndrome de dificultad respiratoria es particularmente prevalente entre bebés prematuros. El surfactante pulmonar se sintetiza normalmente a una velocidad muy baja hasta las últimas seis semanas de vida fetal. Los bebés humanos nacidos más de seis semanas antes del plazo normal de un embarazo tienen un alto riesgo de nacer con cantidades inadecuadas del surfactante pulmonar y velocidades inadecuadas de síntesis de surfactante. Cuanto más prematuro nazca un bebé, es probable que la deficiencia de surfactante sea más intensa. La deficiencia de surfactante intensa puede conducir a insuficiencia respiratoria en el plazo de unos pocos minutos u horas desde el parto. La deficiencia de surfactante produce un colapso progresivo de los alveolos (atelectasia) debido a la capacidad cada vez menor del pulmón para expandirse a pesar de un esfuerzo inspiratorio máximo. Como resultado, cantidades inadecuadas de oxígeno alcanzan la sangre del bebé. También puede producirse SDR en adultos, normalmente como consecuencia de fracaso en la biosíntesis de surfactante.

55 Se investigó el papel de la ruta de señalización de *hedgehog* en la maduración pulmonar y la producción de surfactante, con el hallazgo de que la inhibición de la ruta de señalización de *hedgehog* estimuló la producción de surfactante.

Se evaluó la expresión de un regulado por *hedgehog*, *Gli-1*, en tejido pulmonar de ratón embrionario. Se expresó *Gli-1* intensamente en el pulmón embrionario, sin embargo esta expresión disminuye durante la maduración pulmonar (figura 4). Obsérvese que la disminución de la señalización de *hedgehog* hacia el final de la embriogénesis se correlaciona con la maduración del epitelio distal del pulmón en neumocitos respiratorios. *Gli-1*, un factor de transcripción indicativo de señalización de *hedgehog*, continúa expresándose en las vías respiratorias de conducción, pero no de respiración en el adulto.

MÉTODOS: Se aclararon secciones de tejido fijado en paraformaldehído, incrustado en parafina, se rehidrataron, se digirieron con proteinasa K, se acetilaron y se hibridaron con sondas de ARN de *gli-1* y *sonic hedgehog* marcadas con [³³P] durante la noche, respectivamente. Después de lavados tras hibridación de alta rigurosidad, se sumergieron portaobjetos en fotoemulsión, se incubaron durante hasta tres semanas, se revelaron y se obtuvieron imágenes usando iluminación de campo oscuro. Se rellenaron las señales de campo oscuro con color artificial (rojo) y se superpusieron a imágenes de campo brillante.

Para correlacionar adicionalmente la disminución de la expresión de *gli-1* con la maduración pulmonar, se comparó la expresión de *gli-1* con la expresión del marcador de maduración pulmonar, surfactante tipo C (Sp-C) (figura 5). Este análisis demuestra que a medida que disminuye la expresión de *gli-1* entre E13.5-E16.5, aumenta la expresión de Sp-C.

MÉTODOS: Se disecaron explantes de pulmón de ratón E13.5 y E16.5 y se analizaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Q-RT-PCR). En resumen, se aísla el ácido ribonucleico (ARN) total del tejido y se somete a transcripción inversa para generar ADN. Se amplifica este ADN en una reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos de gen así como cebadores para el gen de mantenimiento expresado de manera ubicua, GAPDH. Se marcan los dos conjuntos de cebadores con diferentes fluoróforos, lo que permite la cuantificación de ambas señales en el mismo tubo de reacción en una máquina de PCR en tiempo real (TaqMan). Cuando se calculan los niveles de expresión de *gli-1* y Sp-C, se normaliza la señal específica con respecto a la señal de GAPDH, que sirve como medida del ADN total usado en la reacción.

Como la expresión de *Gli-1* es un marcador para la señalización de *hedgehog*, parece que la ruta de señalización de *hedgehog* es activa en tejido pulmonar inmaduro. Por consiguiente, se planteó la hipótesis de que la inhibición de la ruta de señalización de *hedgehog* permitiría una maduración pulmonar más rápida y, particularmente, estimularía la producción de surfactante.

El tratamiento de pulmones de ratón embrionario con el antagonista de *hedgehog*, compuesto B, regula por disminución la expresión de *Gli-1* (figura 6). MÉTODOS: Se disecaron pulmones de ratón embrionario E13.5. Se hicieron crecer explantes expuestos a la interfase aire-líquido en medio de explante pulmonar (basado en DMEM, con aditivos optimizados para el cultivo de pulmones de ratón) durante 67 h. Luego se procesaron para PCR cuantitativa en tiempo real (Q-RT-PCR). En resumen, se aísla el ácido ribonucleico (ARN) total del tejido y se somete a transcripción inversa para generar ADN. Se amplifica este ADN en una reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos de gen así como cebadores para el gen de mantenimiento expresado de manera ubicua, GAPDH. Se marcan los dos conjuntos de cebadores con diferentes fluoróforos, lo que permite la cuantificación de ambas señales en el mismo tubo de reacción en una máquina de PCR en tiempo real (TaqMan). Cuando se calcula el nivel de expresión de *gli-1*, se normaliza la señal específica con respecto a la señal de GAPDH, que sirve como medida del ADN total usado en la reacción.

El tratamiento con compuesto B aumenta la producción de surfactante tipo C en pulmones de ratón embrionario (figura 7). La producción de surfactante es una medida de la madurez de los pulmones, y la incapacidad para producir surfactante es la principal causa de síndrome de dificultad respiratoria del adulto y del lactante. Se evaluó el aumento de la producción de surfactante tipo C midiendo la expresión de Sp-C, que codifica para una proteína crítica para la producción de surfactante.

MÉTODOS: Se disecaron pulmones de ratón embrionario E13.5. Se hicieron crecer explantes sumergidos en medio de explante pulmonar (basado en DMEM, con aditivos optimizados para el cultivo de pulmones de ratón) durante 50 h. Luego se procesaron para Q-RT-PCR. En resumen, se aísla el ácido ribonucleico (ARN) total del tejido y se somete a transcripción inversa para generar ADN. Se amplifica este ADN en una reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos de gen así como cebadores para el gen de mantenimiento expresado de manera ubicua, GAPDH. Se marcan los dos conjuntos de cebadores con diferentes fluoróforos, lo que permite la cuantificación de ambas señales en el mismo tubo de reacción en una máquina de PCR en tiempo real (TaqMan). Cuando se calcula el nivel de expresión de Sp-C, se normaliza la señal específica con respecto a la señal de GAPDH, que sirve como medida del ADN total usado en la reacción.

Los cuerpos lamelares son estructuras subcelulares que se encuentran en células pulmonares productoras de surfactina y se cree que son un sitio de producción de surfactina. Los neumocitos tipo II en pulmones tratados con compuesto B se diferencian prematuramente, tal como se pone de manifiesto mediante la presencia de cuerpos lamelares que producen surfactante. No pudieron observarse tales estructuras en los controles tratados con vehículo (figura 8). MÉTODOS: Se disecaron pulmones de ratón embrionario E13.5. Se hicieron crecer explantes expuestos a la interfase aire-líquido en medio de explante pulmonar (basado en DMEM, con aditivos optimizados para el cultivo

de pulmones de ratón) durante 67 h. Luego se procesaron para microscopía electrónica de transmisión y se fotografiaron a un aumento de 62.000.

Las figuras 9 y 10 muestran resultados similares a los obtenidos anteriormente con el tratamiento de cultivos de pulmón embrionario con compuesto B (figuras 9-10). El aumento de la expresión de Sp-C observada tras el tratamiento con compuesto B es comparable al observado cuando se tratan explantes de pulmón embrionario con la hormona esteroidea, hidrocortisona. Se sabe que los esteroides aumentan la maduración pulmonar y la producción de surfactante en animales, incluyendo seres humanos.

Se demuestra la especificidad de los efectos de antagonistas de *hedgehog* sobre la maduración pulmonar examinando los efectos de agonistas de la señalización de *hedgehog* sobre la maduración pulmonar. El tratamiento de cultivos de pulmón embrionario o bien con *sonic hedgehog* modificado con lípidos o bien con un compuesto agonista de *hedgehog* dio como resultado la expresión aumentada de *gli-1* y la expresión disminuida de Sp-C (figura 11).

En resumen, estos resultados demuestran que inhibidores de *hedgehog* pueden estimular la maduración y producción de surfactina en tejido pulmonar inmaduro. La ruta de señalización de *hedgehog* es activa en tejidos de pulmón inmaduros, en los que no se producen surfactinas en niveles sustanciales, mientras que la ruta de *hedgehog* es relativamente inactiva en las vías respiratorias del adulto, en las que se producen surfactinas. El tratamiento de tejido pulmonar inmaduro con antagonistas de la ruta de señalización de *hedgehog* provoca una rápida maduración y la presencia aumentada de marcadores moleculares y citológicos asociados con la producción de surfactina. Los resultados opuestos obtenidos con el tratamiento de explantes de pulmón con antagonistas y agonistas de *hedgehog* demuestran la especificidad de estos resultados.

Ejemplo 2: Expresión de Gli-1 en tumores humanos

Ruta de activación de *hedgehog* en tumores humanos

La señalización de *hedgehog* desempeña un papel causal en la generación de carcinoma de células basales (BCC). Se analizó la señalización de *hedgehog* para determinar si esta ruta es activa en otros tumores humanos, más específicamente cáncer de próstata, pulmón y mama, así como hiperplasia prostática benigna. Las proteínas *Hedgehog* son agentes proliferativos conocidos para una variedad de tipos de célula. Puesto que las *hedgehog* tienen un efecto proliferativo conocido sobre una variedad de tipos de célula, los antagonistas de *hedgehog* pueden ser agentes terapéuticos valiosos para cánceres en los que está presente una señalización de alto nivel de *hedgehog*.

Se abordó la cuestión de la activación de *hedgehog* en los tipos de tumor llevando a cabo experimentos de hibridación *in situ* radiactiva con *gli-1*, un gen efector transcripcional conocido de la señalización de *hedgehog*.

En resumen, se aclararon secciones de tejido fijado en paraformaldehído, incrustado en parafina, se rehidrataron, se digirieron con proteinasa K, se acetilaron y se hibridaron con sondas de ARN marcadas con [³³P] durante la noche. Después de lavados tras hibridación de alta rigurosidad, se sumergieron portaobjetos en fotoemulsión, se incubaron durante hasta tres semanas, se revelaron y se obtuvieron imágenes usando iluminación de campo oscuro. Se rellenaron las señales de campo oscuro con color artificial (rojo) y se superpusieron a imágenes de campo brillante. Se clasificó la expresión de *Gli-1* en una escala de “-” a “+” a través de “++++”. Se puntuó la expresión de *Gli-1* como “-” cuando la expresión no era mayor en células hiperproliferativas que en otras células no proliferativas presentes en el portaobjetos. Se dieron las puntuaciones de “+” a “++++” para los niveles aumentados de expresión, considerándose que cualquier célula puntuada como “++” o superior tiene una expresión sustancialmente aumentada de *gli-1*. Cuando no pudo interpretarse la señal, se indica una muestra como “ND”.

Se resumen los datos para estos experimentos en la tabla 1-4 a continuación. En resumen, 8 de 18 muestras de cáncer de mama mostraron una expresión sustancialmente aumentada de *gli-1*. 7 de 11 muestras de cáncer de pulmón, 11 de 19 muestras de hipertrofia prostática benigna (HPB), y 6 de 15 muestras de cáncer de próstata benigno mostraron todas una intensa expresión de *gli-1*.

Tabla 1: Resultados de hibridación *in situ* de *Gli-1* en tejido de cáncer de mama

Tejido	Diagnóstico	Número de muestra	Edad/sexo	Señal
Mama	Carcinoma ductal inf.	1	93F	ND
Mama	Carcinoma ductal inf.	2	37F	+++
Mama	Carcinoma ductal inf.	3	54F	+
Mama	Carcinoma ductal inf.	4	39F	++
Mama	Carcinoma ductal inf.	5	73F	+++
Mama	Carcinoma ductal inf.	6	65F	++++
Mama	Carcinoma ductal inf.	7	58F	ND
Mama	Carcinoma ductal inf.	8	48F	+
Mama	Carcinoma ductal inf.	9	27F	++

Mama	Carcinoma ductal inf.	10	NA	+++
Mama	Carcinoma ductal inf.	11	34F	+
Mama	Carcinoma lobular inf.	12	46F	+
Mama	Carcinoma lobular inf.	13	F	-
Mama	Carcinoma lobular inf.	14	56F	+
Mama	Carcinoma lobular inf.	15	70F	-
Mama	Carcinoma intraductal	16	40F	+++
Mama	Carcinoma intraductal	17	55F	+++
Mama	Carcinoma medular	18	NA	+
Mama	Carcinoma tubular	19	75F	-
Mama	Carcinoma tubular	20	60F	-

Tabla 2: Resultados de hibridación *in situ* de *Gli-1* en tejido de cáncer de pulmón

Tejido	Diagnóstico	Número de muestra	Edad/sexo	Señal
Pulmón	Adenocarcinoma	1	54F	++++
Pulmón	Adenocarcinoma	2	61M	ND
Pulmón	Adenocarcinoma	3	61F	++++
Pulmón	Adenocarcinoma	4	58F	+++
Pulmón	Adenocarcinoma	5	77M	ND
Pulmón	Adenocarcinoma	6	65M	++
Pulmón	Adenocarcinoma	7	73M	ND
Pulmón	Adenocarcinoma	8	69M	ND
Pulmón	Adenocarcinoma	9	82M	ND
Pulmón	Adenocarcinoma	10	NA	-
Pulmón	Adenocarcinoma	11	F	ND
Pulmón	Adenocarcinoma	12	56F	+
Pulmón	Adenocar. broncoalveolar	13	70F	+
Pulmón	Adenocar. broncoalveolar	14	76F	-
Pulmón	Carcinoma de células pequeñas	15	68M	++
Pulmón	Carcinoma de células pequeñas	16	61M	ND
Pulmón	Carcinoma de células pequeñas	17	70M	+++++
Pulmón	Carcinoma de células pequeñas	18	NA	ND
Pulmón	SCC	19	60F	ND
Pulmón	SCC	20	63M	+++++

Tabla 3: Resultados de hibridación *in situ* de *Gli-1* en hiperplasia prostática benigna

Tejido	Diagnóstico	Número de muestra	Edad/sexo	Señal
Próstata	HPB	1	65M	+
Próstata	HPB	2	86M	++++
Próstata	HPB	3	53M	+
Próstata	HPB	4	65M	++++
Próstata	HPB	5	68M	++
Próstata	HPB	6	70M	++
Próstata	HPB	7	54M	-
Próstata	HPB	8	M	++
Próstata	HPB	9	69M	-
Próstata	HPB	10	M	-
Próstata	HPB	11	73M	+++
Próstata	HPB	12	53M	++++
Próstata	HPB	13	84M	-
Próstata	HPB	14	67M	-
Próstata	HPB	15	66M	++
Próstata	HPB	16	69M	++
Próstata	HPB	17	72M	++++
Próstata	HPB	18	M	++
Próstata	HPB	19	60M	-
Próstata	HPB	20	60M	-

Tabla 4: Resultados de hibridación *in situ* de *Gli-1* en tejido de cáncer de próstata

Tejido	Diagnóstico	Número de muestra	Edad/sexo	Señal
Próstata	Adenocarcinoma	1	79M	+
Próstata	Adenocarcinoma	2	72M	+
Próstata	HPB junto a adenocarcinoma	3	81M	ND
Próstata	Adenocarcinoma	4	79M	++
Próstata	Adenocarcinoma	5	81M	ND
Próstata	Adenocarcinoma	6	73M	-
Próstata	Adenocarcinoma	7	79M	++
Próstata	Adenocarcinoma	8	M	+++
Próstata	Adenocarcinoma	9	69M	ND
Próstata	Adenocarcinoma	10	53M	+++
Próstata	Adenocarcinoma	11	65M	+
Próstata	Adenocarcinoma	12	60M	++
Próstata	Adenocarcinoma	13	66M	ND
Próstata	Adenocarcinoma	14	66M	+
Próstata	Adenocarcinoma	15	92M	-
Próstata	Adenocarcinoma	16	80M	-
Próstata	Adenocarcinoma	17	78M	ND
Próstata	Adenocarcinoma	18	85M	-
Próstata	Adenocarcinoma	19	78M	-
Próstata	Adenocarcinoma	20	93M	+++

En resumen, puede observarse una expresión de *Gli-1* de alto nivel, es decir, activación de la señalización de *hedgehog*, en cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna, cáncer de pulmón y cáncer de mama humanos (figuras 12-15). La activación de la ruta de *hedgehog* en estos tipos de tumor nunca se había descrito con anterioridad. La presencia de una ruta de *hedgehog* excepcionalmente activa en estas células en proliferación sugiere intensamente una relación causal entre la ruta de *hedgehog* y la hiperproliferación en estos trastornos. Se espera que los antagonistas de *hedgehog* serán eficaces como agentes antiproliferativos en estos tipos de cáncer.

Ejemplo 3: Cáncer de vejiga

Los datos citogenéticos y mutacionales sugieren que la activación de *hedgehog* desempeña un papel causal en el cáncer de vejiga

Las alteraciones citogenéticas y moleculares halladas en cáncer de vejiga son heterogéneas. Al establecer las mutaciones primarias, específicas en cánceres, a menudo es útil examinar cánceres casi diploides, que no tienen aún múltiples cambios cromosómicos complejos acompañados de hiperdiploidía. Gibas *et al.*, hallaron monosomía del cromosoma 9 en 4 de 9 casos de carcinoma de células de transición de la vejiga (Gibas *et al.* (1984) Cancer Research 44:1257-1264). En tres de estos, el cariotipo era casi diploide, y en uno, la monosomía 9 fue la única anomalía observada. Por tanto, la monosomía del cromosoma 9 puede iniciar la transformación maligna en un subgrupo de tales cánceres.

Se presentó más evidencia de que aparece este cambio como acontecimiento temprano por otros dos grupos que notificaron que deleciones del cromosoma 9 son los únicos cambios genéticos presentes con frecuencia en tumores papilares superficiales (Dalbagni *et al.* (1993) Lancet 342: 469-471). De hecho, se estima que se producen deleciones de 9q en aproximadamente el 60-70 por ciento de los tumores de vejiga (Cairns *et al.* (1992) Oncogene 8: 1083-1085; Dalbagni *et al.*, citado anteriormente). Un estudio notificó que la deleción de 9q22 se produce en el 35% de casos informativos (Simoneau *et al.* 1999). El componente de la ruta de señalización de *hedgehog*, *patched-1* está ubicado en 9q22.

La pérdida de heterocigosidad (LOH, *loss of heterozygosity*) de todos los demás cromosomas es poco frecuente (menos del 10%) en cánceres de grado bajo, no invasivos. Asimismo, la alteración de oncogenes asociados a cáncer de vejiga (ERBB2, EGFR) también son raros en tumores de grado bajo, superficiales (Cairns *et al.*, citado anteriormente).

Basándose en estos hallazgos citogenéticos, se ha propuesto el siguiente modelo para carcinogénesis de vejiga: se produce la iniciación mediante deleción de genes de supresión tumoral en el cromosoma 9, lo que conduce a tumores papilares superficiales u ocasionalmente planos, unos pocos de los cuales pueden adquirir luego mutaciones adicionales (por ejemplo, p53) y progresar a invasión.

Tres grupos observaron la trisomía 7 en un bajo porcentaje de cánceres de vejiga (Sandberg, citado anteriormente; Berger *et al.* citado anteriormente; Smeets *et al.*, citado anteriormente). Shh, que según los presentes experimentos continúa expresándose en epitelio de vejiga en toda la vida adulta, se localiza en el cromosoma 7. Berger *et al.*

también observaron deleciones de 10q24, el locus de su(fu) (Berger *et al* (1986) Cancer Genetics and Cytogenetics 23: 1-24). Asimismo, Smeets *et al.* sugirieron que la pérdida de 10q puede ser un acontecimiento primario en el desarrollo de cáncer de vejiga (Smeets *et al.* (1987) Cancer Genetics and Cytogenetics 29: 29-41).

5 Estos datos sugieren mecanismos mediante los que la expresión de nivel inicial de la señalización de *hedgehog* presente en el epitelio de vejiga adulto puede aumentarse, conduciendo por tanto a la proliferación aumentada de células uroteliales. Esta hipótesis está respaldada por los datos citológicos, así como por el hallazgo de McGarvey *et al.* que describieron la expresión de *ptc-1*, *smo* y *gli-3* en urotelio humano normal y dos líneas de carcinoma de células de transición (McGarvey *et al.* (1998) Oncogene 17: 1167-1172).

10 Se examinó la señalización de *hedgehog* en la vejiga de ratón, y se halló que está presente en vejiga normal. En ratones recién nacidos transgénicos para *Ptc-lacZ* (*ptc-1* (*d11*) *lacZ*), la expresión de *LacZ* puede detectarse en las células uroteliales en proliferación del epitelio de vejiga, y más débilmente, en células mesenquimatosas adyacentes (figura 16A). El análisis de hibridación *in situ* adicional de vejiga de ratón adulto indica expresión de *gli-1* en el epitelio de vejiga, y específicamente en las células uroteliales en proliferación (figura 16B).

15 MÉTODOS: Para la tinción con lacZ, se obtuvo vejiga *ptc-1* (*d11*) *lacZ* de las crías recién nacidas de ratón transgénico identificada mediante detección de lacZ usando colas. Se fijaron las vejigas en fijador de lacZ, se enjuagaron y se tiñeron para lacZ durante la noche a 37°C, luego se procesaron para histología convencional. Se sometieron las secciones a contratinción con eosina. Para la hibridación *in situ*, se aclararon secciones de tejido fijado en paraformaldehído, incrustado en parafina, se rehidrataron, se digirieron con proteinasa K, se acetilaron y se hibridaron con sonda de ARN de *gli-1* marcada con [³³P] durante la noche. Después de lavados tras hibridación de
20 alta rigurosidad, se sumergieron portaobjetos en fotoemulsión, se incubaron durante hasta tres semanas, se revelaron y se obtuvieron imágenes usando iluminación de campo oscuro. Se rellenaron las señales de campo oscuro con color artificial (rojo) y se superpusieron a imágenes de campo brillante.

Señalización de *hedgehog* en cáncer de vejiga

25 Se analizó la señalización de *hedgehog* y la expresión génica de la ruta de *hedgehog* en un cáncer de vejiga humano, y en varias líneas celulares de cáncer de vejiga. Se midió la expresión génica en estos tejidos usando PCR cuantitativa en tiempo real (Q-RT-PCR). Se resumen estos resultados en las figuras 17-19, y demuestran que se expresan genes de la ruta de *hedgehog* en líneas celulares de cáncer de vejiga.

30 La figura 17 demuestra que la expresión de *shh* está aumentada 12 veces y la expresión de *gli-1* está aumentada 2,5 veces en una muestra de tumor de vejiga en comparación con vejiga de adulto normal. La figura 18 examina la expresión de *shh* y *gli-1* en ocho líneas celulares de cáncer de vejiga humano, y la figura 19 examina la expresión de *shh*, *ptc-1*, *smo*, *gli-1*, *gli-2* y *gli-3* en las mismas ocho líneas celulares de cáncer de vejiga humano. Estos resultados indican que se expresan componentes de la ruta de *hedgehog* en ocho de las ocho líneas celulares examinadas.

MÉTODOS: Experimento 1 (figura 17) - evaluación de la señalización de *hedgehog* en un tumor de vejiga.

35 Para experimentos de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (Q-RT-PCR), se amplificó ADNc disponible comercialmente (Clontech) usando un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (TaqMan) de Perkin Elmer y cebadores específicos de gen. Se usó el gen de mantenimiento GAPDH para normalizar la concentración de ARN y la eficiencia de PCR, y se añadieron cebadores de GAPDH a las mismas reacciones. Puesto que las sondas para ambos genes se marcan con diferentes fluoróforos, pueden detectarse la señal específica y la de GAPDH en el mismo tubo. Se calcularon las intensidades de señal usando los algoritmos
40 proporcionados en Sequence Detector v1.7, el software proporcionado por el fabricante.

Experimento 2 (figuras 18-19) - señalización de *hedgehog* en ocho líneas celulares de cáncer de vejiga.

45 Se adquirieron líneas celulares de cáncer de vejiga de ATCC (Colección Americana Cultivos Tipo) y se mantuvieron tal como se recomienda en la descripción del producto. En la confluencia, se enjuagaron las células y se cambiaron a medio que contenía suero al 1%, un tratamiento que aumenta la señalización de *hedgehog*. Luego se hicieron crecer las células 2 días más, se recogieron en Trizol (GIBCO-BRL) y se aisló el ARN según el protocolo del fabricante. Luego se transcribió el ARN en ADNc de primera cadena según protocolos convencionales, y se amplificó usando un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (TaqMan) de Perkin Elmer y cebadores
50 específicos de gen. Se usó el gen de mantenimiento GAPDH para normalizar la concentración de ARN y la eficiencia de PCR, y se añadieron cebadores de GAPDH a las mismas reacciones. Puesto que las sondas para ambos genes se marcan con diferentes fluoróforos, pueden detectarse la señal específica y la de GAPDH en el mismo tubo. Se calcularon las intensidades de señal usando los algoritmos proporcionados en Sequence Detector v1.7, el software proporcionado por el fabricante.

Ensayo *in vitro* para examinar la señalización de *hedgehog* en líneas celulares de cáncer de vejiga

55 La expresión de componentes de la ruta de señalización de *hedgehog* en las ocho líneas celulares de cáncer de vejiga examinadas sugirió que la señalización de *hedgehog* es activa en células de cáncer de vejiga. Sin embargo, la expresión génica observada puede no ser indicativa de señalización funcional. Para evaluar si se produce

señalización funcional de *hedgehog* en líneas celulares de cáncer de vejiga, se usó un ensayo *in vitro* de gli-Luc. Se resume este ensayo esquemáticamente en la figura 20. En resumen, fibroblastos 10T ½ (S12) que expresan un gen indicador de luciferasa sensible a *hedgehog* sirven como indicador de señalización de *hedgehog*. Cuando se ponen en contacto estas células con proteína *hedgehog* funcional, se activa la ruta de señalización de *hedgehog* en las células S12, y se expresa luciferasa. En los experimentos presentados en el presente documento, se cocultivan células S12 con células de cáncer de vejiga. Si la línea celular de cáncer de vejiga secreta proteína *hedgehog* funcional, se activará la expresión de luciferasa en las células S12 adyacentes.

La figura 21 muestra la inducción de luciferasa en células S12 solas, y en células S12 cocultivadas con tres líneas celulares de cáncer de vejiga. Dos de las tres líneas celulares examinadas indujeron expresión de luciferasa en células S12, lo que indica que estas líneas celulares de cáncer de vejiga secretan proteína *hedgehog* funcional.

Para confirmar la especificidad de esta activación de señalización de *hedgehog* por líneas celulares de cáncer de vejiga, se trataron cocultivos de S12/RT-4 con el anticuerpo bloqueante de Shh (5E1). La figura 22 demuestra que el tratamiento con 5E1 de cocultivos inhibe la expresión de luciferasa en células S12 con una CI_{50} de 85 ng/ml y una CI_{90} de 500 ng/ml. Debe observarse que este modelo también proporciona un medio para evaluar la eficacia *in vitro* de otros antagonistas de *hedgehog* incluyendo antagonistas de polipéptido y molécula pequeña.

Señalización de *hedgehog* en un modelo de tumor de vejiga de ratón *in vivo*

La inyección de células de tumor de vejiga en ratones desnudos induce la formación de tumor. Basándose en la capacidad del anticuerpo contra Shh, 5E1, para inhibir la señalización de *hedgehog* en el ensayo de gli-Luc *in vitro* descrito en detalle anteriormente, se examinó la capacidad de 5E1 para inhibir el crecimiento tumoral de células de vejiga *in vivo*. En resumen, se les inyectó a ratones desnudos por vía subcutánea 10^7 células RT-4. Se dividieron los ratones en dos grupos y se trataron o bien con 5E1 o bien con un anticuerpo IgG de control. Las figuras 23 y 24 muestran que el tratamiento con 5E1 disminuyó significativamente el tamaño del tumor en comparación con el tratamiento con el control de IgG. Es importante observar que debido al procedimiento usado en este experimento particular (inyección de Matrigel en células tumorales) los tumores se iniciaron con un tamaño promedio de 100 mm^3 debido a la matriz de Matrigel (= volumen de inyección de $100 \mu\text{l}$). Matrigel es un líquido cuando se mantuvo en hielo común, pero solidifica tras la inyección. Por tanto, el tamaño tumoral promedio en el grupo de 5E1 al final del experimento es aproximadamente igual que al comienzo del tratamiento. Los resultados son estadísticamente significativos en gran medida (prueba de la t de Student: $p=0,017$). Debe observarse que este modelo también proporciona un medio para evaluar la eficacia *in vivo* de otros antagonistas de *hedgehog* incluyendo antagonistas de polipéptido y molécula pequeña.

Además de evaluar el efecto del tratamiento con 5E1 sobre el tamaño tumoral, también se evaluó la expresión de *gli-1* tanto en los tumores RT-4 como en el tejido circundante. El tratamiento con 5E1 disminuyó la expresión de *gli-1* tanto en los tumores RT-4 como en tejido adyacente (figura 25). Este hallazgo es significativo porque los experimentos *in vitro* expuestos anteriormente indican que estas células que expresan *hedgehog* pueden activar la señalización de *hedgehog* en células adyacentes. Dada la naturaleza compleja de la progresión del cáncer, es posible que la señalización de *hedgehog* influya en el cáncer tanto directa como indirectamente. Los efectos indirectos pueden incluir la inducción de factores proliferativos, factores angiogénicos o factores antiapoptóticos, por nombrar algunos. La inducción de tales factores puede producirse dentro de las propias células cancerosas o en células adyacentes. Por tanto, la demostración de que un antagonista de *hedgehog*, 5E1, puede inhibir la señalización de *hedgehog* tanto en células cancerosas como en células circundantes tiene implicaciones significativas.

MÉTODOS: Se tripsinizaron cultivos Rt-4 en crecimiento exponencial, se centrifugaron y se resuspendieron en un pequeño volumen de medio de cultivo. Se determinó la proporción de células tumorales viables mediante exclusión por azul tripano. Se resuspendieron 10^7 células/animal en $100 \mu\text{l}$ de Matrigel (una preparación comercialmente disponible de componentes de membrana basal) y se inyectaron por vía subcutánea en el lado derecho del flanco de ratones desnudos nu/nu BALB/c de 6-8 semanas de edad macho atímicos. Se comenzó el tratamiento el día después de la inyección de las células. Se dividieron los ratones en dos grupos que contenían 16 animales/grupo. Se les inyectó al grupo de control (anticuerpo de control IgG) y al grupo tratado con 5E1 3 veces/semana por vía intraperitoneal 10 mg/kg de anticuerpo. Se midieron los tumores 2 veces/semana mediante calibre en 2 dimensiones y se convirtieron las mediciones en masa tumoral usando la fórmula para un elipsoide prolado ($a \times b^2 \times 1/2$). Tal como se indicó anteriormente, en este ejemplo particular, se inyectaron los tumores en combinación con Matrigel. Por tanto, los tumores tienen un tamaño inicial de 100 mm^3 y la inhibición del tamaño tumoral observada tras el tratamiento con 5E1 es casi una inhibición completa del crecimiento tumoral.

Se midió la expresión de *gli-1* usando Q-RT-PCR tal como se describe en la totalidad de la solicitud.

La inhibición del crecimiento tumoral por el antagonista de *hedgehog*, 5E1, respalda la utilidad de la invención reivindicada. Se espera que el antagonismo de la señalización de *hedgehog* usando una variedad de agentes podrá tener efectos similares en la disminución del crecimiento tumoral, y podrá evaluarse fácilmente la eficacia de cualquier compuesto candidato usando los métodos *in vitro* e *in vivo* descritos anteriormente.

Ejemplo 4: Cáncer de próstata

La señalización de *hedgehog* desempeña un papel importante en el desarrollo de la próstata normal. Se requiere *Sonic hedgehog* para el crecimiento de la próstata, y la expresión de Shh está fuertemente correlacionada con la ramificación ductal prostática (Podlasek *et al.* (1999) *Developmental Biology* 209: 28-39). Evidencias recientes que respaldan el papel esencial de shh en la ramificación prostática apropiada demuestran que el tratamiento de próstata embrionaria con el antagonista de *hedgehog*, ciclopamina, inhibe el crecimiento y la ramificación (W. Bushman, resultados no publicados). Adicionalmente, el mantenimiento de bajos niveles de señalización de *hedgehog* en la próstata de ratón adulto sugiere papeles adicionales de la señalización de *hedgehog* más allá de este papel temprano en el crecimiento y la ramificación iniciales de la próstata embrionaria.

Algunos estudios recientes han examinado la correlación entre la expresión de componentes de la ruta de *hedgehog* y el cáncer de próstata. Estos resultados muestran una correlación entre la expresión aumentada de *shh* y/o *gli-1* y el cáncer de próstata. Algunos datos citológicos adicionales respaldan la idea de que una regulación errónea de la ruta de *hedgehog* desempeña un papel en el cáncer de próstata. Dos estudios han descrito deleciones de un fragmento del cromosoma 10 que contiene el locus de Su(fu) en cánceres de próstata (Carter *et al.* (1990) *PNAS* 87: 8751-8755; Li *et al.* (1997) *Science* 275: 1943-1947). Dadas las evidencias en la bibliografía que sugieren un papel de la señalización de *hedgehog* en el cáncer de próstata, se examinó la señalización de *hedgehog* en varias líneas celulares de cáncer de próstata. Adicionalmente, se demostró la capacidad de antagonistas de *hedgehog* para disminuir la activación de la señalización de *hedgehog* en líneas celulares de tumor de próstata. Estos resultados sugieren que, como en células de cáncer de vejiga, el antagonismo de la señalización de *hedgehog* tiene utilidad en la disminución del crecimiento y la proliferación de células de cáncer de próstata.

Señalización de *hedgehog* en cáncer de próstata

Se examinó la expresión de *shh* y *gli-1* tanto en muestras de cáncer de próstata humano como en líneas celulares de cáncer de próstata disponibles comercialmente. La figura 26 muestra el análisis de hibridación *in situ* de muestras de cáncer de próstata humano, y demuestra la abundante expresión de *shh*. De manera similar, la figura 27 demuestra altos niveles de expresión de *gli-1* en células de cáncer de próstata tal como se mide mediante Q-RT-PCR. Finalmente, la figura 28 examinó la expresión tanto de *shh* como de *gli-1* mediante QRT-PCR en tres líneas celulares de cáncer de próstata disponibles comercialmente. Estos resultados indican que se produce señalización de *hedgehog* en las tres líneas celulares disponibles comercialmente.

MÉTODOS: Hibridación *in situ*: Se obtuvieron criosecciones de tejido fijado en paraformaldehído de 30 µm, se digirieron con proteinasa K, se hibridaron durante la noche con sonda de ARN marcada con digoxigenina. Después de lavados tras hibridación de alta rigurosidad, se incuban las secciones con un anticuerpo anti-digoxigenina que se marca con fosfatasa alcalina. Se visualiza la señal mediante adición de BM purple, una disolución de cromágeno disponible comercialmente que reacciona con la fosfatasa alcalina para formar un precipitado de color púrpura.

Se adquirieron líneas celulares de cáncer de próstata de ATCC (Colección Americana Cultivos Tipo) y se mantuvieron tal como se recomienda en la descripción del producto. En la confluencia, se enjuagaron las células y se cambiaron a medio que contenía suero al 1%, un tratamiento que aumenta la señalización de *hedgehog*. Luego se hicieron crecer las células 2 días más, se recogieron en Trizol (GIBCO-BRL) y se aisló el ARN según el protocolo del fabricante. Luego se transcribió el ARN en ADNc de primera cadena según protocolos convencionales, y se amplificó usando un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (TaqMan) de Perkin Elmer y cebadores específicos de gen. Se usó el gen de mantenimiento GAPDH para normalizar la concentración de ARN y la eficiencia de PCR, y se añadieron cebadores de GAPDH a las mismas reacciones. Puesto que las sondas para ambos genes se marcan con diferentes fluoróforos, pueden detectarse la señal específica y la de GAPDH en el mismo tubo. Se calcularon las intensidades de señal usando los algoritmos proporcionados en Sequence Detector v1.7, el software proporcionado por el fabricante.

Ensayo *in vitro* para examinar la señalización de *hedgehog* en líneas celulares de cáncer de próstata

La expresión de componentes de la ruta de señalización de *hedgehog* en muestras y líneas celulares de cáncer de próstata sugiere que la señalización de *hedgehog* es activa en cáncer de próstata. Sin embargo, la expresión génica observada puede no ser indicativa de señalización funcional. Para evaluar si se produce señalización funcional de *hedgehog* en líneas celulares de cáncer de próstata, se empleó el ensayo *in vitro* de gli-Luc. Este ensayo se resumió anteriormente, y se representa esquemáticamente en la figura 20. En resumen, fibroblastos 10T 1/2 (S12) que expresan un gen indicador de luciferasa sensible a *hedgehog* sirven como indicador de señalización de *hedgehog*. Cuando se ponen en contacto estas células con proteína *hedgehog* funcional, se activa la ruta de señalización de *hedgehog* en las células S12, y se expresa luciferasa. En los experimentos presentados en el presente documento, se cocultivan células S12 con células de cáncer de próstata. Si la línea celular de cáncer de próstata secreta proteína *hedgehog* funcional, se activará la expresión de luciferasa en las células S12 adyacentes.

La figura 29 no muestra inducción de luciferasa en células S12 cultivadas solas, ni en células S12 cultivadas con células PZ-HPV-7 (normales). Sin embargo, se observa la inducción de luciferasa cuando se cultivan células S12 con cualquiera de tres líneas celulares de cáncer de próstata: 22Rv1, PC-3 o LNCaP. Este resultado indica que

estas líneas celulares de cáncer de próstata secretan proteína *hedgehog* funcional.

Para confirmar la especificidad de esta activación de señalización de *hedgehog* por líneas celulares de cáncer de próstata, se trataron cocultivos de S12/cáncer de próstata con el anticuerpo bloqueante de Shh (5E1). La figura 30 demuestra que el tratamiento con 5E1 de cocultivos inhibe la expresión de luciferasa en células S12.

5 MÉTODOS: Se realizaron cultivos y cocultivos de S12, y ensayos de luciferasa tal como se detalló anteriormente.

Ejemplo 5: Hiperplasia prostática benigna (HPB)

10 Tal como se detalló anteriormente, la señalización de *hedgehog* parece tener tanto un papel importante en la formación de patrones de próstata temprana, como un papel en el mantenimiento de la próstata de adulto. Aunque el cáncer de próstata es un efecto potencial de la regulación errónea de la señalización de *hedgehog* en la próstata de adulto, otro estado habitual de la próstata que parece correlacionarse con la expresión de *hedgehog* es la hiperplasia prostática benigna (HPB).

15 HPB es una enfermedad de la zona central de la próstata, y se caracteriza por el aumento de músculo liso alrededor de la uretra prostática. De manera interesante, se expresa *shh* en un gradiente en la próstata de adulto con la mayor expresión en la zona central de la próstata. Adicionalmente, *shh* está implicado en la diferenciación de músculo liso en otros tejidos incluyendo el intestino y pulmón (Apelqvist *et al.* (1997) *Current Biology* 7: 801-804; Pepicelli *et al.* (1998) *Current Biology* 8: 1083-1086). Estas evidencias identificaron la señalización de *hedgehog* como un buen candidato para la implicación en la etiología de HPB. Finalmente, la transcripción de *shh* se aumenta mediante la exposición a dihidro-testosterona (DHT) (Podlasek *et al.*, citado anteriormente). Esto es significativo porque la concentración de 5-alfa-reductasa, una enzima que convierte testosterona en DHT, está elevada en estroma con HPB (Wilkin *et al.* (1980) *Acta Endocrinology* 94: 284-288). Estos datos sugieren que la regulación errónea de la señalización de *hedgehog* puede estar implicada en HPB y, por tanto, que la presente invención proporciona utilidad para el tratamiento de HPB.

Señalización de *hedgehog* en HPB

25 Se examinaron la expresión de *sonic hedgehog* y la expresión de *gli-1* en muestras con HPB humanas. Las figuras 31 y 32 muestran el análisis de hibridación *in situ* de muestras con HPB humanas, y demuestran que tanto *shh* como *gli-1* se expresan abundantemente en HPB. Además, la figura 33 demuestra que *shh* no se expresa de manera ubicua en la totalidad de la próstata, sino que en su lugar está presente en un gradiente con el mayor nivel de transcritos tanto de *hedgehog* como de *ptc-1* presentes en la zona central proximal de la próstata.

30 Adicionalmente, se analizó la expresión de *shh* y *gli-1* mediante Q-RT-PCR. La figura 34 muestra que tanto *shh* como *gli-1* se expresan en muestras con HPB. Para comparación, se proporciona la expresión de *shh* y *gli-1* en muestras con carcinoma de células basales (BCC). Estos resultados demuestran que se expresa *gli-1* en muestras con HPB a un nivel similar al hallado en un tipo de cáncer que se sabe que está provocado por una mutación en la ruta de *hedgehog*. Finalmente, la figura 35 muestra la expresión de *shh* y *gli-1* en líneas celulares con HPB, y compara la expresión con la observada en BCC, líneas celulares de cáncer de próstata y fibroblastos de próstata normal. Obsérvese que se expresa *gli-1* a niveles similares tanto en líneas celulares con HPB como en muestras con BCC. Estos resultados sugieren un papel de la señalización de *hedgehog* en HPB y sugieren además que el antagonismo de la señalización de *hedgehog* tiene utilidad significativa en el tratamiento de HPB.

40 MÉTODOS: Hibridación *in situ* (figuras 31 y 33): Se obtuvieron criosecciones de tejido fijado en paraformaldehído de 30 μm , se digirieron con proteinasa K, se hibridaron durante la noche con sonda de ARN marcada con digoxigenina. Después de lavados tras hibridación de alta rigurosidad, se incuban las secciones con un anticuerpo anti-digoxigenina que se marca con fosfatasa alcalina. Se visualiza la señal mediante adición de BM purple, una disolución de cromógeno disponible comercialmente que reacciona con la fosfatasa alcalina para formar un precipitado de color púrpura.

45 Hibridación *in situ* radiactiva (figura 32): En resumen, se aclaran secciones de 7 mm de tejido fijado en paraformaldehído, incrustado en parafina que contienen grandes islas de células basales, se rehidratan, se digieren con proteinasa K, se acetilan y se hibridan durante la noche con sondas de ARN marcadas con ^{33}P . Después de lavados tras hibridación de alta rigurosidad, se sumergieron portaobjetos en fotoemulsión y se incubaron en la oscuridad durante 14 días a 4°C. Después del revelado, se sometieron los portaobjetos a contratinción con hematoxilina y eosina y se obtuvieron imágenes usando iluminación de campo oscuro. Se convirtieron las imágenes de campo oscuro en color artificial rojo y se superpusieron a imágenes de campo brillante. Q-RT-PCR: Se recogieron muestras en Trizol (GIBCO-BRL) y se aisló el ARN según el protocolo del fabricante. Luego se transcribió el ARN en ADNc de primera cadena según protocolos convencionales, y se amplificó usando un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (TaqMan) de Perkin Elmer y cebadores específicos de gen. Se usó el gen de mantenimiento GAPDH para normalizar la concentración de ARN y la eficiencia de PCR, y se añadieron cebadores de GAPDH a las mismas reacciones. Puesto que las sondas para ambos genes se marcan con diferentes fluoróforos, pueden detectarse la señal específica y la de GAPDH en el mismo tubo. Se calcularon las intensidades de señal usando los algoritmos proporcionados en Sequence Detector v1.7, el software proporcionado por el fabricante.

Ejemplo 6: Análisis adicional de la expresión de hedgehog en tejido normal e hiperproliferativo

Para acceder adicionalmente a la variedad de tejidos en los que los métodos y las composiciones de la presente invención pueden ser útiles en la inhibición de la proliferación, el crecimiento, la diferenciación o supervivencia de células, se analizó la expresión de *hedgehog* en una variedad de tejidos humanos normales y cancerosos. Se examinó la expresión tanto a nivel del ARNm de *hedgehog* usando RT-PCR cuantitativa como a nivel de proteína *hedgehog* mediante inmunohistoquímica.

La figura 36 presenta el análisis mediante Q-RT-PCR de la expresión de Sonic hedgehog (*shh*) en una variedad de líneas celulares de cáncer humanas. Se examinó la expresión de *Shh* en líneas celulares humanas de colon, pulmón, ovario, renales y hepáticas, y estos resultados indican que se expresa *shh*, a concentraciones variables, en líneas celulares derivadas de cada uno de estos tejidos.

La figura 37 presenta el análisis mediante Q-RT-PCR de la expresión de *shh* en tumores sometidos a pases de colon, pulmón, mama, melanoma, ovario, próstata, pancreáticos y renales. Los resultados demuestran que se expresa *shh*, a niveles variables, en tumores sometidos a pases derivados de cada uno de estos tejidos.

Aunque la expresión de ARN de *shh* en una muestra proporciona evidencias de que la señalización de *hedgehog* puede ser activa en una célula, puede recopilarse información adicional examinando la expresión de proteína *hedgehog* en una célula. Para abordar esta cuestión, se realizó inmunohistoquímica usando un anticuerpo primario anti-*hedgehog* policlonal con muestras de tejido humano tanto normal como canceroso. La figura 38 muestra que se expresa proteína *hedgehog* en tejido humano normal obtenido de una variedad de fuentes incluyendo el estómago, la próstata, el bazo, intestino delgado, intestino grueso, la vesícula biliar, el riñón y apéndice. Resulta interesante indicar que se observa la expresión de *hedgehog* en tejido adulto normal derivado o bien del mesodermo o bien del endodermo.

Se observó adicionalmente expresión de proteína *hedgehog* en tumores humanos obtenidos de una variedad de tejidos. Las figuras 39 y 40 demuestran que la proteína *hedgehog* es detectable mediante inmunohistoquímica en tumores derivados de tejido saliva, esofágico, pancreático, de tiroides, colon, endometrial, de riñón y próstata.

Estos resultados indican que se expresa *hedgehog*, tanto a nivel del ARNm como de proteína, en una amplia variedad de tejidos tanto normales como hiperproliferativos. Es necesario un análisis adicional para determinar, para un tipo de tejido dado, las diferencias en el nivel de la expresión de *hedgehog* entre tejido normal y tejido hiperproliferativo. Tal análisis ayudará a proporcionar un mejor entendimiento del papel mecanístico de la expresión aumentada de *hedgehog* en estados hiperproliferativos incluyendo cáncer.

MÉTODOS: Q-RT-PCR: Se recogieron muestras en Trizol (GIBCO-BRL) y se aisló el ARN según el protocolo del fabricante. Luego se transcribió el ARN en ADNc de primera cadena según protocolos convencionales, y se amplificó usando un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (TaqMan) de Perkin Elmer y cebadores específicos de gen. Se usó el gen de mantenimiento GAPDH para normalizar la concentración de ARN y la eficiencia de PCR, y se añadieron cebadores de GAPDH a las mismas reacciones. Puesto que las sondas para ambos genes se marcan con diferentes fluoróforos, pueden detectarse la señal específica y la de GAPDH en el mismo tubo. Se calcularon las intensidades de señal usando los algoritmos proporcionados en Sequence Detector v1.7, el software proporcionado por el fabricante.

Inmunohistoquímica: Se recogieron muestras y se procesaron para inmunohistoquímica usando métodos convencionales. Se incubaron las muestras durante la noche con un anticuerpo primario anti-*hedgehog* policlonal.

Ejemplo 7: Antagonismo de la señalización de hedgehog en cáncer de colon

El crecimiento de tumores es un proceso complejo que requiere la proliferación, angiogénesis, la inhibición de la muerte celular, y muchas otras interacciones complejas entre las células cancerosas y el tejido circundante. Un mecanismo adicional mediante el cual la señalización de *hedgehog* puede influir en el crecimiento y la progresión tumoral es a través de la inducción de factores que potencian la proliferación, angiogénesis y la inhibición de la muerte celular. Por ejemplo, se ha mostrado que *sonic hedgehog* induce VEGF en fibroblastos. Por tanto, el uso de antagonistas de *hedgehog* puede impedir que la señalización de *hedgehog* induzca factores que fomentan la formación de tumores y, por tanto, inhibir la formación o progresión tumoral.

Dada la interacción compleja que es probable que exista entre células tumorales y el tejido circundante, se han usado dos modelos para analizar los efectos de antagonistas de *hedgehog* en la inhibición de la proliferación, el crecimiento, la diferenciación y supervivencia de tejidos hiperproliferativos. En el primer modelo, se les inyecta a ratones una combinación de fibroblastos y células cancerosas que expresan *hedgehog*, y se examinan los efectos de antagonistas de *hedgehog* sobre el crecimiento de este tumor mixto a lo largo del tiempo. En el segundo modelo, se les inyecta a ratones células cancerosas que expresan *hedgehog* que no se han combinado previamente con células de fibroblastos. Sin pretender restringirse por ninguna teoría particular, ambos modelos parecen compendiar al menos en cierto grado las interacciones complejas que se producen durante la formación de tumores. En el modelo de tumor mixto, interaccionan células cancerosas y células de fibroblastos, de manera muy similar a como interaccionan las células cancerosas y células estromales durante el desarrollo de muchas formas de cáncer. Sin

embargo, en el segundo modelo parece que células endógenas circundantes invaden e interaccionan con las células cancerosas que expresan hedgehog que se han inyectado, compendiando de manera similar las interacciones que se producen tanto en el modelo de tumor mixto como durante el desarrollo de muchas formas de cáncer. Por consiguiente, los resultados obtenidos usando cualquier modelo ayudan a abordar el uso de antagonistas de *hedgehog* en la inhibición de la proliferación, el crecimiento, la diferenciación y supervivencia de células hiperproliferativas.

Modelo I: Modelo de tumor mixto

Para ayudar a abordar este modelo, se investigó la capacidad del anticuerpo antagonista de *hedgehog* 5E1 para inhibir el crecimiento tumoral en ratones a los que se les inyectó una combinación de fibroblastos y células de cáncer de colon que expresan *hedgehog*. Se realizaron dos experimentos para evaluar los efectos del tratamiento con 5E1 sobre el tamaño tumoral en ratones a los que se les inyectó células de cáncer de colon que expresan *hedgehog*. En el primer experimento, se inició el tratamiento con 5E1, o control de PBS, el mismo día que la inyección de las células tumorales. Se resumen los resultados en las figuras 41 y 42, y demuestran que el tratamiento con 5E1 disminuye significativamente el tamaño, peso y la velocidad de crecimiento tumoral, en comparación con los de ratones tratados con PBS (figuras 41 y 42). Se realizó el experimento usando dos líneas celulares de cáncer de colon independientes con efectos similares.

En el segundo experimento, se retrasó el tratamiento con 5E1 hasta el decimoprimer día de crecimiento tumoral. Se resumen los resultados en las figuras 43 y 44, y demuestran que el tratamiento con 5E1 disminuye significativamente el tamaño y la velocidad de crecimiento del tumor en comparación con ratones de control (figuras 43 y 44). Se realizó el experimento usando dos líneas celulares de cáncer de colon independientes con efectos similares.

Para entender adicionalmente el mecanismo mediante el cual la administración de un antagonista de *hedgehog* inhibe el crecimiento de tumores *in vivo*, se realizó un análisis mediante TUNEL con tumores mixtos tratados o bien con 5E1 o bien con el control de PBS. La figura 45 demuestra que al menos una parte de las células en el tumor mixto de HT-29/fibroblasto murieron de manera apoptótica tras la administración del antagonista de *hedgehog*, 5E1. Este resultado demuestra que el tratamiento de estas células hiperproliferativas con un antagonista de *hedgehog* inhibe la proliferación, el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales mixtas *in vivo*, y que al menos parte de este efecto se debe a la muerte apoptótica de células en el tumor mixto tras el tratamiento.

Estos resultados demuestran la utilidad de antagonistas de *hedgehog* en la inhibición de la proliferación y el crecimiento de células cancerosas. Adicionalmente, este modelo proporciona un método *in vivo* para evaluar fácilmente la eficacia de antagonistas de *hedgehog* candidatos.

MÉTODOS: Experimento 1. Se les inyectó a veinte ratones desnudos por vía subcutánea una combinación de 10^6 células HT-29 (una línea celular de cáncer de colon que expresa Shh) y 10^6 células 1/2 10T (una línea celular de fibroblastos) en un volumen de 100 μ l. Se aleatorizaron los ratones a dos grupos. Se trató el grupo A con PBS, y se trató el grupo B con 5E1. Se iniciaron los tratamientos el mismo día que la inyección de las células tumorales. Se administró el tratamiento por vía i.p., 3 veces/semana a lo largo de un periodo de treinta días, y a una dosis de 6 mg/kg. Adicionalmente, se llevó a cabo este experimento con un protocolo idéntico usando otra línea celular de cáncer de colon que expresa Shh (Colo205) con resultados similares.

Experimento 2 - administración retardada. Se les inyectó a veinte ratones desnudos por vía subcutánea una combinación de 10^6 células HT-29 (una línea celular de cáncer de colon que expresa Shh) y 10^6 células 1/2 10T (una línea celular de fibroblastos) en un volumen de 100 μ l. Se aleatorizaron los ratones a dos grupos. Se trató el grupo A con PBS, y se trató el grupo B con 5E1. Se inició el tratamiento después de que hubiera crecido el tumor hasta el día 11. Tales tumores tenían un volumen de aproximadamente 90-210 mm³. Se administró el tratamiento por vía i.p., 3 veces/semana a lo largo de un periodo de veintinueve días (hasta el día 40 de crecimiento tumoral total), y a una dosis de 6 mg/kg. Adicionalmente, se llevó a cabo este experimento con un protocolo idéntico usando otra línea celular de cáncer de colon que expresa Shh (Colo205) con resultados similares.

Modelo II

Se llevaron a cabo experimentos similares para evaluar la eficacia de un antagonista de *hedgehog* en la disminución de la proliferación, supervivencia y el crecimiento de tumores derivados del trasplante de células HT-29 solas. Se les inyectaron células de cáncer de colon HT-29 que expresan hedgehog por vía subcutánea a ratones desnudos tal como se describió en detalle anteriormente. Las figuras 46 y 47 muestran que la administración retardada del antagonista de *hedgehog*, 5E1, reduce significativamente el crecimiento de tales tumores *in vivo* en comparación con tumores tratados con el control de PBS. De manera acorde a estos resultados, el tratamiento con 5E1 también reduce significativamente la expresión de gli-1 en estos tumores en comparación con tumores tratados con el control de PBS (figura 48).

Los resultados obtenidos usando los dos modelos *in vivo* descritos en detalle anteriormente demuestran que el antagonismo de la señalización de hedgehog puede inhibir significativamente la proliferación, supervivencia y el crecimiento de tumores que expresan hedgehog.

MÉTODOS: Se les inyectó a ratones desnudos por vía subcutánea 10^6 células HT-29 (una línea celular de cáncer de colon que expresa Shh) en un volumen de 100 μ l. Se aleatorizaron los ratones a dos grupos. Se trató el grupo A con PBS, y se trató el grupo B con 5E1. Se inició el tratamiento después de que hubiera crecido el tumor hasta el día 11. Se administró el tratamiento por vía i.p., 3 veces/semana a lo largo de un periodo de quince días, y a una dosis de 6mg/kg. Se midieron los volúmenes tumorales a lo largo del tiempo. Adicionalmente, se analizó la expresión de ARNm de *gli-1* mediante Q-RT-PCR en tumores tratados con PBS frente a tratados con 5E1.

Ejemplo 8: Antagonismo de la señalización de hedgehog en cáncer de páncreas

Se había demostrado previamente que se expresan ARNm y proteína hedgehog en varias líneas celulares de cáncer de páncreas, así como en muestras de tejido pancreático humano primario. Dada la existencia de líneas celulares de cáncer de páncreas que expresan hedgehog, se examinó la capacidad de antagonismo de la señalización de hedgehog para disminuir la proliferación, supervivencia y el crecimiento de células de cáncer de páncreas en xenoinjertos en ratones desnudos. De manera similar a los resultados observados con xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de vejiga, próstata y colon que expresan hedgehog, la administración de un antagonista de hedgehog disminuye el tamaño y la supervivencia de tumores generados por xenoinjertos de células de cáncer de páncreas que expresan hedgehog.

Xenoinjerto de SW1990

SW-1990 es una línea celular de adenocarcinoma ductal de páncreas que expresa hedgehog. Para evaluar la eficacia potencial de la administración de antagonistas de *hedgehog* para tratar tumores de páncreas, se generaron tumores en ratones desnudos mediante inyección subcutánea de células SW-1990. En estos experimentos, se inyectaron células SW-1990 en ausencia de fibroblastos. Se dividieron los animales que recibieron las células SW-1990 en dos grupos, y comenzaron a recibir inmediatamente tratamiento o bien con el anticuerpo bloqueante de hedgehog 5E1 o bien con PBS. Los animales que recibieron 5E1 recibieron una dosis de 2 mg/kg, por vía intravenosa, una vez a la semana.

Se evaluaron los efectos del tratamiento con el antagonista de *hedgehog* 5E1 midiendo el volumen y peso tumoral, así como mediante inspección visual de los tumores. De manera interesante, el volumen tumoral era variable debido a inflamación y, por tanto, el análisis visual y el peso tumoral parecen ser una medida más precisa de los efectos del antagonismo de hedgehog sobre estos tumores.

La figura 49 demuestra que la administración del anticuerpo bloqueante 5E1 da como resultado una disminución significativa en el peso de los tumores de xenoinjerto de SW1990. Los efectos del tratamiento con 5E1 se relacionan de la manera más espectacular a través de inspección visual de los tumores. La figura 50 muestra que los tumores tratados con 5E1 son más pequeños que los tumores de control, y que los tumores tratados con 5E1 contienen regiones extensas de necrosis. Aunque el volumen de los tumores de xenoinjerto de SW1990 era variable, debido a inflamación, la figura 51 indica la tendencia global de un volumen disminuido de los tumores de xenoinjerto tras la administración del antagonista de *hedgehog*, 5E1.

Xenoinjerto de CF PAC

Para confirmar adicionalmente los resultados que demuestran que la inhibición de la señalización de hedgehog tiene eficacia en la inhibición de la proliferación, supervivencia y el crecimiento de tumores de páncreas que expresan hedgehog, se llevaron a cabo experimentos similares con otra línea celular de tumor de páncreas que expresa hedgehog, CF PAC. Como SW1990, CF PAC es una línea celular de adenocarcinoma ductal de páncreas que expresa hedgehog. Se realizaron experimentos usando métodos similares para generar xenoinjertos de SW1990, y para someter a prueba la eficacia del antagonista de *hedgehog*, 5E1, en dichos xenoinjertos. La única diferencia entre los dos experimentos es que se retrasó el tratamiento con 5E1 hasta aproximadamente 11 días tras la administración de células CF-PAC.

Se evaluaron los efectos del tratamiento con el antagonista de *hedgehog*, 5E1 midiendo el volumen y el peso tumoral. De manera interesante, el volumen tumoral era variable debido a inflamación y, por tanto, el análisis visual y el peso tumoral parecen ser una medida más precisa de los efectos del antagonismo de hedgehog sobre estos tumores.

La figura 52 demuestra que la administración del anticuerpo bloqueante 5E1 da como resultado una disminución significativa del peso de los tumores de xenoinjerto de CF PAC. Aunque el volumen de los tumores de xenoinjerto de CF PAC era variable, debido a inflamación, la figura 53 indica la tendencia global de un volumen disminuido de los tumores de xenoinjerto tras la administración del antagonista de *hedgehog*, 5E1.

Se muestra la expresión adicional de *hedgehog* en cánceres humanos, tales como adenocarcinoma ductal de mama, cáncer de ovario, cáncer de útero humano, en la figura 55.

Ejemplo 9: Línea celular de cáncer que no expresa hedgehog

Se examinó la eficacia del antagonismo de la señalización de hedgehog en la regulación de la proliferación,

supervivencia y el crecimiento de células hiperproliferativas usando una línea celular de cáncer que no expresa hedgehog. Sin pretender restringirse por ninguna teoría particular, es posible que el antagonismo de la señalización de hedgehog sea el más eficaz en la regulación de la proliferación, supervivencia y el crecimiento celulares en células en las que la señalización de hedgehog ya es hiperactiva. Tales células incluirán, por ejemplo, células que comprenden una mutación en un componente de la ruta de señalización de hedgehog en las que la mutación da como resultado al menos uno de ganancia de función de un activador de la señalización de hedgehog o pérdida de función de un represor de la señalización de hedgehog (por ejemplo, *patched*).

SW-480 es una línea celular de adenocarcinoma de colon que no expresa hedgehog. Se administraron células SW-480 por vía subcutánea a ratones desnudos para generar xenoinjertos, tal como se describió previamente. Siete días, aproximadamente, después de la administración de las células SW-480, se inició el tratamiento o bien con 5E1 o bien con control de PBS (administración retardada). En animales tratados con 5E1, la administración fue a una dosis de 2 mg/kg, por vía intravenosa, una vez a la semana. Se midieron los volúmenes tumorales regularmente en la totalidad del tratamiento. La figura 54 demuestra que la administración de 5E1 parece no tener ningún efecto sobre el volumen tumoral en xenoinjertos de SW-480.

Los resultados de estos experimentos subrayan adicionalmente que la señalización desregulada de hedgehog puede dar como resultado hiperproliferación y/o supervivencia celulares inapropiadas. Estos resultados demuestran la utilidad de la inhibición de la señalización de hedgehog inapropiada como método de inhibición de proliferación, crecimiento y supervivencia celulares inapropiados. Los ejemplos de estados que pueden tratarse mediante estos métodos incluyen, pero no se limitan a, diversas formas de cáncer.

Adicionalmente, la observación de que el antagonismo de hedgehog es el más eficaz en la regulación de la proliferación, el crecimiento y la supervivencia celulares en células que expresan hedgehog, o células en las que la ruta de señalización de hedgehog es hiperactiva, sugiere métodos de diagnóstico para predecir qué estados y qué pacientes (por ejemplo, qué formas de cáncer) es más probable que respondan a regímenes de tratamiento que incluyen un antagonista de *hedgehog*.

Ejemplo 10: Exámenes para detectar inhibidores de iARN de componentes de la señalización de HH

Los ejemplos anteriores presentan modelos tanto *in vitro* como *in vivo* para examinar los efectos del antagonista de iARN de *hedgehog* sobre la proliferación celular. Los modelos proporcionan ensayos para someter a prueba una variedad de antagonistas de iARN para determinar la capacidad para inhibir el crecimiento y la proliferación celulares. Tales exámenes pueden usarse en ensayos iniciales para identificar constructos de iARN principales, y también pueden usarse para evaluar las eficacias relativas de antagonistas de iARN candidatos.

Los agentes antagonistas de iARN que pueden analizarse de este modo pueden interferir en la señalización de *hedgehog* en cualquier punto a lo largo de la ruta de transducción de señales. Por ejemplo, antagonistas de iARN preferidos pueden interactuar con *hedgehog*, *patched 1* o *smoothened*, solos o en combinación. Agentes preferidos adicionales pueden interactuar con un componente intracelular de la ruta de hedgehog incluyendo *gli-1*, *gli-2*, o *gli-3*.

Los métodos *in vitro* e *in vivo* descritos anteriormente no son específicos para las líneas celulares de cáncer descritas explícitamente en el presente documento. Podría someterse a prueba de manera similar cualquier tipo de célula o línea celular, y estos métodos podrían usarse fácilmente para evaluar la capacidad de antagonistas de iARN de *hedgehog* para inhibir el crecimiento y la proliferación celulares en otros tipos de células cancerosas. Adicionalmente, el ensayo *in vitro* podría emplearse para analizar la señalización de *hedgehog* y la capacidad de antagonistas de iARN de *hedgehog* para bloquear la señalización de *hedgehog* en otros tipos hiperproliferativos no cancerosos de célula. Por ejemplo, los estados hiperproliferativos incluyen muchas otras clases de trastornos incluyendo enfermedades de la piel tales como psoriasis. Los efectos de antagonistas de iARN de *hedgehog* candidatos sobre estos tipos de célula pueden evaluarse fácilmente usando los métodos descritos en el presente documento.

Ejemplo 11. Inhibición de ARNip de la expresión de Shh en líneas celulares de cáncer

Los siguientes experimentos demuestran la eficacia y especificidad de determinados constructos de ARNip, tales como ARNip en horquilla (ARNip de tipo hc) transcritos fuera de plásmidos transfectados en células diana.

Se diseñaron cinco antagonistas de ARNip potenciales de Shh humano según las enseñanzas de la presente memoria descriptiva, y se seleccionaron tres de los cinco pares para las pruebas iniciales. Específicamente, para cada uno de los tres antagonistas de ARNip seleccionados, se ordenaron y sintetizaron dos oligonucleótidos de polirribonucleótido (ARN) de 21 bases como pares 5'-fosforilados, desalados y desprotegidos de oligonucleótidos de ARN (Dharmacon Research, Inc., Lafayette, CO). Las secuencias para los tres pares de oligonucleótidos son:

n.º 1 sentido: 5'-P cga gau guc ugc uag ucc (SEQ ID NO: 5)

n.º 1 antisentido: 5'-P acu agc agc aga cau cuc gcc (SEQ ID NO: 6)

n.º 4 sentido: 5'-P cag agu agc ccu aac cgc ucc (SEQ ID NO: 7)

n.º 4 antisentido: 5'-P agc ggu uag ggc uac ucu gcc (SEQ ID NO: 8)

n.º 5 sentido: 5'-P cgg uca agu cca gcu gaa gcc (SEQ ID NO: 9)

n.º 5 antisentido: 5'-P cuu cag cug gac uug acc gcc (SEQ ID NO: 10)

- 5 Luego se disolvieron los oligonucleótidos de ARN en Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) hasta una concentración final de 100 µM. Para cada antagonista de ARNip, luego se mezclaron 10 µl de cada uno de los dos oligonucleótidos de ARN y se hibridaron muy lentamente usando un bloque de PCR en la máquina de PCR ABI 7700.

Para someter a prueba la eficacia de los tres antagonistas de ARNip, se dividió 1:3 una placa confluyente de células HEK-293 y se cultivó en placa de cultivo tisular de 24 pocillos. La densidad final de las células era de aproximadamente 14.000 células/pocillo. Se llevó a cabo infección con Lipofectamine según las instrucciones del fabricante. Específicamente, se mezclaron 0,4 µg de phShh^{FL} (un plásmido que codifica para Shh humano "pcDNA3.1-hShh") y, o bien 0, 20, 100, o bien 500 pmoles de cada antagonista de de ARNip Shh hibridado en 25 µl de DMEM libre de suero (sin pen./estrep.) con 4 µl de "Plus Reagent" durante 15 minutos. Al mismo tiempo, se mezcló 1 µl de Lipofectamine en 25 µl de DMEM libre de suero (sin pen./estrep.) con 4 µl de "Plus Reagent" durante 15 minutos. Al final de la incubación, se combinaron las dos mezclas para formar complejos durante 15 minutos. Para cada pocillo de células HEK-293, se cambió el medio a 200 µl de DMEM libre de suero (sin pen./estrep.), y luego se añadieron los complejos formados a los pocillos de prueba respectivos. Después de 3 horas de incubación a 37°C en un incubador de cultivo tisular con el 5% de CO₂, se añadieron a cada pocillo 250 µl de DMEM (sin pen./estrep.) con FBS al 20%. Luego se devolvió la placa de células al incubador. Después de aproximadamente 68 horas de incubación, se fijaron las células en cada pocillo en PFA/PAS al 4%, y se tiñeron con dilución 1:200 de anticuerpo de conejo anti-Shh y anticuerpo secundario anti-conejo marcado con Cy3. Los resultados mostrados en la figura 2 indicaron que ARNip n.º 1 inhibe casi por completo la expresión de Shh en células transfectadas, incluso a la menor cantidad de ARNip (20 pmoles). El efecto inhibitorio de ARNip n.º 4 es menos pronunciado, aunque no puede descartarse que el error experimental no sea el principal motivo por el que este ARNip es menos eficaz basándose en un único experimento. El efecto inhibitorio de n.º 5 es ligeramente menos eficaz que el del n.º 1. Por tanto, se usó ARNip n.º 1 para futuros experimentos.

A continuación, se sometió a prueba la especificidad de los efectos inhibitorios del antagonista de ARNip n.º 1 de Shh frente a otras dos proteínas Hh relacionadas, Ihh y Dhh. Específicamente, se dividieron las mismas células HEK-293 y se sembraron hasta una densidad final de aproximadamente 14.000 células/pocillo en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos. Se llevó a cabo la misma transfección con Lipofectamine tal como se describió anteriormente para cada una de las siguientes combinaciones:

0,4 µg de pcDNA3.1-hShh + 0, 50 ó 250 pmoles de ARNip n.º 1;

0,4 µg de pcDNA3.1-hIhh + 0, 50 ó 250 pmoles de ARNip n.º 1;

0,4 µg de pcDNA3.1-hDhh + 0, 50 ó 250 pmoles de ARNip n.º 1; y,

- 35 0,4 µg de pcDNA3.1-hShh + 250 pmoles de sólo control de cadena inversa de ARNip n.º 1.

Después de 2 horas de incubación con cada uno de los complejos, se reemplazó el medio en cada pocillo de transfección por 1 ml de nuevo DMEM (sin pen./estrep.) + FBS al 10%, con el fin de obtener células más sanas al final del experimento. Después de 2 días más de incubación, se fijaron todas las células tal como se describió anteriormente, y se tiñeron con anticuerpo policlonal de conejo contra pan-Hh H-160 (n.º de cat. sc-9024, Santa Cruz Biotechnology, CA) y anticuerpo secundario anti-conejo marcado con Cy3. Los resultados mostrados en la figura 3 indicaron que ARNip n.º 1 para Shh es muy específico para Shh, y no inhibió obviamente la expresión de Ihh o Dhh. El experimento también confirma que 50 pmoles de ARNip n.º 1 inhibieron casi por completo la expresión de Shh humano. Además, el control negativo, 250 pmoles de sólo cadena inversa de ARNip n.º 1 fue completamente ineficaz en las mismas condiciones.

- 45 Para confirmar la transcripción reducida de ARNm de Hh en células transfectadas, se transfectaron células HEK-293 en placas de cultivo tisular de 6 pocillos (densidad de siembra final de aproximadamente 100.000 células/pocillo) usando métodos similares tal como se describió anteriormente (resultado no mostrados).

La secuencia del antagonista de ARNip seleccionada mediante los métodos anteriores puede usarse luego para derivar una secuencia de ARNip en horquilla corto, que puede clonarse luego en un vector de plásmido. El plásmido puede transfectarse de manera estable en una célula huésped para establecer una línea celular estable. La línea celular estable establecida puede expresar de manera constitutiva o inducible ARNip para Shh humano, o cualquier otro componente de señalización de HH. Estas líneas celulares estables son muy útiles con varios fines. Por ejemplo, si la línea celular estable se basa en una línea celular de cáncer bien establecida tal como HT-29, pueden usarse para estudiar los efectos de la atenuación de la señalización de HH sobre el crecimiento de células cancerosas. También son útiles para estudios *in vitro*, tales como la formación de perfiles de expresión en cocultivo

con fibroblastos sensibles a HH para entender la señalización paracrina mediante HH en cáncer. Las líneas celulares estables también pueden usarse para evaluar la eficiencia de otros inhibidores de HH, tales como el anticuerpo5E1, en modelos animales de xenoinjerto usando estas líneas estables.

5 **Se construyó un plásmido de este tipo con una secuencia en horquilla corta derivada del ARNip n.º 1 de Shh humano, y se usó para transfectar de manera estable células HEK-293.

En resumen, basándose en la secuencia de ARNip n.º 1 de Shh humano, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos en horquilla cortos:

n.º 1 cadena superior : 5'-P cga gat gtc tgc tgc tag t ttc aag aga act agc agc aga cat ctc g TTTT g (SEQ ID NO: 11);

n.º 1 cadena inferior: 5'-P gat cca aaa acg aga tgt ctg ctg cta gtt ctc ttg aaa cta gca gca gac atc tcg (SEQ ID NO: 12)

10 Se disolvieron los oligonucleótidos en TE como disolución madre 100 µM. Luego se mezclaron estos dos oligonucleótidos en una razón 1:1 para producir 50 µl de una disolución madre 10 µM, que se calentó hasta 100°C durante 5 minutos en un bloque de PCR. Se apagó el bloque de PCR para permitir que disminuyese lentamente la temperatura hasta 40°C a lo largo del transcurso de aproximadamente 1 hora.

15 Se subclonó el oligonucleótido hibridado en los sitios de clonación múltiple (entre los sitios Apa I y Bam HI) en el vector pcDNA3.1-U6-hygro(-) usando técnicas de biología molecular convencionales. Este tipo de vector expresa la secuencia de inserto fuera de su promotor de ARNnp U6 para ARN polimerasa III, y el transcrito de ARN se inicia precisamente en el "cag" de extremo 5' de la cadena superior, y termina precisamente en la secuencia TTTT del extremo 3' (Paddison, Genes and Dev. 16: 948-958, 2002). El transcrito de ARN monocatenario resultante forma una estructura de tallo-bucle, o estructura en horquilla corta, coincidiendo el tallo de la horquilla con la secuencia del
20 ARNip n.º 1. También están disponibles vectores similares con diferentes marcadores seleccionables de mamíferos, tales como zeomicina y puromicina.

Equivalentes

Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar usando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento.

25

REIVINDICACIONES

1. Método de inhibición de al menos uno de la proliferación, la supervivencia o el crecimiento no deseados de una célula de mamífero, que comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un antagonista de iARN de hedgehog contra una secuencia diana de la ruta de hedgehog, secuencia diana que es un gen *Shh*, en el que poner en contacto dicha célula con dicho antagonista de iARN de hedgehog disminuye al menos uno de la proliferación, la supervivencia o el crecimiento celulares, y en el que dicho antagonista de iARN de hedgehog comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos el 90% a una secuencia de ácido nucleico expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 5 a 6 y 9 a 12, en el que dicho método no es un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además determinar si dicha célula expresa un gen *gli*, y poner en contacto dicha célula que expresa un gen *gli* con una cantidad eficaz de dicho antagonista de iARN de hedgehog contra una secuencia diana de la ruta de hedgehog.
3. Método según la reivindicación 2, en el que dicho gen *gli* es *gli-1*.
4. Método según la reivindicación 1, en el que dicha proliferación celular no deseada es cáncer.
5. Método según la reivindicación 1, en el que dicha proliferación celular no deseada es hiperplasia benigna.
6. Método según la reivindicación 4, en el que dicho cáncer es cáncer genitourinario.
7. Método según la reivindicación 4, en el que dicho cáncer es cáncer del sistema neuronal incluyendo glioma maligno, meningioma, meduloblastoma, tumor neuroectodérmico y ependimoma.
8. Método según la reivindicación 4, en el que dicho cáncer se asocia con uno o más de tejidos de pulmón, próstata, mama, ovario, útero, músculo, vejiga, colon, riñón, páncreas e hígado.
9. Método según la reivindicación 1, en el que el antagonista de iARN es un antagonista de ARNip.
10. Método según la reivindicación 9, en el que dicho antagonista de ARNip es un ARNip formado después de transcripción a partir de síntesis exógena o de un plásmido (vector de expresión de iARN).
11. Método según la reivindicación 10, en el que dicho ARNip es un ARNip en horquilla corto formado después de transcripción a partir de un único promotor de dicho plásmido (vector de expresión de iARN).
12. Método según la reivindicación 10, en el que dicho ARNip es un ARNbc corto formado después de transcripción a partir de dos promotores convergentes flanqueantes en dicho plásmido (vector de expresión de iARN).
13. Método según la reivindicación 10, en el que dicho ARNip tiene aproximadamente 19-30 nucleótidos de longitud.
14. Método según la reivindicación 13, en el que dicho ARNip tiene 21-23 nucleótidos de longitud.
15. Método según la reivindicación 10, en el que dicho ARNip es un fragmento generado por corte con nucleasa Dicer de ARN bicatenarios más largos de al menos 25, 50, 100, 200, 300, 400 ó 400-800 bases de longitud.
16. Método según la reivindicación 10, en el que dicho ARNip es bicatenario, e incluye proyección/proyecciones corta(s) en uno o ambos extremos.
17. Método según la reivindicación 16, en el que dicha proyección corta es una proyección en 3' que se estabiliza frente a la degradación.
18. Método según la reivindicación 17, en el que dicha proyección en 3' se estabiliza frente a la degradación incluyendo nucleótidos de purina, adenosina o guanosina.
19. Método según la reivindicación 17, en el que dicha proyección en 3' se estabiliza frente a la degradación sustituyendo nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, por ejemplo, sustitución de proyecciones en 3' de nucleótido de uridina por 2'-desoxitimidina.
20. Método según la reivindicación 10, en el que dicho ARNip se sintetiza químicamente.
21. Método según la reivindicación 1, en el que dicho antagonista de iARN comprende o bien tramos largos de ARN bicatenario idéntico o sustancialmente idéntico a dicha secuencia diana de ácido nucleico, o bien tramos cortos de ARN bicatenario idéntico o sustancialmente idéntico únicamente a una región de dicha secuencia diana de ácido nucleico.

22. Método según la reivindicación 1, en el que dicho antagonista de iARN es específico para la ruta de señalización de hedgehog (HH) y no afecta significativamente a otras rutas de señalización celular.
23. Método según la reivindicación 22, en el que dicha otra ruta de señalización celular es una ruta de *wingless*.
- 5 24. Método de inhibición de al menos uno de la proliferación, la supervivencia o el crecimiento no deseados de una célula de mamífero, que comprende
- (a) determinar si dicha célula expresa un gen *hedgehog*, y
- (b) poner en contacto dicha célula que expresa dicho gen *hedgehog* con una cantidad eficaz de un antagonista de iARN de hedgehog contra un gen *Shh*;
- 10 en el que poner en contacto dicha célula con dicho antagonista de iARN de *hedgehog* disminuye al menos uno de la proliferación, la supervivencia o el crecimiento celulares, y en el que dicho antagonista de iARN de hedgehog comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos el 90% a una secuencia de ácido nucleico expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 5 a 6 y 9 a 12, en el que dicho método no es un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.
- 15 25. Método según la reivindicación 24, en el que dicha proliferación, supervivencia o crecimiento celular no deseados de una célula es cáncer.
26. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho antagonista de iARN de *hedgehog* se formula en un portador farmacéuticamente aceptable.
27. Uso de un antagonista de iARN de hedgehog contra un gen *Shh* para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un tumor en un paciente, en el que dicho antagonista de iARN de hedgehog comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos el 90% a una secuencia de ácido nucleico expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 5 a 6 y 9 a 12.
- 20 28. Uso según la reivindicación 27, en el que dicho antagonista de iARN de hedgehog se administra como parte de un régimen de tratamiento contra el cáncer.
29. Uso de un antagonista de iARN de hedgehog contra un gen *Shh* en la fabricación de un medicamento para inhibir al menos uno de la proliferación, la supervivencia o el crecimiento no deseados de una célula, en el que dicha proliferación, supervivencia o crecimiento no deseados de una célula es cáncer, hiperplasia benigna o angiogénesis, y en el que dicho antagonista de iARN de hedgehog comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos el 90% a una secuencia de ácido nucleico expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 5 a 6 y 9 a 12.
- 25 30. Uso según la reivindicación 29, en el que el antagonista de iARN de *hedgehog* se usa como parte de un régimen de tratamiento contra el cáncer.
31. Método de disminución de la transducción de señales en una ruta mediada por hedgehog en una célula de mamífero, que comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un antagonista de iARN de hedgehog, en el que dicha ruta mediada por hedgehog es independiente de Ptc, Smo y/o Gli, y en el que dicho antagonista de iARN de hedgehog comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos el 90% a una secuencia de ácido nucleico expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 5 a 6 y 9 a 12, en el que dicho método no es un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.
- 35 32. Método según la reivindicación 31, en el que dicho antagonista de iARN de hedgehog es un antagonista de ARNip de *Shh*.
33. Uso de un antagonista de iARN de hedgehog contra un gen *Shh* en la fabricación de un medicamento para modular la proliferación, diferenciación o supervivencia de una célula madre adulta de mamífero en cultivo, en el que dicho antagonista de iARN de hedgehog comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos el 90% a una secuencia de ácido nucleico expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 5 a 6 y 9 a 12.
- 40 34. Uso según la reivindicación 33, en el que dicha célula madre es una célula madre neuronal.
35. Uso según la reivindicación 33, en el que dicha célula madre adulta se selecciona de cualquiera de una célula madre hematopoyética, una célula madre mesenquimatosa, una célula madre neuronal, una célula madre de la cresta neural, una célula madre miocárdica o una célula madre pancreática.
- 45 36. Método según la reivindicación 4 ó 25, en el que el cáncer no se caracteriza por una mutación en *patched-1*.
- 50

37. Uso según la reivindicación 27, en el que el tumor no se caracteriza por una mutación en *patched-1*.
38. Un antagonista de iARN de hedgehog para su uso en la disminución de al menos uno de la proliferación, la supervivencia o el crecimiento no deseados de una célula; en el que dicho antagonista de iARN selecciona como diana una secuencia diana de la ruta de hedgehog, en el que dicha proliferación, supervivencia o crecimiento no deseados de una célula es cáncer, hiperplasia benigna o angiogénesis, y en el que dicha secuencia diana es un gen *Shh*, y en el que dicho antagonista de iARN de hedgehog comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos el 90% a una secuencia de ácido nucleico expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 5 a 6 y 9 a 12.
39. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 38, en el que dicha proliferación celular no deseada es cáncer.
40. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 38, en el que dicha proliferación celular no deseada es hiperplasia benigna.
41. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 39, en el que dicho cáncer es cáncer genitourinario.
42. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 39, en el que dicho cáncer es cáncer del sistema neuronal incluyendo glioma maligno, meningioma, meduloblastoma, tumor neuroectodérmico y ependimoma.
43. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 39, en el que dicho cáncer se asocia con uno o más de tejidos de pulmón, próstata, mama, ovario, útero, músculo, vejiga, colon, riñón, páncreas e hígado.
44. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 43, en el que dicha forma de cáncer asociada con tejido de mama se selecciona de carcinoma ductal inferior, carcinoma lobulillar inferior, carcinoma intraductal, carcinoma medular y carcinoma tubular.
45. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 43, en el que dicho cáncer asociado con tejido pulmonar se selecciona de adenocarcinoma, adenocarcinoma broncoalveolar y carcinoma de células pequeñas.
46. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 43, en el que dicho cáncer asociado con la próstata es adenocarcinoma.
47. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 38, en el que dicha proliferación celular no deseada es angiogénesis no deseada.
48. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 47, en el que dicha angiogénesis no deseada se produce en crecimiento tumoral, metástasis tumorales o crecimientos anómalos por células endoteliales, incluyendo enfermedad neovascular, degeneración macular asociada a la edad, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, rechazo de injerto corneal, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolenticular, queratoconjuntivitis epidérmica, deficiencia de vitamina A, uso excesivo de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, queratitis seca de pterigión, síndrome de Sjogren, acné rosácea, flictenulosis, sífilis, infecciones por *Mycobacteria*, degeneración lipoidea, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por herpes simple, infecciones por herpes zóster, infecciones protozoarias, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratólisis marginal, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliarteritis, traumatismo, granulomatosis de Wegener, sarcoidosis, escleritis, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide, queratotomía radial, osteoartritis, inflamación crónica (por ejemplo, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn), hemangioma, enfermedad de Osler-Weber-Rendu y telangiectasia hemorrágica hereditaria.
49. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 47, en el que dicha angiogénesis no deseada se produce en procesos fisiológicos normales incluyendo cicatrización de heridas, ovulación e implantación de la blástula después de la fecundación.
50. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 38, en el que dicha proliferación, supervivencia o crecimiento no deseados de dicha célula se produce en crecimiento normal del pelo/cabello, en tricosis, hipertricosis, hirsutismo o foliculitis incluyendo foliculitis decalvante, foliculitis uleritematosa reticulada, foliculitis queloide y pseudofoliculitis.
51. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 38, en el que el antagonista de iARN es un antagonista de ARNip.
52. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 51, en el que dicho antagonista de ARNip es un ARNip formado después de transcripción a partir de síntesis exógena o de un plásmido (vector de expresión de iARN).

53. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 52, en el que dicho ARNip es un ARNip en horquilla corto formado después de transcripción a partir de un único promotor de dicho plásmido (vector de expresión de iARN).
- 5 54. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 52, en el que dicho ARNip es un ARNbc corto formado después de transcripción a partir de dos promotores convergentes flanqueantes en dicho plásmido (vector de expresión de iARN).
55. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 52, en el que dicho ARNip tiene aproximadamente 19-30 nucleótidos de longitud.
- 10 56. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 52, en el que dicho ARNip tiene 21-23 nucleótidos de longitud.
57. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 52, en el que dicho ARNip es un fragmento generado por corte con nucleasa Dicer de ARN bicatenarios más largos de al menos 25, 50, 100, 200, 300, 400 ó 400-800 bases de longitud.
- 15 58. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 52, en el que dicho ARNip es bicatenario, e incluye proyección/proyecciones corta(s) en uno o ambos extremos.
59. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 58, en el que dicha proyección corta tiene 1-6 nucleótidos de longitud en el extremo 3', de 2 a 4 nucleótidos de longitud en el extremo 3', o 1-3 nucleótidos de longitud en el extremo 3'.
- 20 60. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 59, en el que una cadena de dicho ARNip tiene una proyección en 3', y la otra cadena es de extremos romos, o también tiene una proyección de igual o diferente longitud.
61. Antagonista de iARN para su uso de reivindicaciones 59 y 60, en el que dicha proyección en 3' se estabiliza frente a la degradación.
- 25 62. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 61, en el que dicha proyección en 3' se estabiliza frente a la degradación incluyendo nucleótidos de purina adenosina o guanosina.
63. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 61, en el que dicha proyección en 3' se estabiliza frente a la degradación sustituyendo nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, por ejemplo, sustitución de proyecciones en 3' de nucleótido de uridina por 2'-desoxitimidina.
- 30 64. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 52, en el que dicho ARNip se sintetiza químicamente.
65. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 38, en el que dicho antagonista de iARN comprende o bien tramos largos de ARN bicatenario idéntico o sustancialmente idéntico a dicha secuencia diana de ácido nucleico, o bien tramos cortos de ARN bicatenario idéntico o sustancialmente idéntico únicamente a una región de dicha secuencia diana de ácido nucleico.
- 35 66. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 38, en el que dicho antagonista de iARN es específico para la ruta de señalización de hedgehog (HH) y no afecta significativamente a otras rutas de señalización celular.
67. Antagonista de iARN para su uso según la reivindicación 65, en el que dicha otra ruta de señalización celular es una ruta de *wingless*.
- 40 68. Antagonista de iARN que consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO: 5 a 6 y 9 a 12.

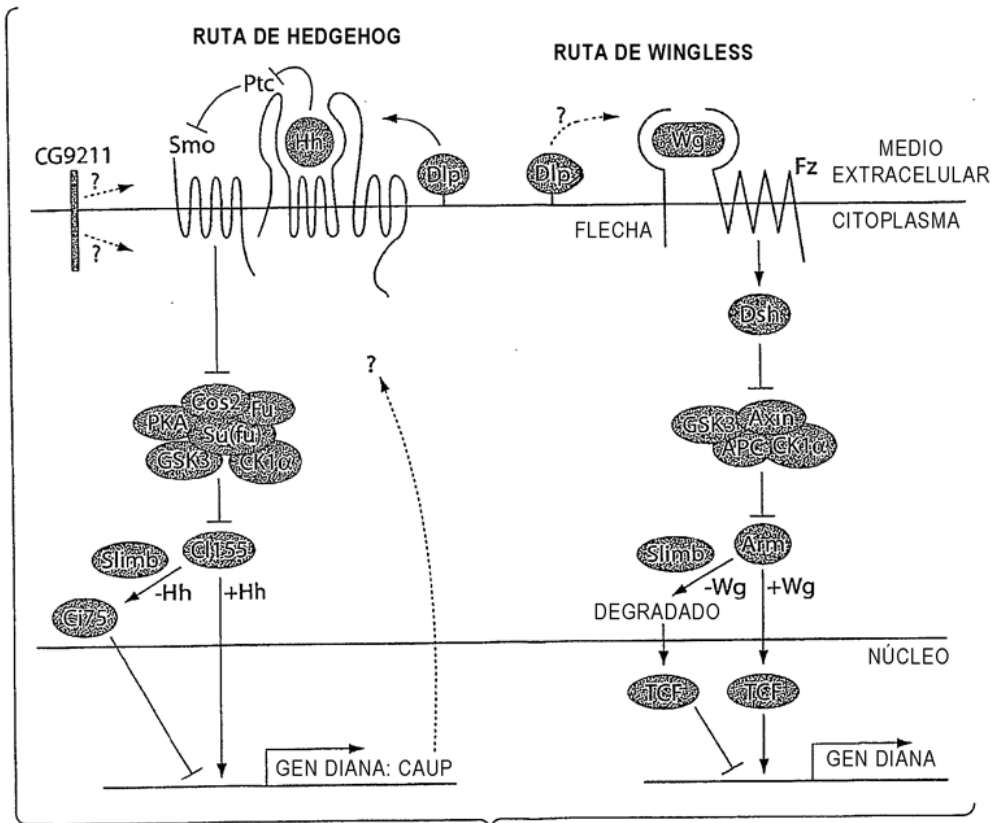


Fig. 1

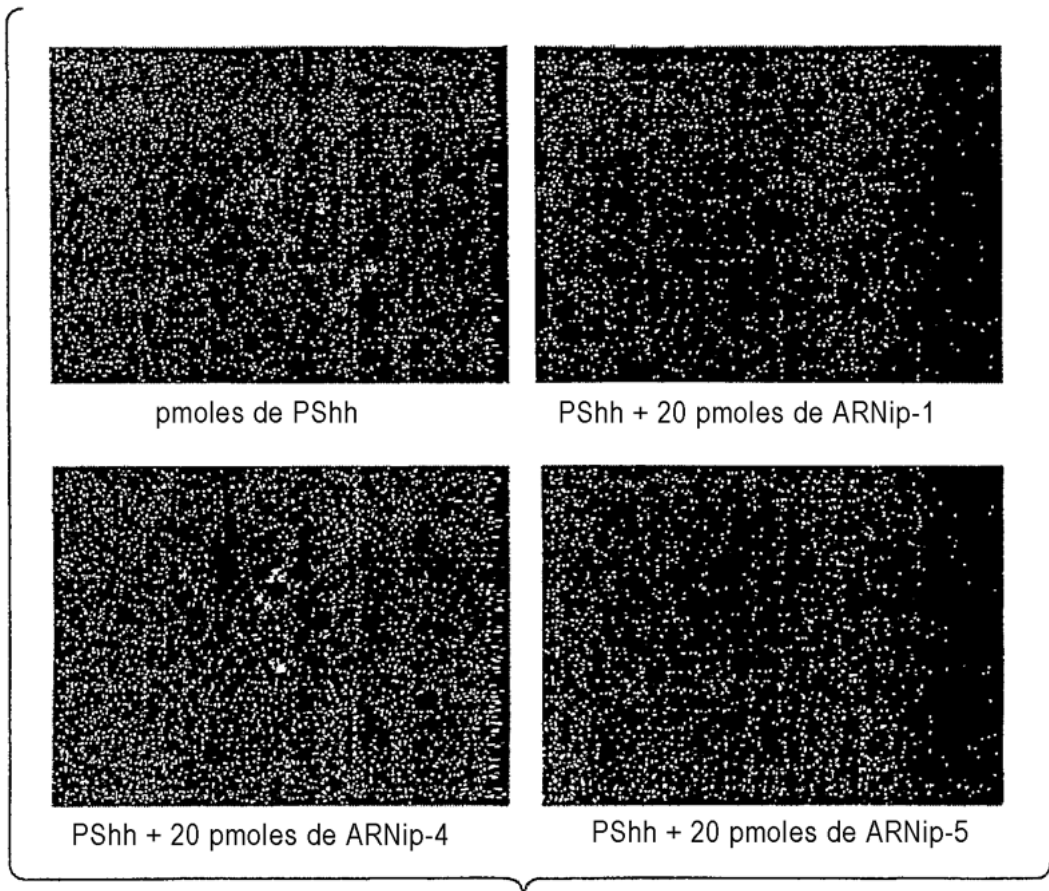


Fig. 2

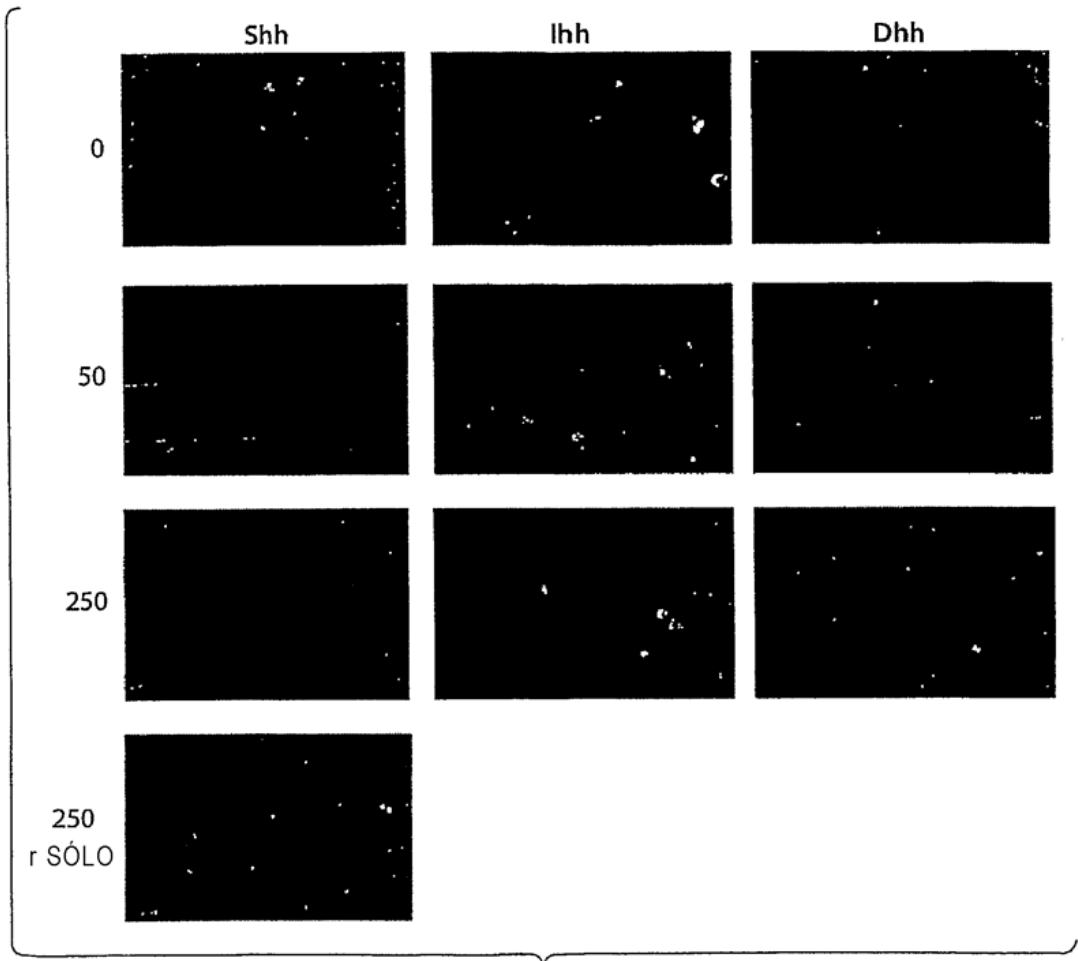


Fig. 3

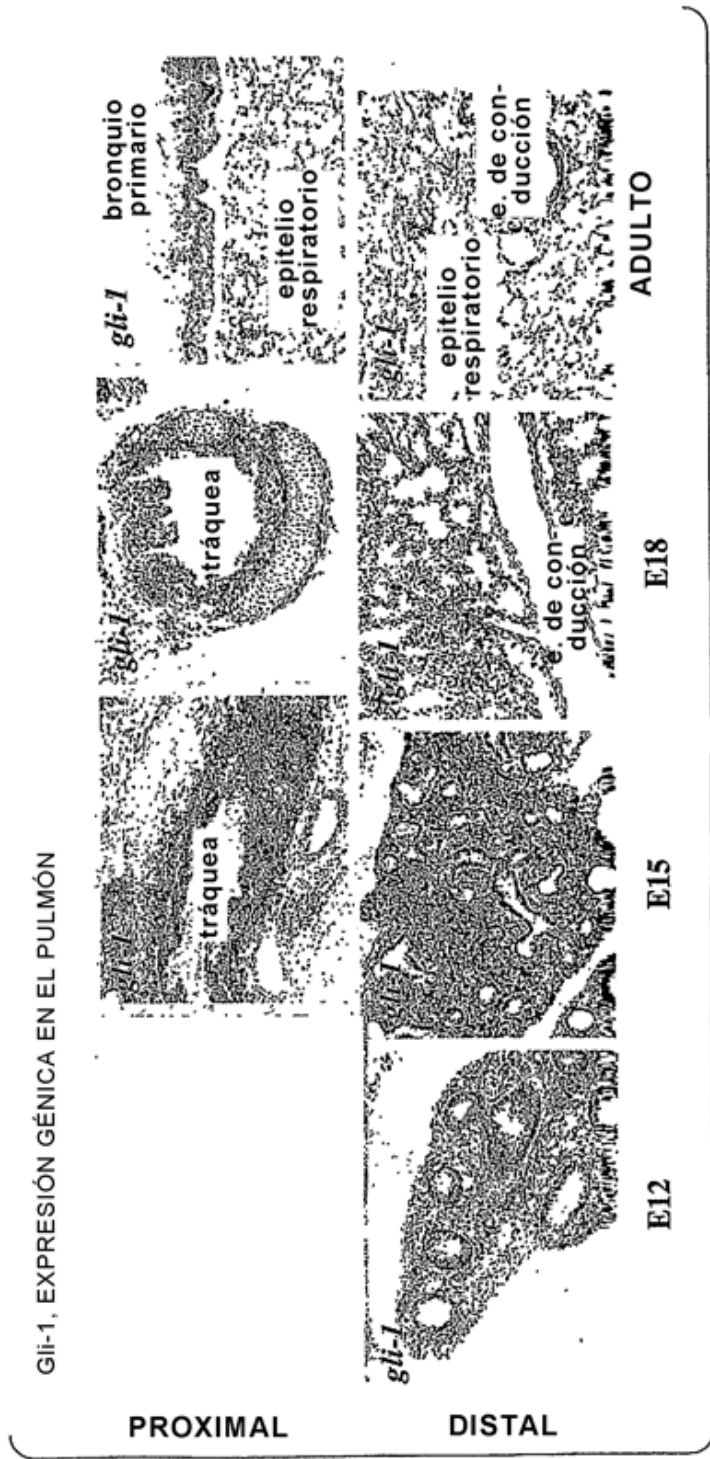


Fig. 4

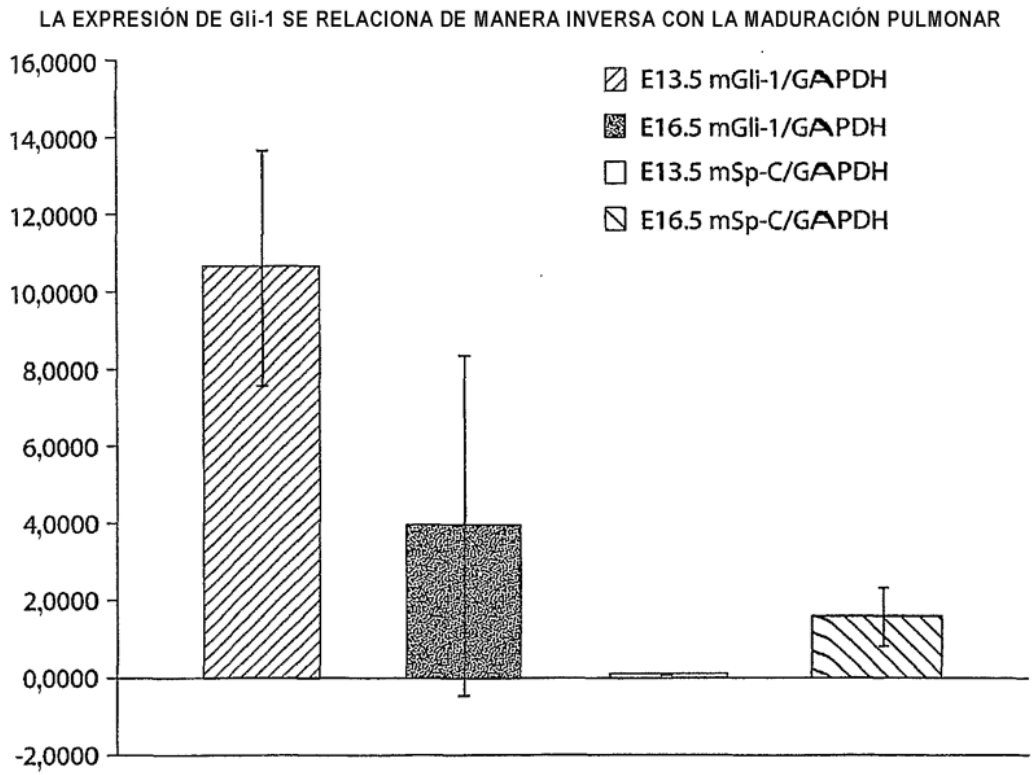


Fig. 5

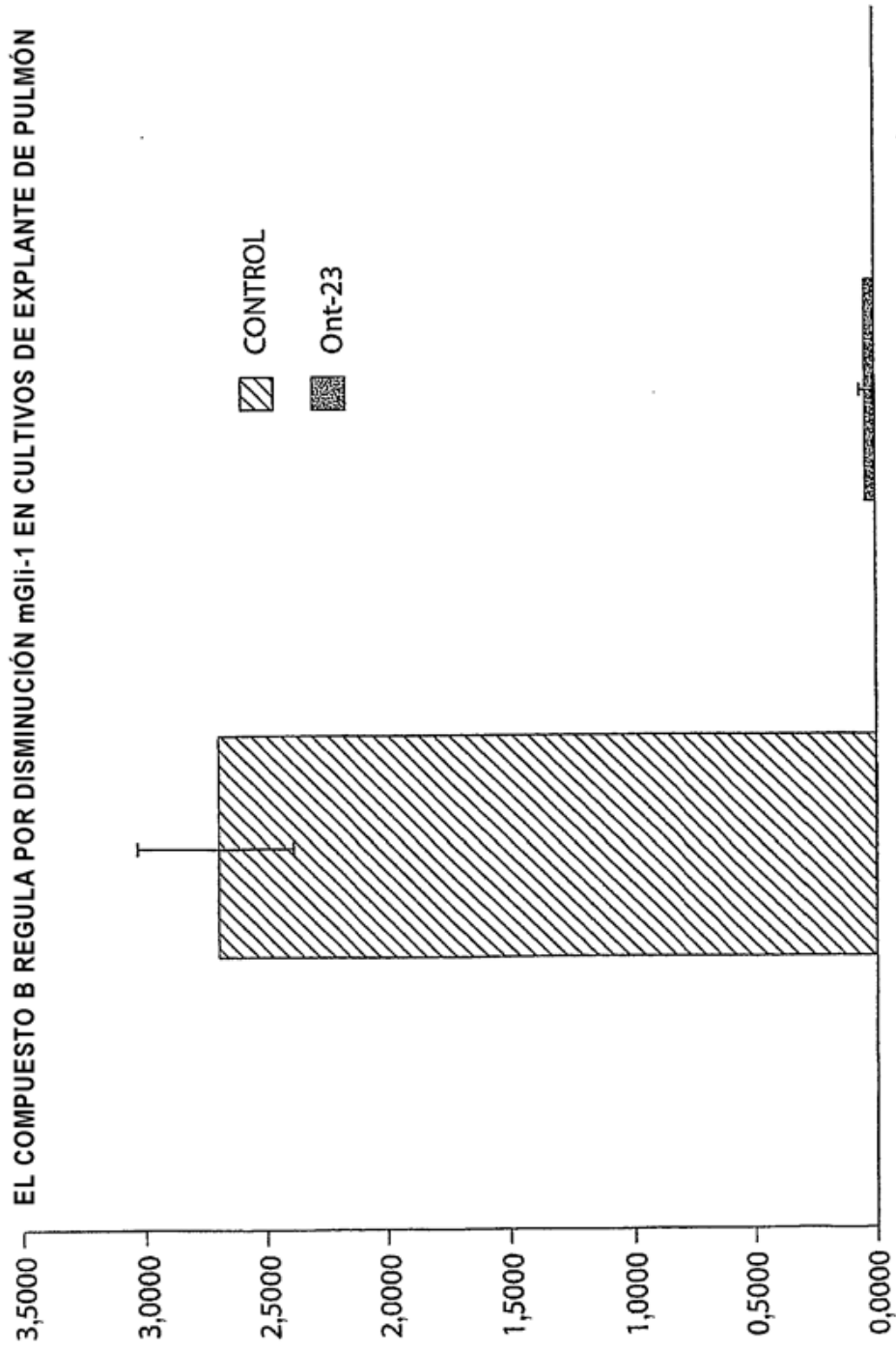


Fig. 6

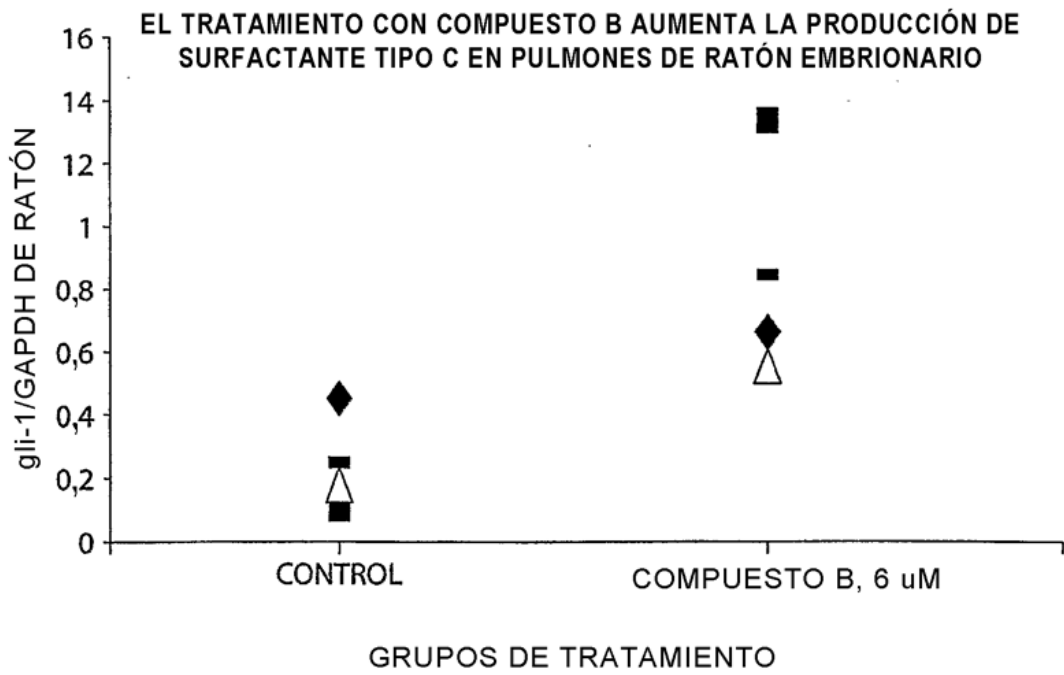


Fig. 7

LOS NEUMOCITOS TIPO II EN CULTIVOS DE PULMÓN TRATADOS CON COMPUESTO B
SE DIFERENCIAN DE MANERA PREMATURA

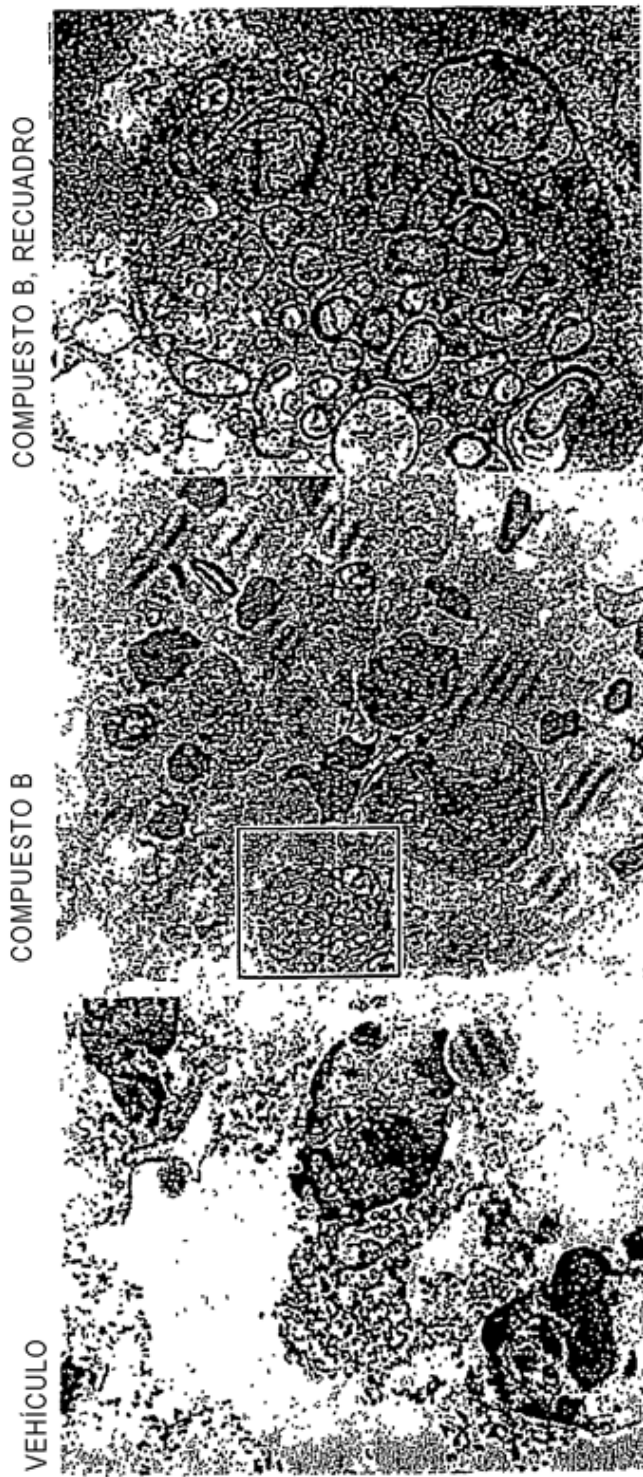


Fig. 8

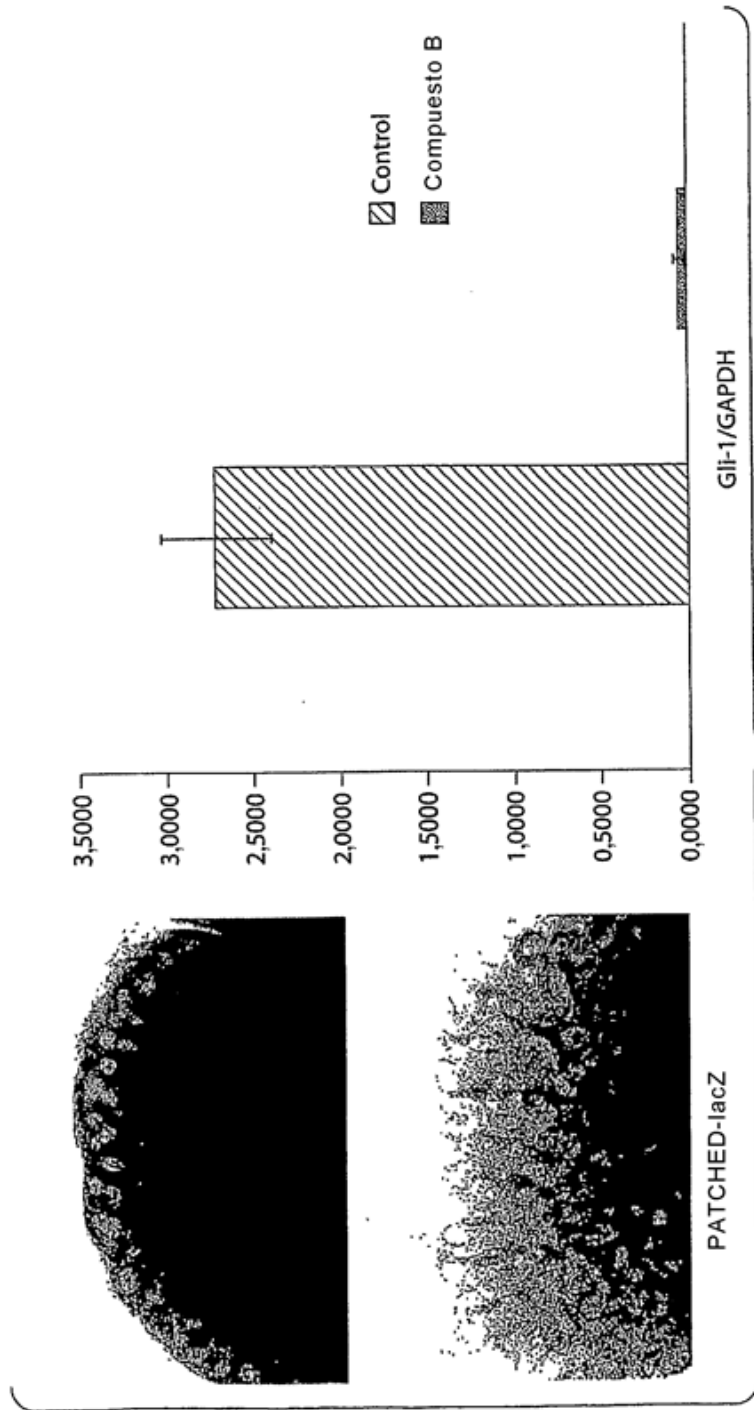


Fig. 9

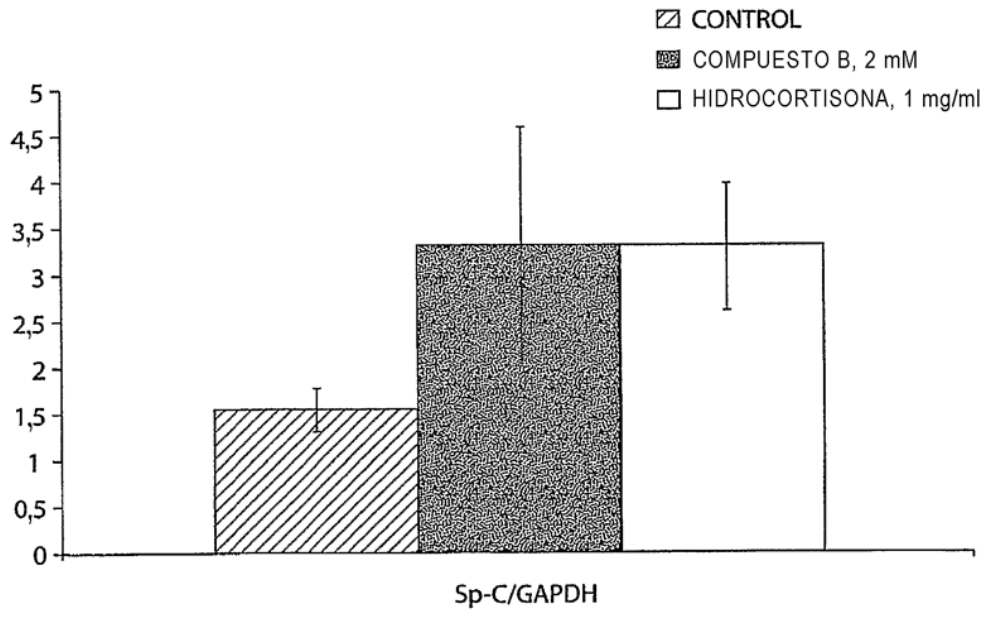


Fig. 10

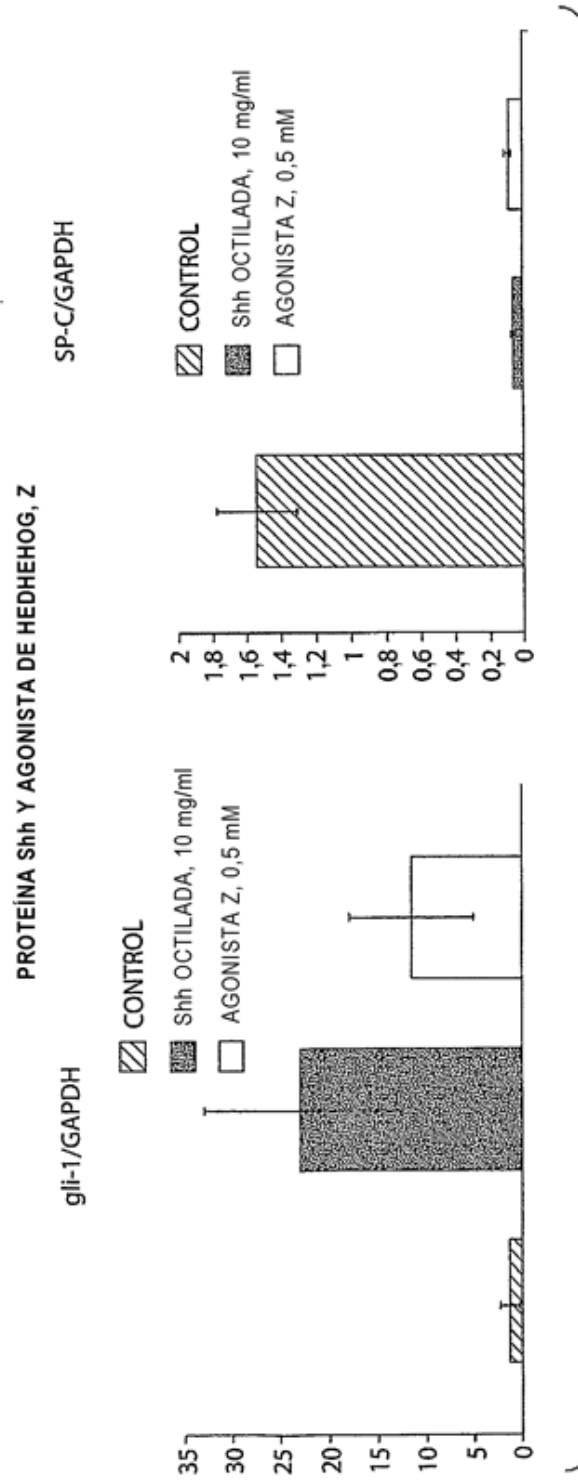


Fig. 11

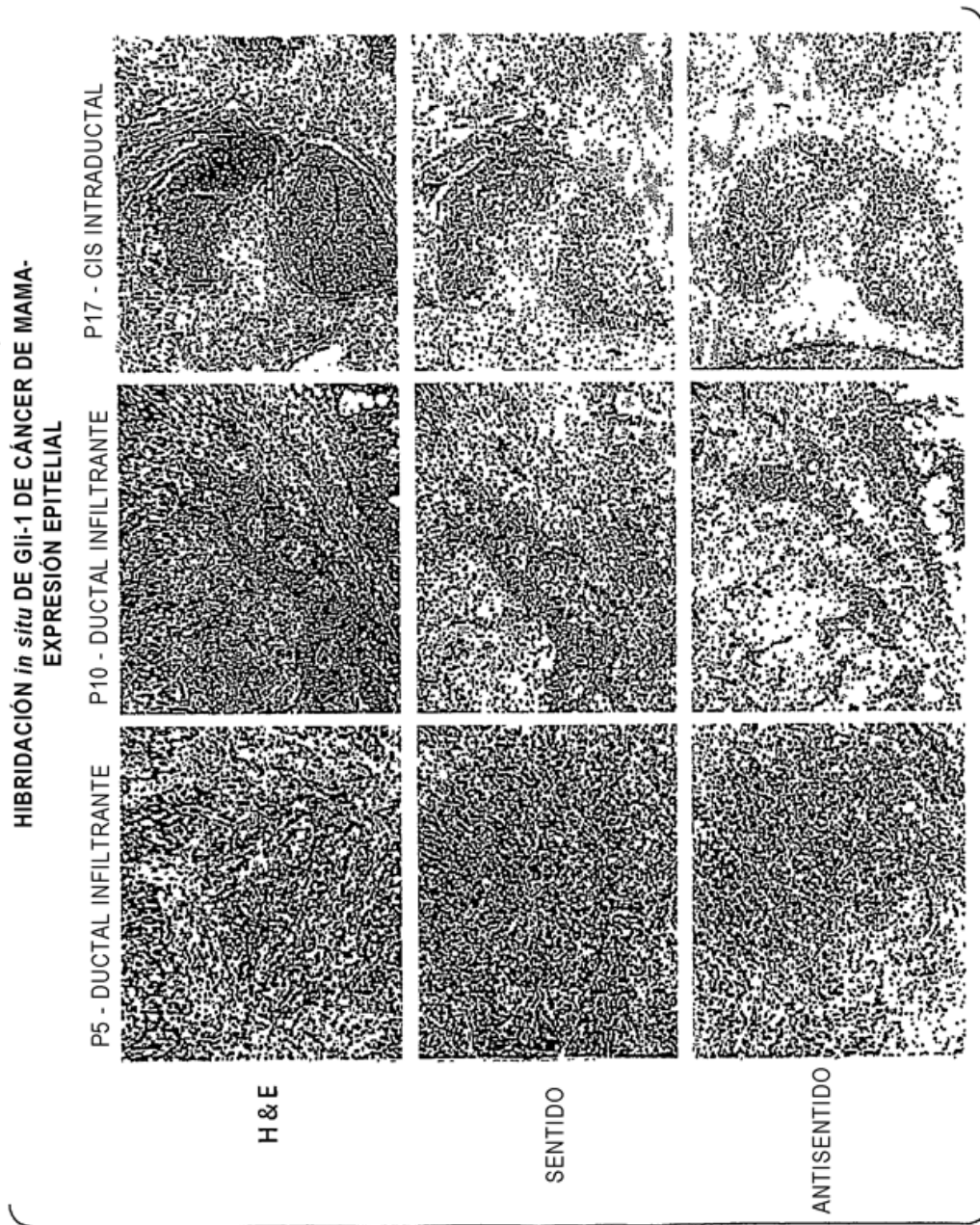


Fig. 12

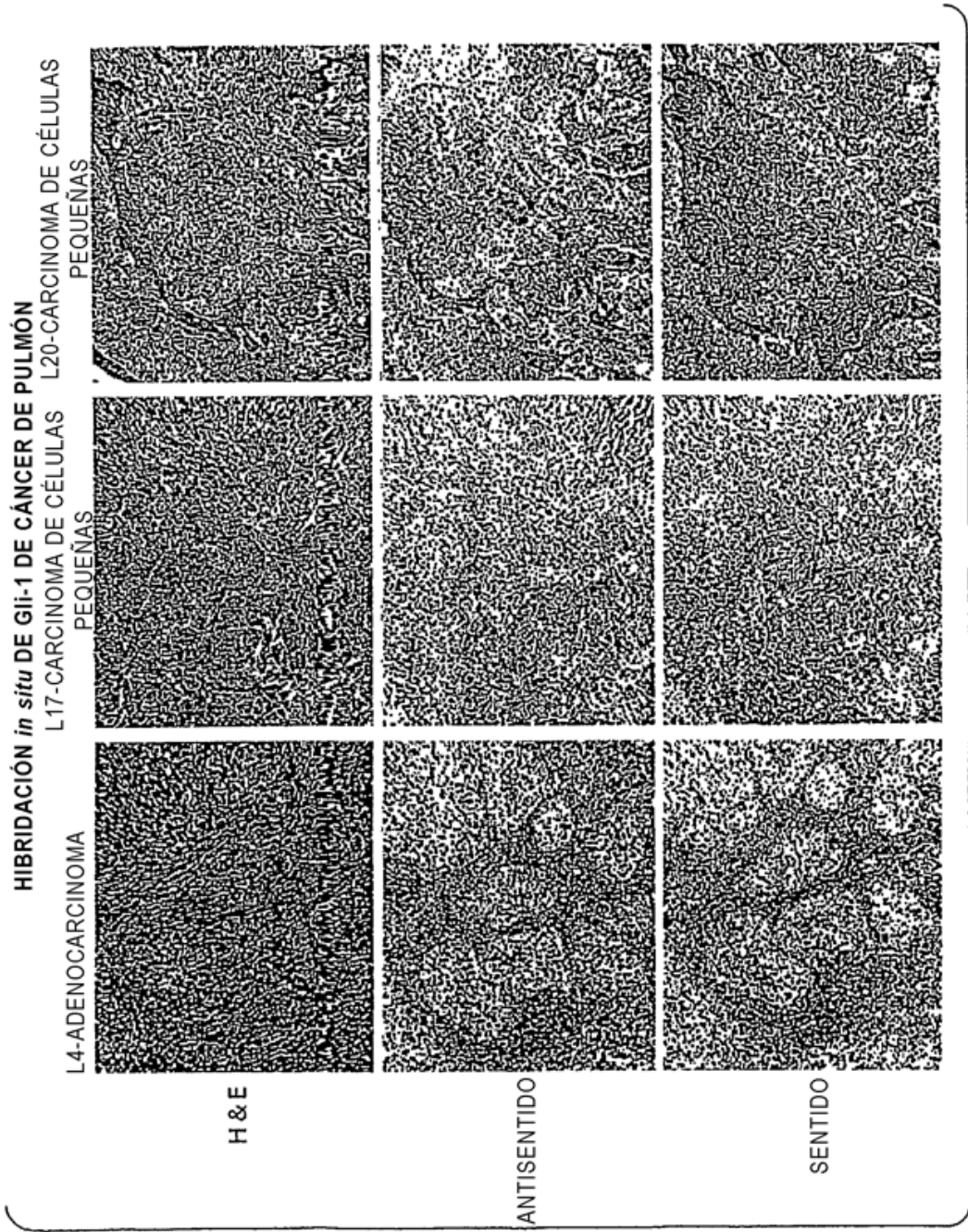


Fig. 13

HIBRIDACIÓN *in situ* DE Gli-1 DE CÁNCER DE PRÓSTATA-
EXPRESIÓN ESTROMAL



Fig. 14

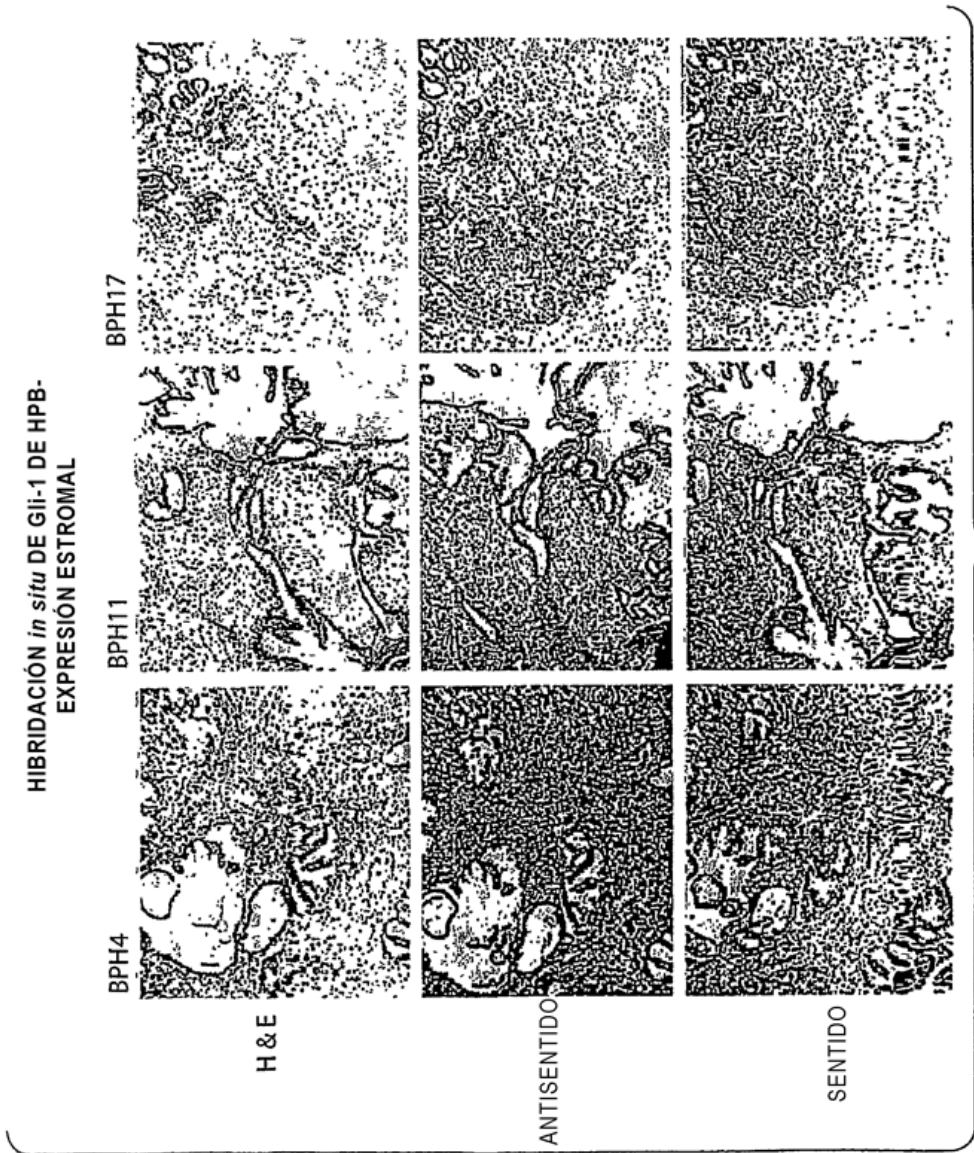


Fig. 15

SEÑALIZACIÓN DE HEDGEHOG EN VEJIGA DE RATÓN

ptc-lacZ, RECIÉN NACIDO



gli-1, ADULTO

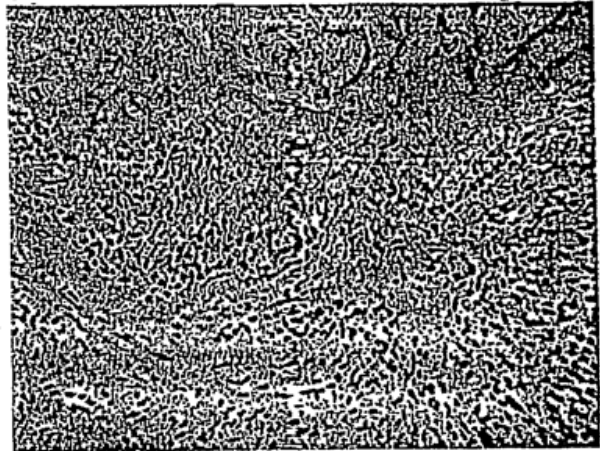


Fig. 16

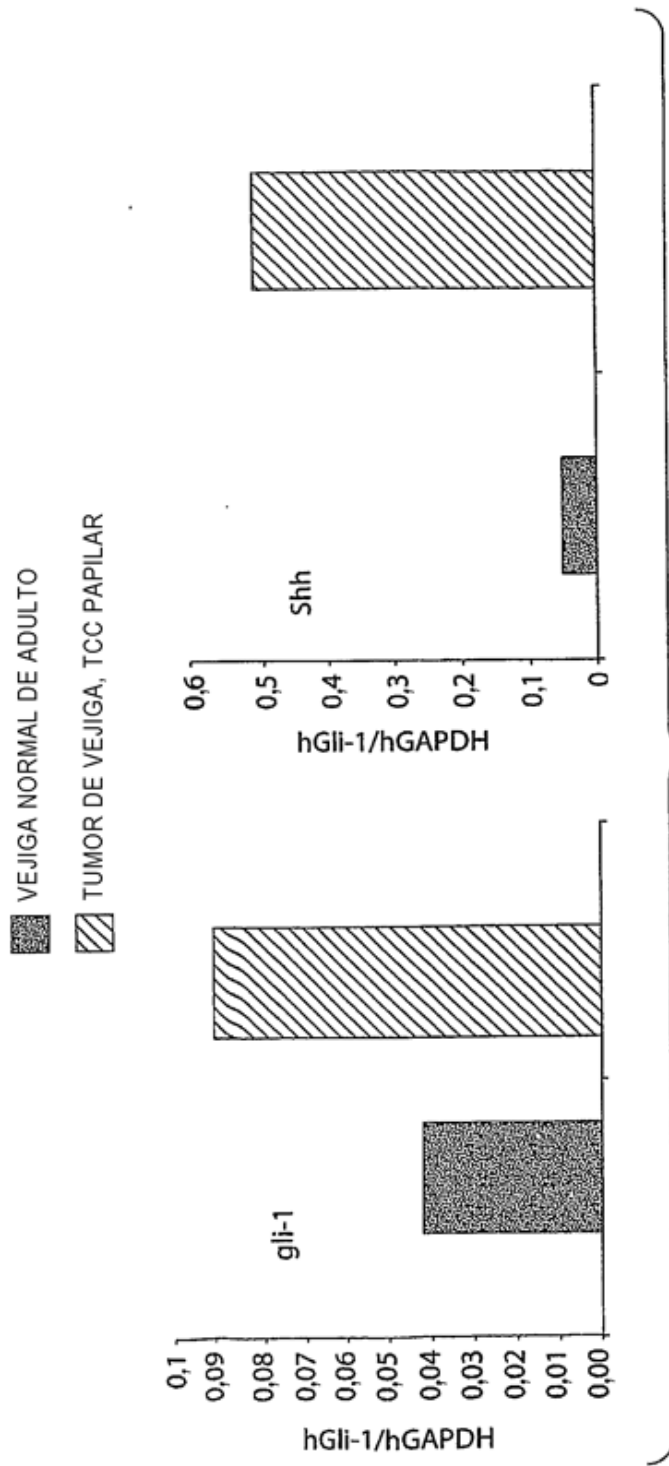


Fig. 17

SEÑALIZACIÓN DE HH EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE VESÍGULA
(1 día en FBS al 10%, 2 días en FBS al 1%)

- HT1376
- ▨ RT4 HTB-2
- ▩ SW780
- ▧ HT 1197
- ▦ J82 HTB-1
- ▤ TCCSUP HTB-5
- ▥ T24 HTB-4
- ▣ 5637 HTB-9

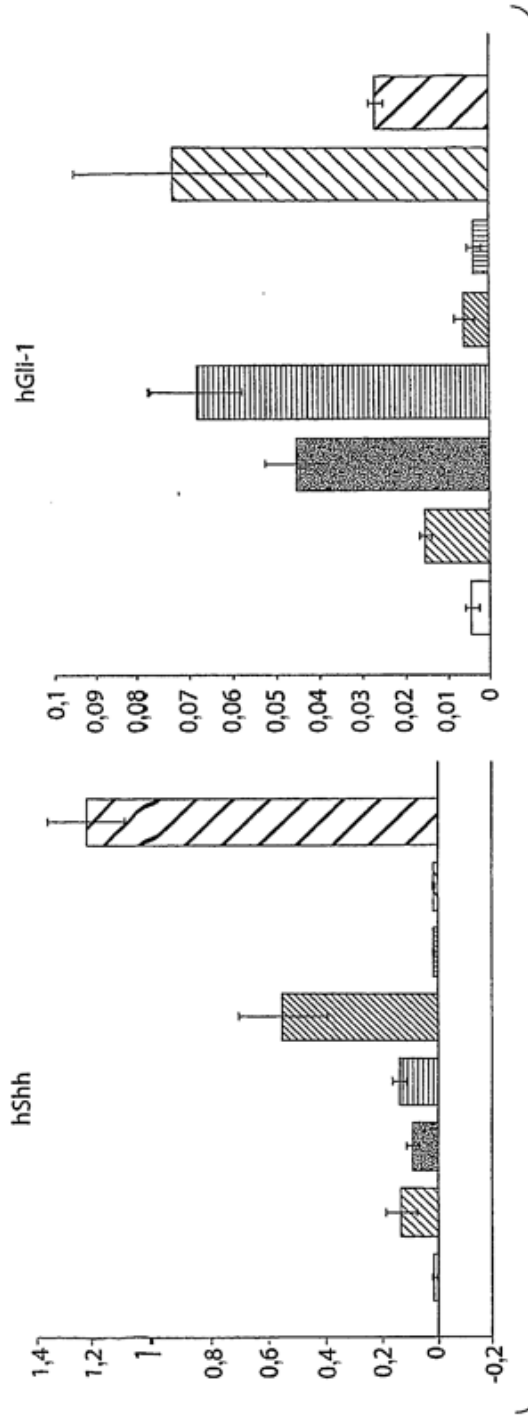
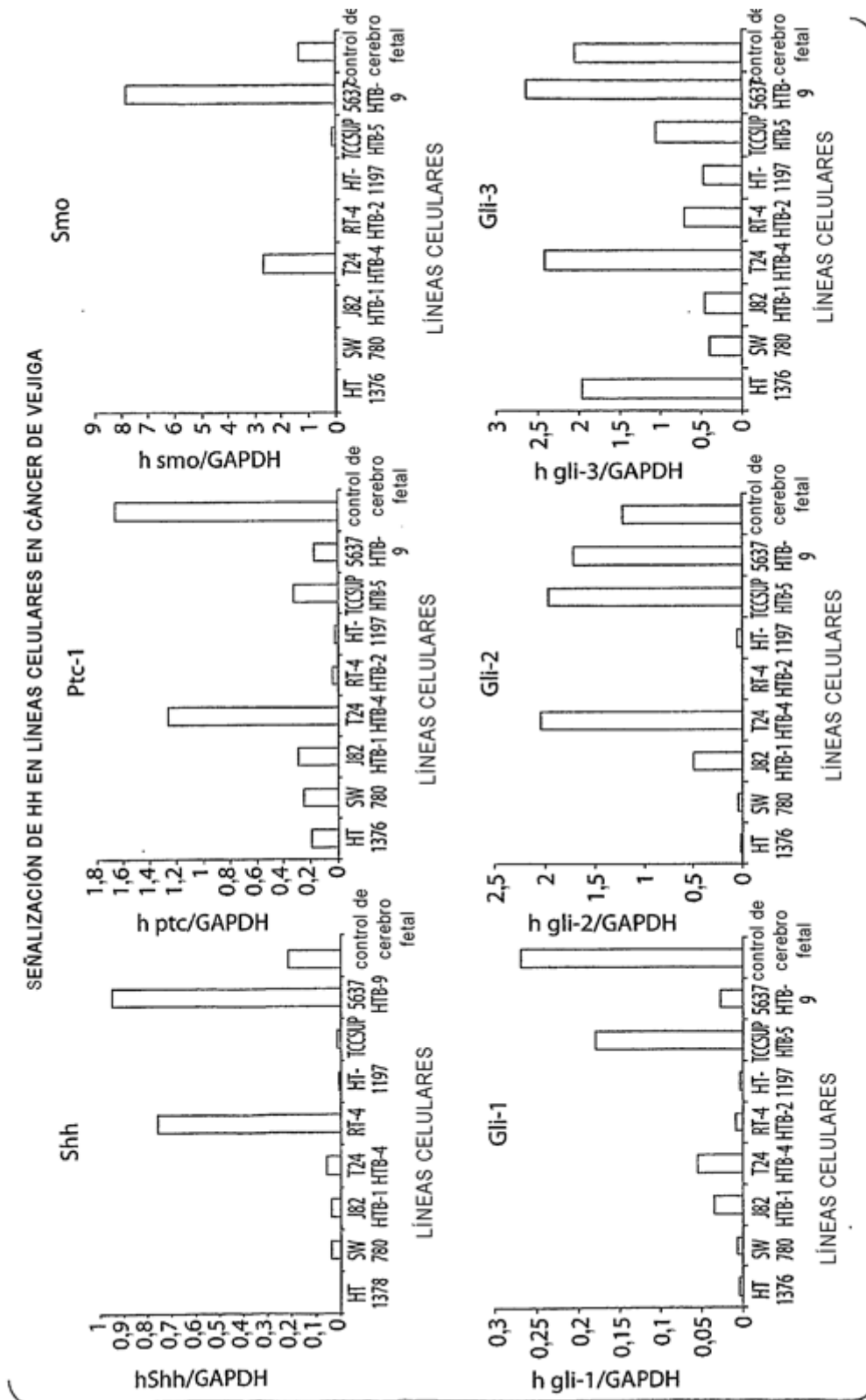
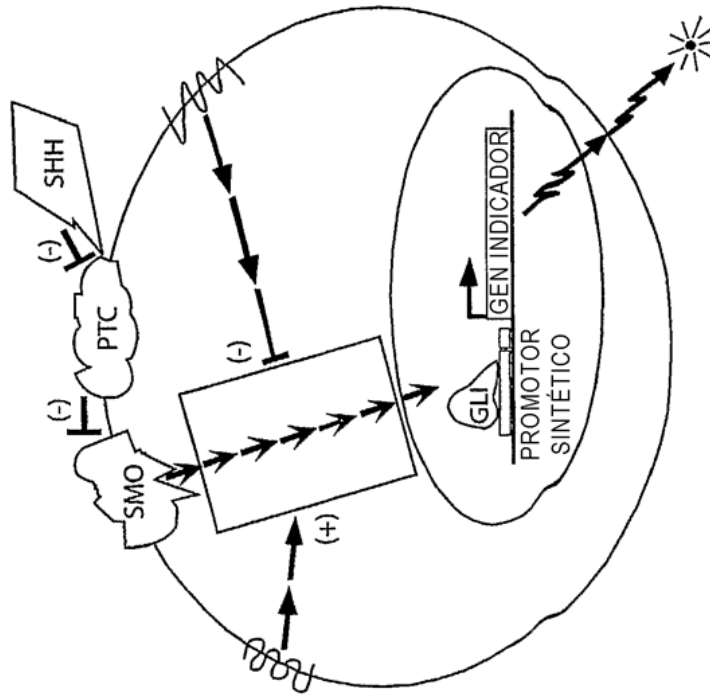


Fig. 18



EFICACIA IN VITRO
ENSAYO DE Gli-luc

LÍNEA CELULAR DE FIBROBLASTOS S12 CON INDICADOR DE LUCIFERASA



B. Diagrama de flujo

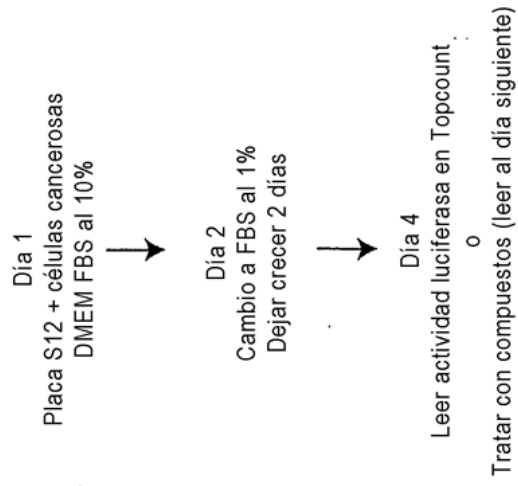


Fig. 20

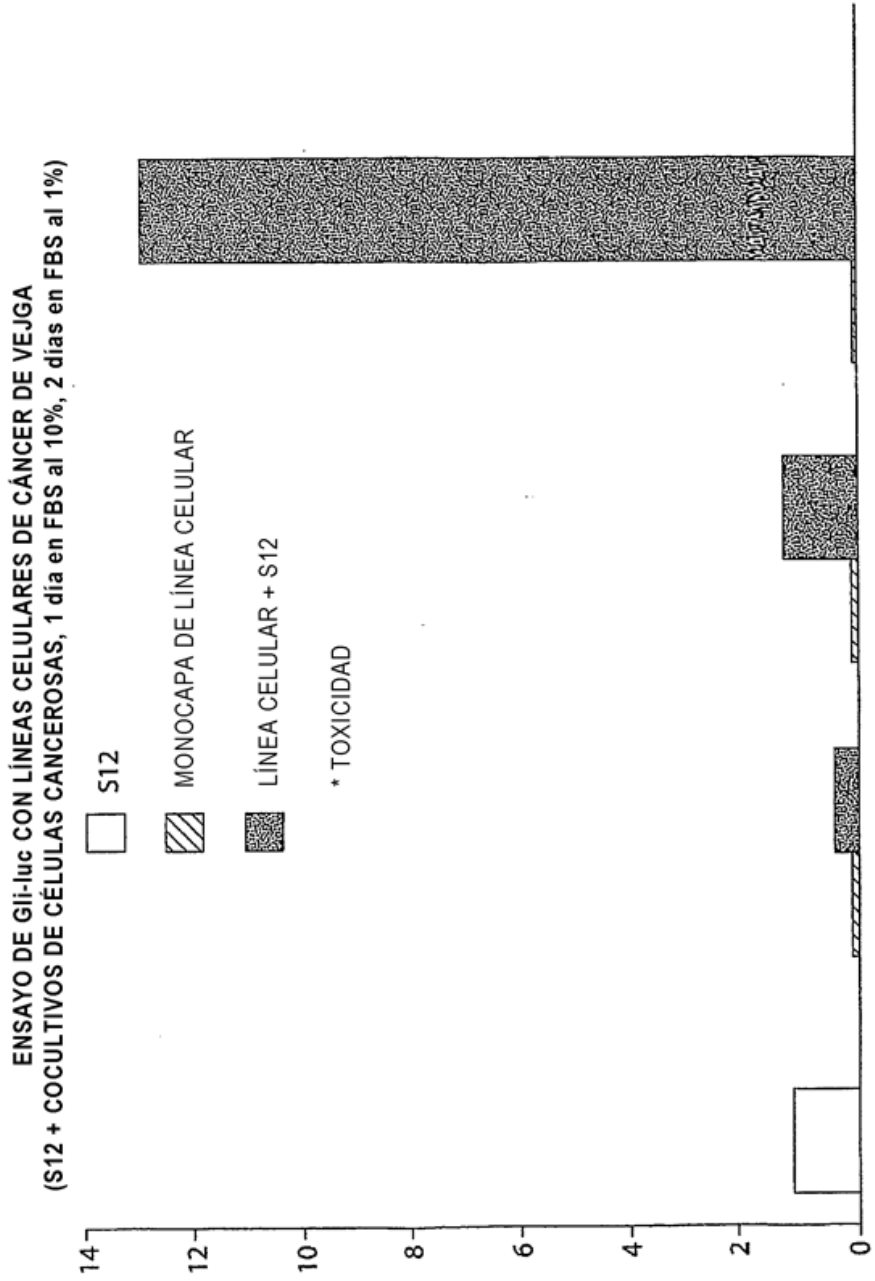


Fig.21

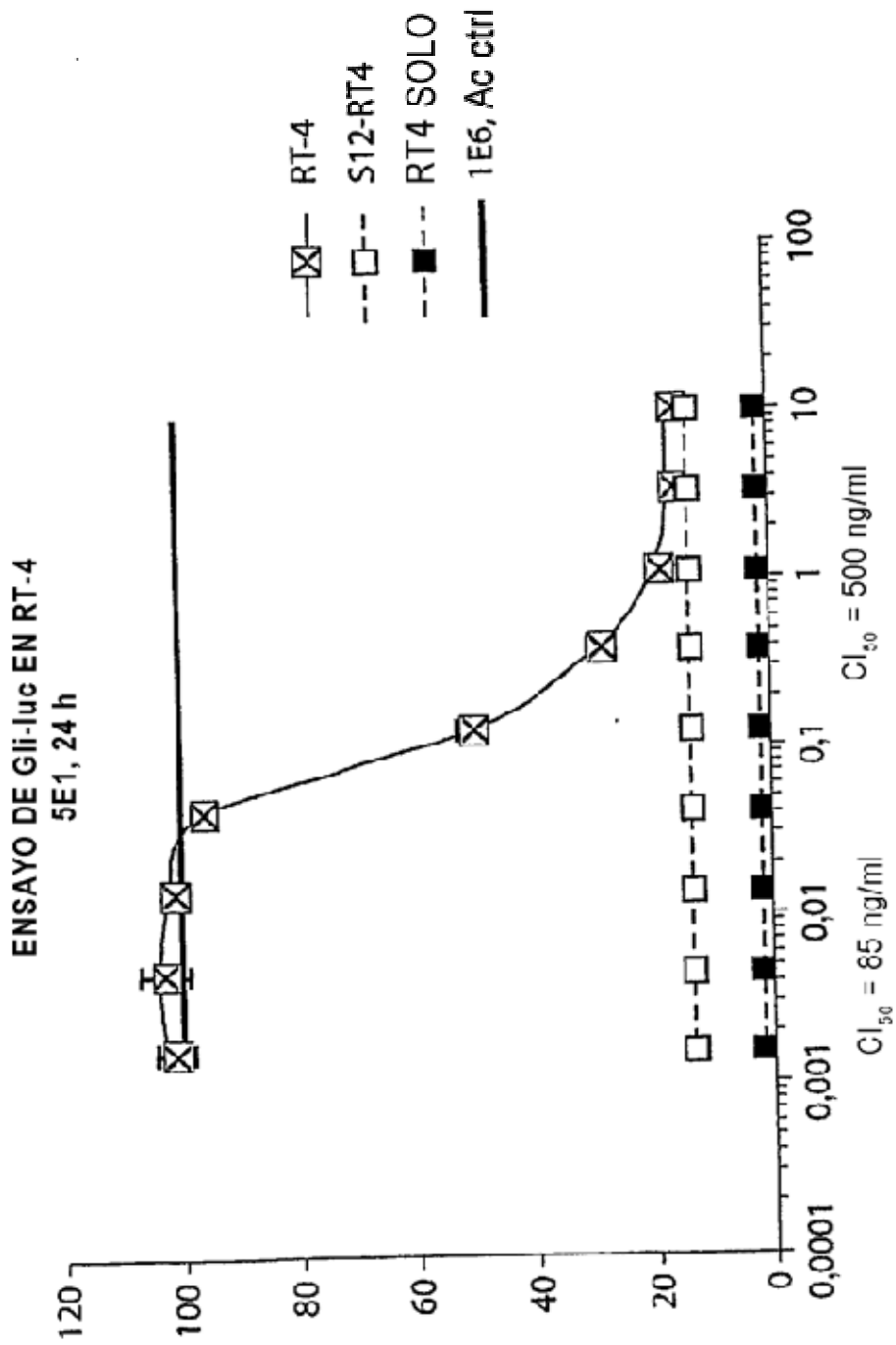


Fig. 22

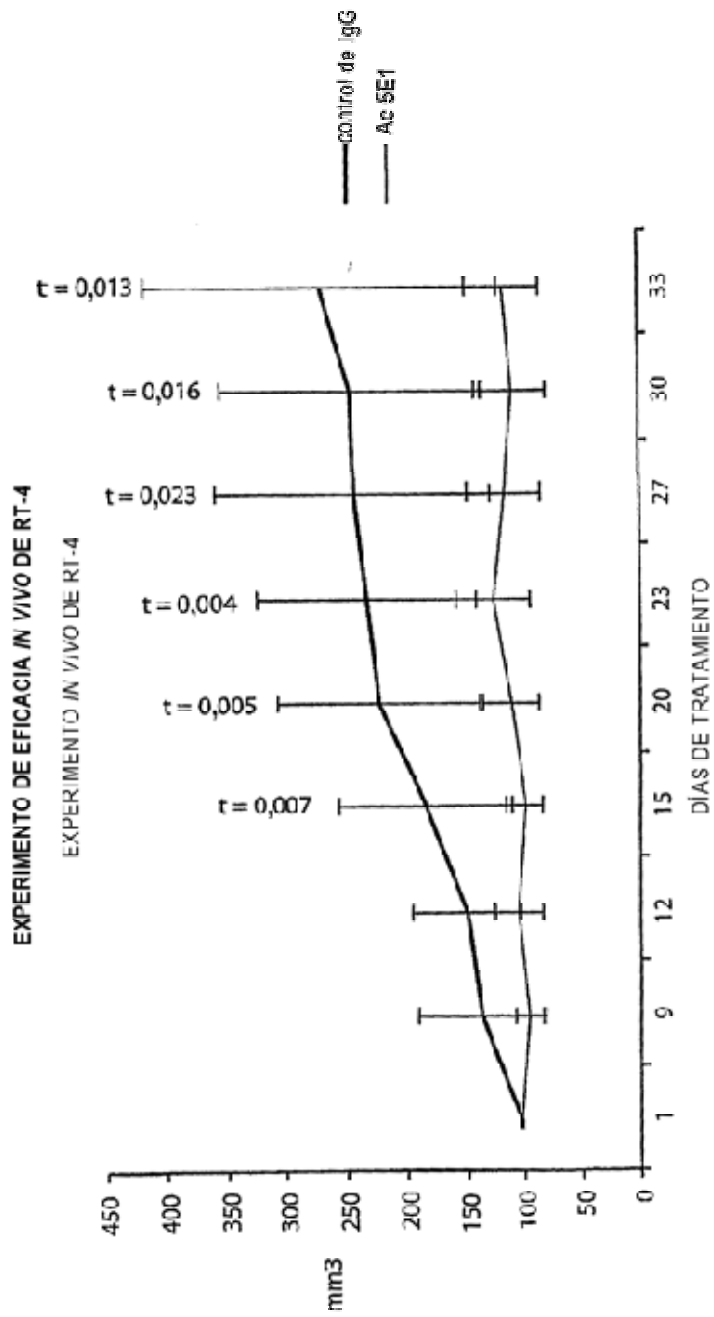


Fig. 23

EXPERIMENTO DE EFICACIA IN VIVO DE RT-4

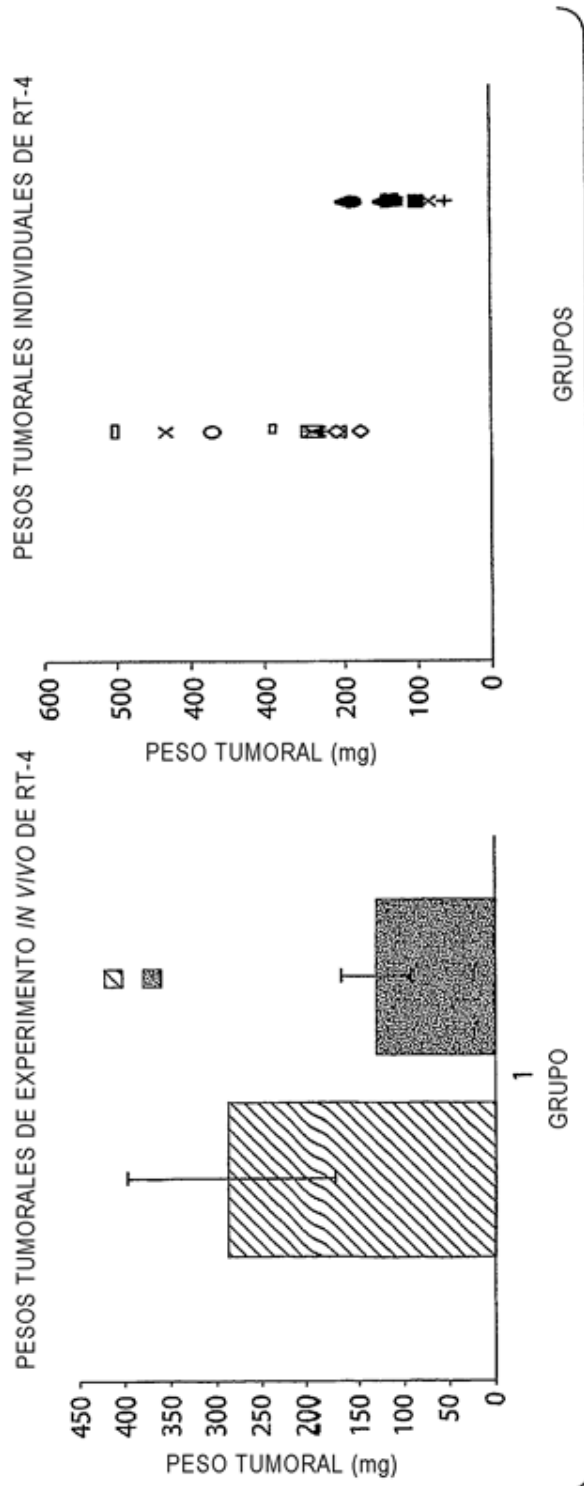


Fig. 24

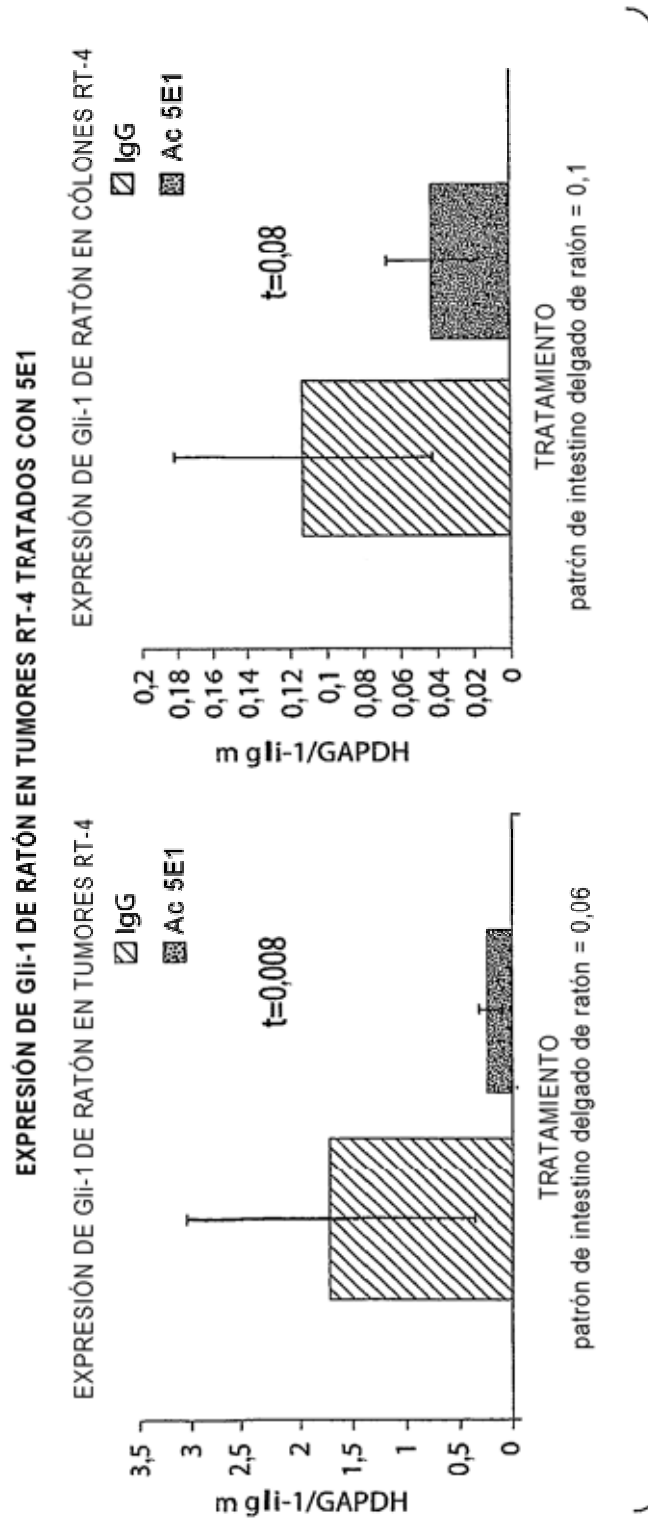


Fig. 25

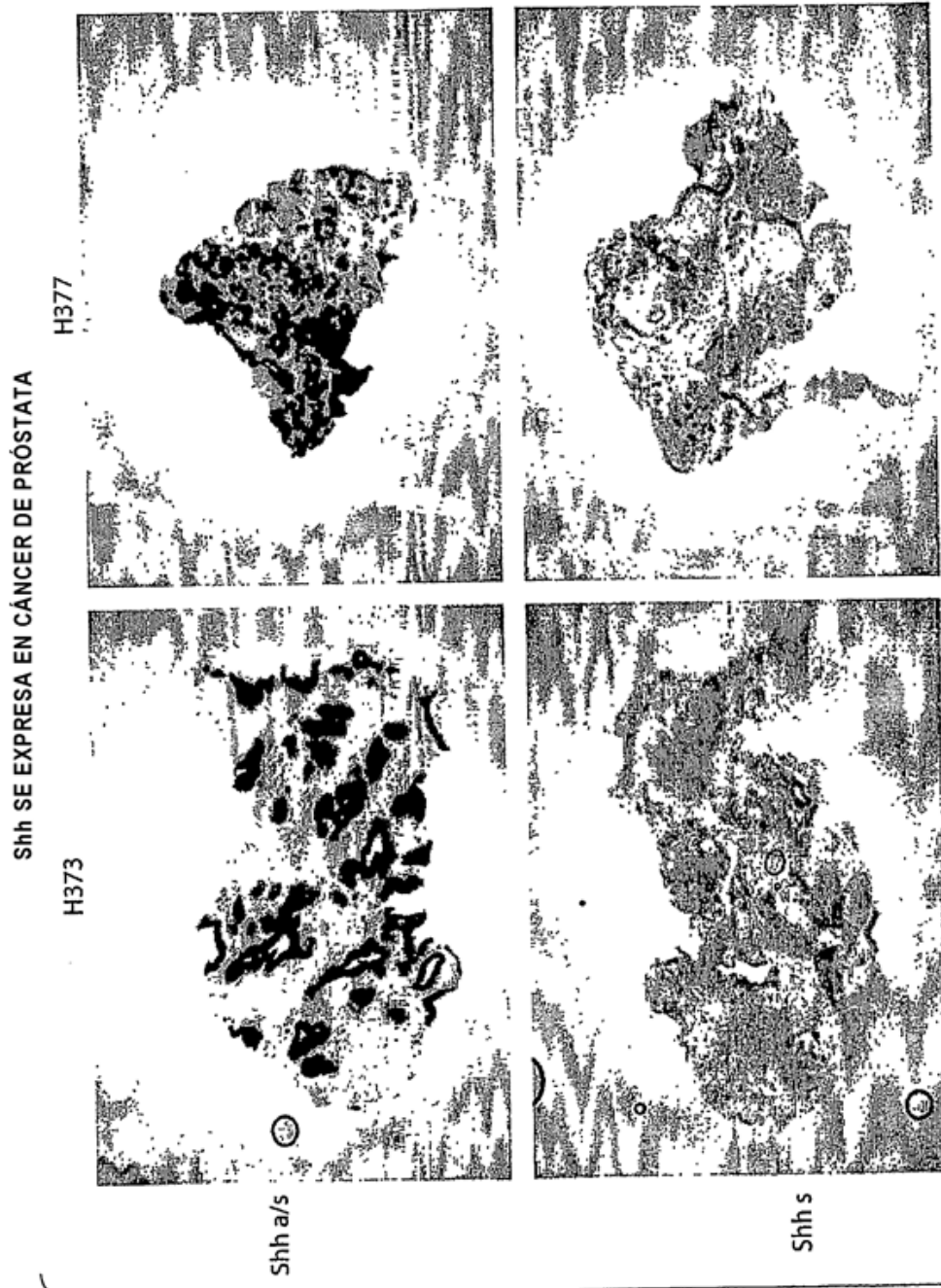


Fig. 26

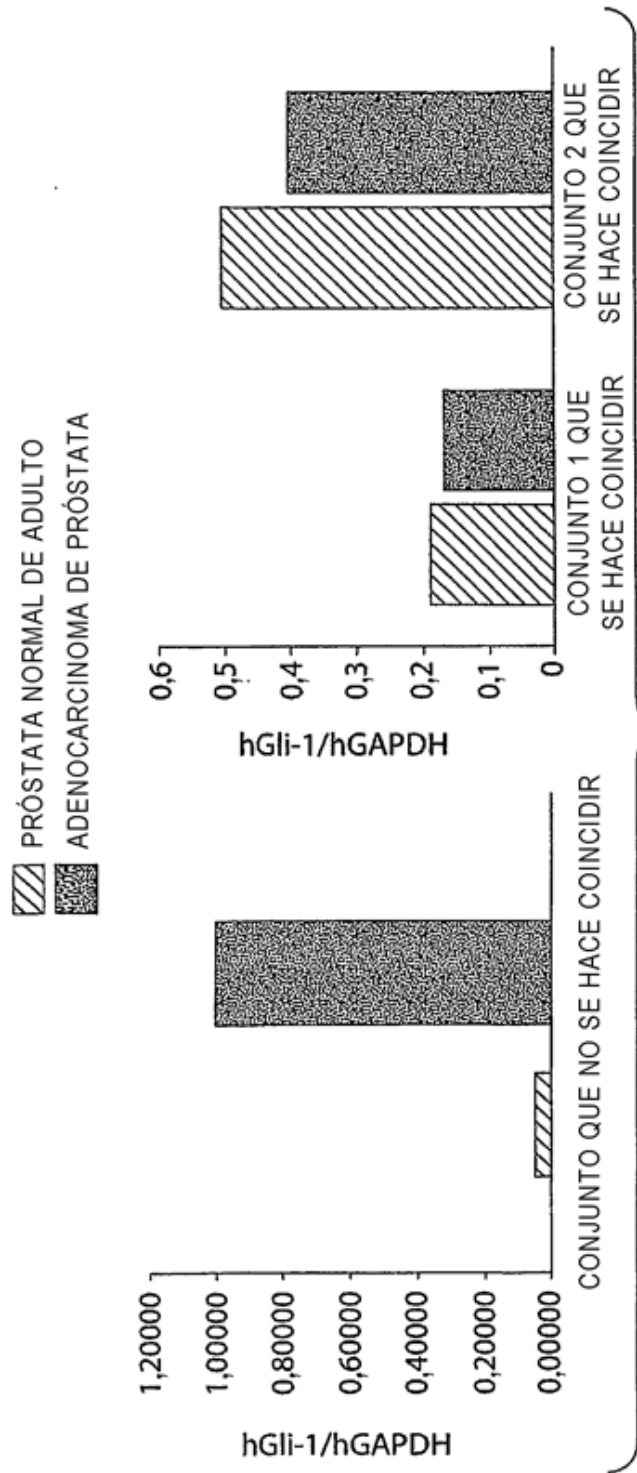


Fig. 27

SEÑALIZACIÓN DE HH EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA
(1 día en FBS al 10%, 2 días en FBS al 1%)

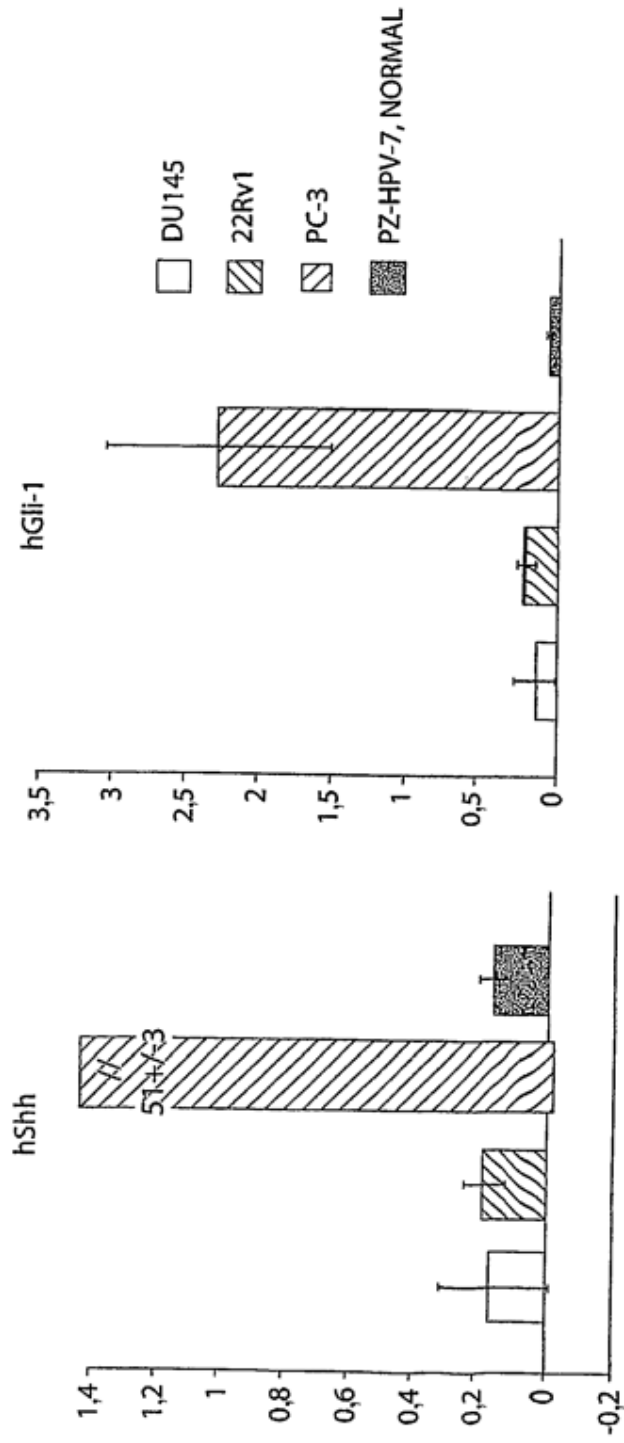


Fig. 28

ENSAYO DE Glic-1uc CON LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA
(COCULTIVOS DE S12 + CÉLULAS CANCEROSAS, 1 día en FBS al 10%, 2 días en FBS al 1%)

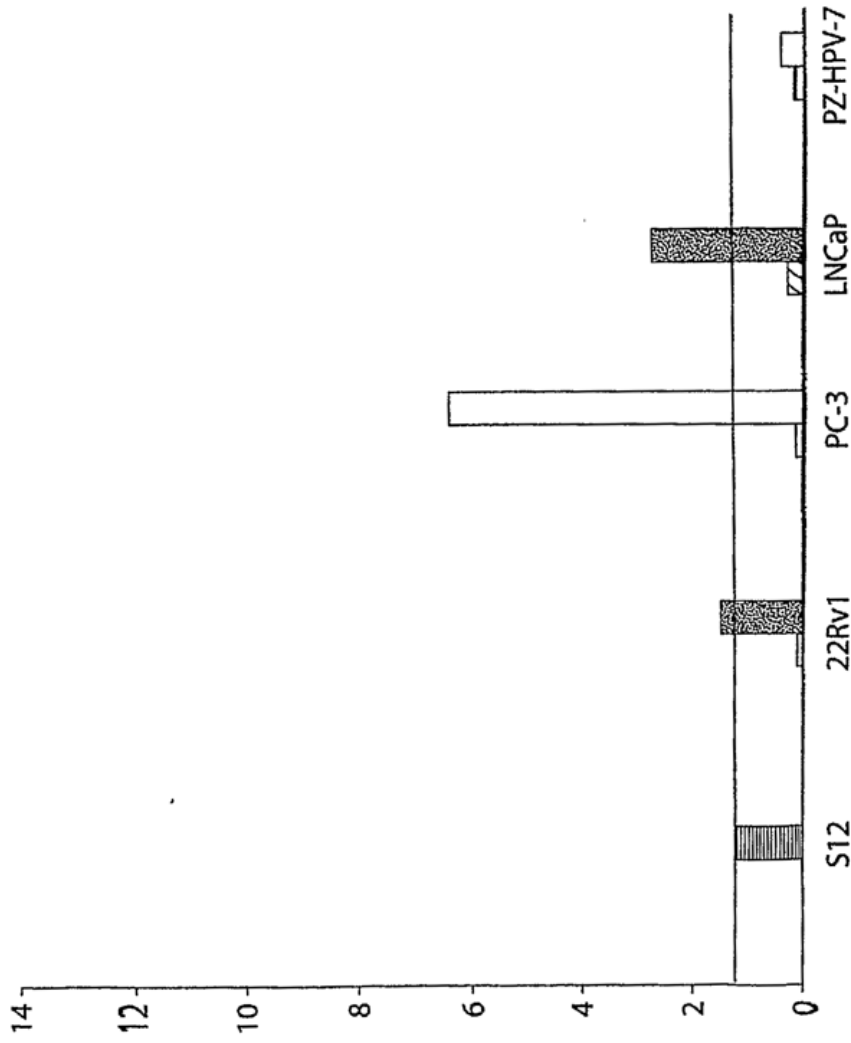


Fig. 29

EFICACIA *IN VITRO*
 INHIBICIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE HEDGEHOG POR ANTAGONISTAS DE HEDGEHOG
 (Gli-luc, 24 h)

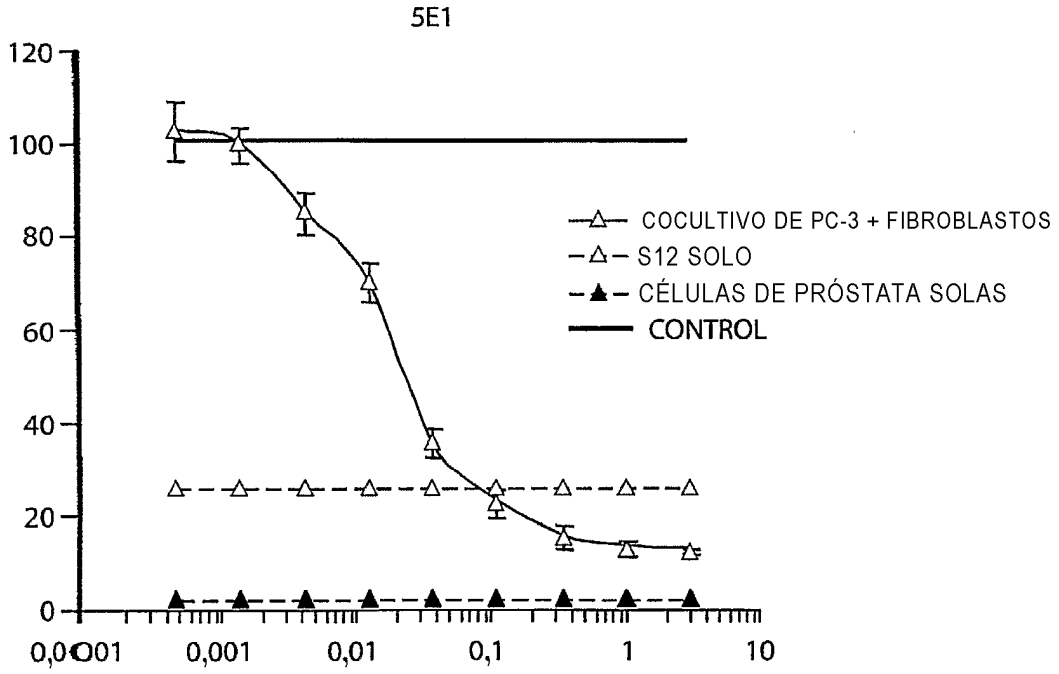


Fig. 30

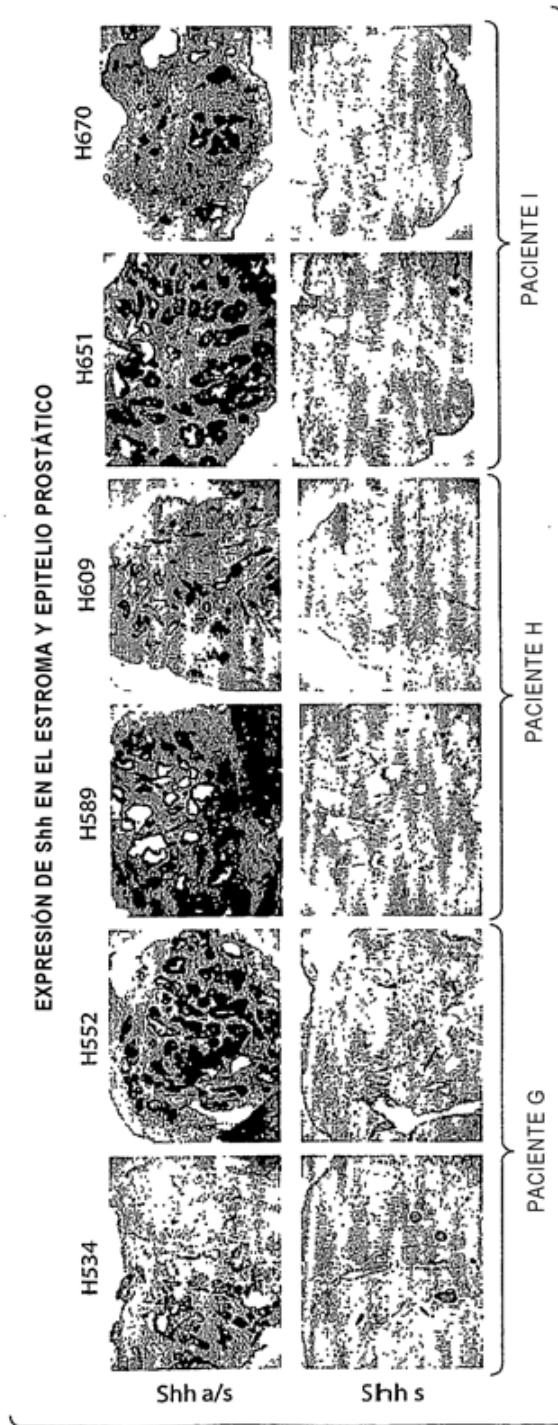


Fig. 31

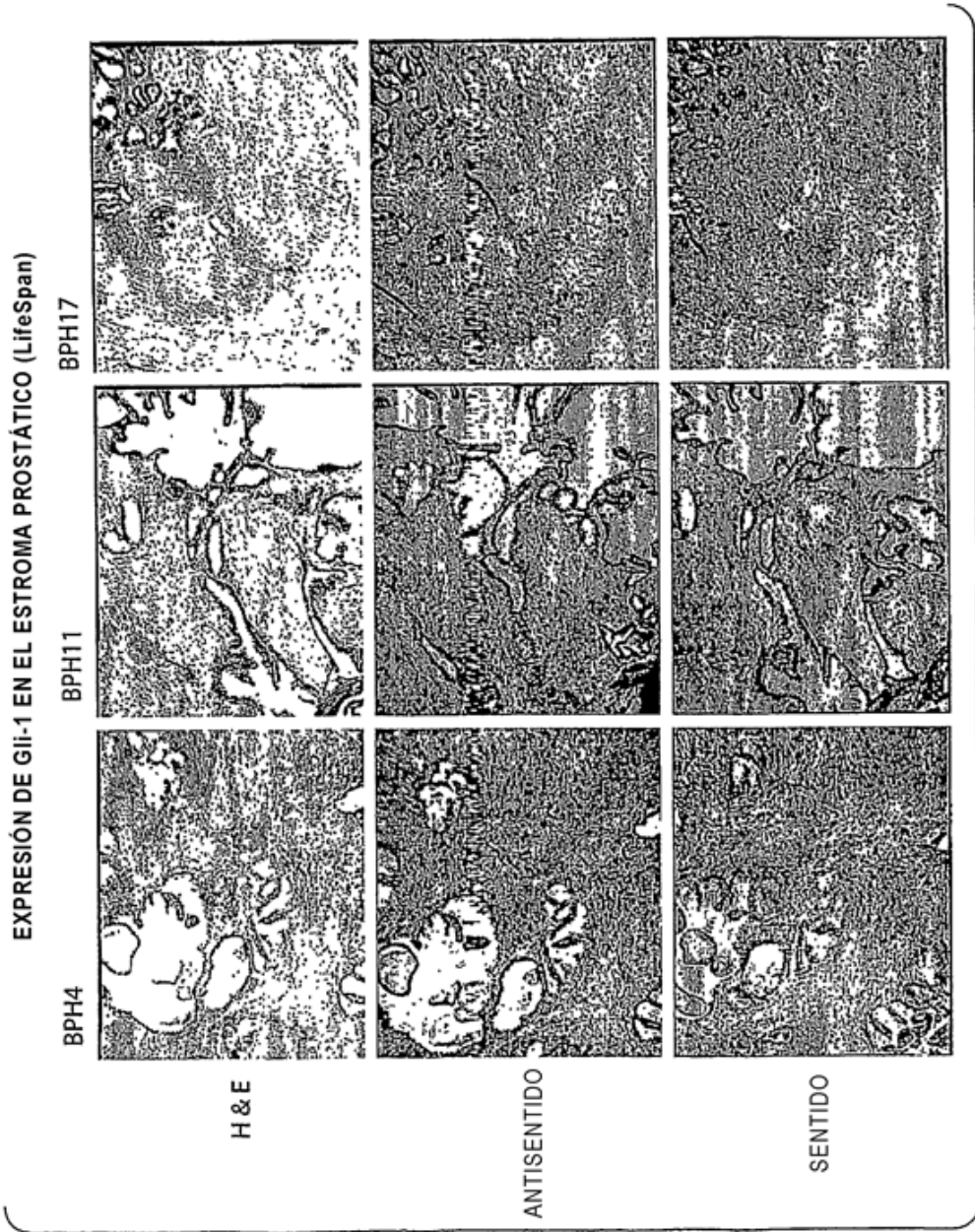


Fig. 32

GRADIENTE DE Shh PRÓXIMO-DISTAL EN PRÓSTATA NORMAL

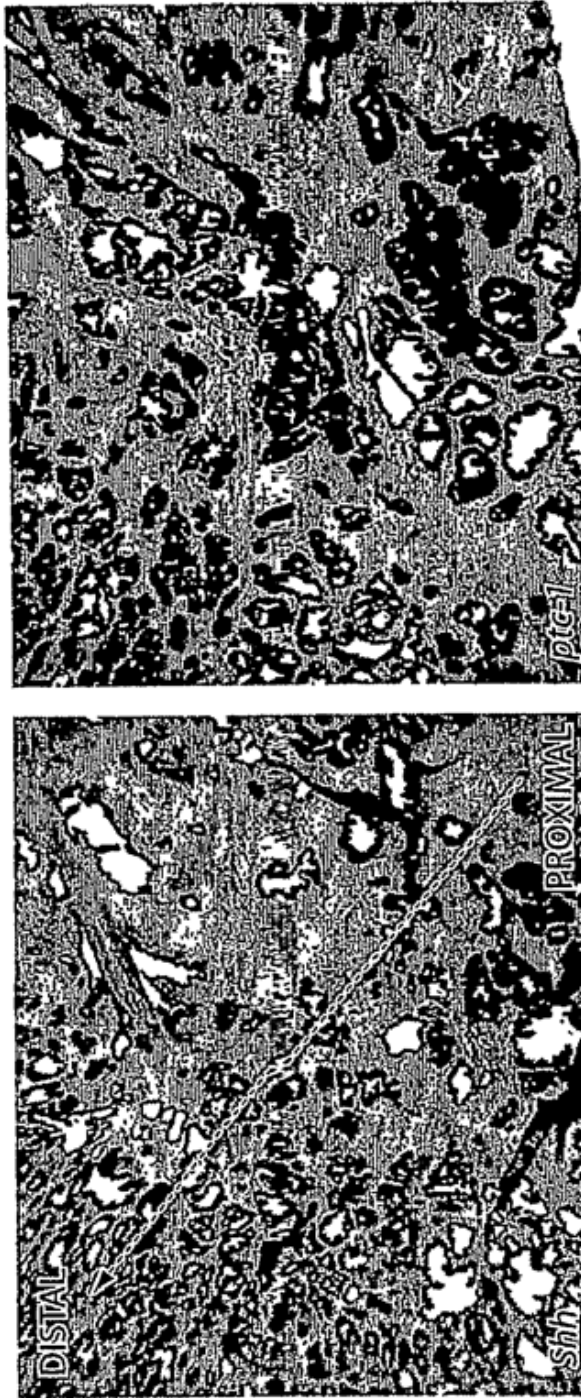


Fig. 33

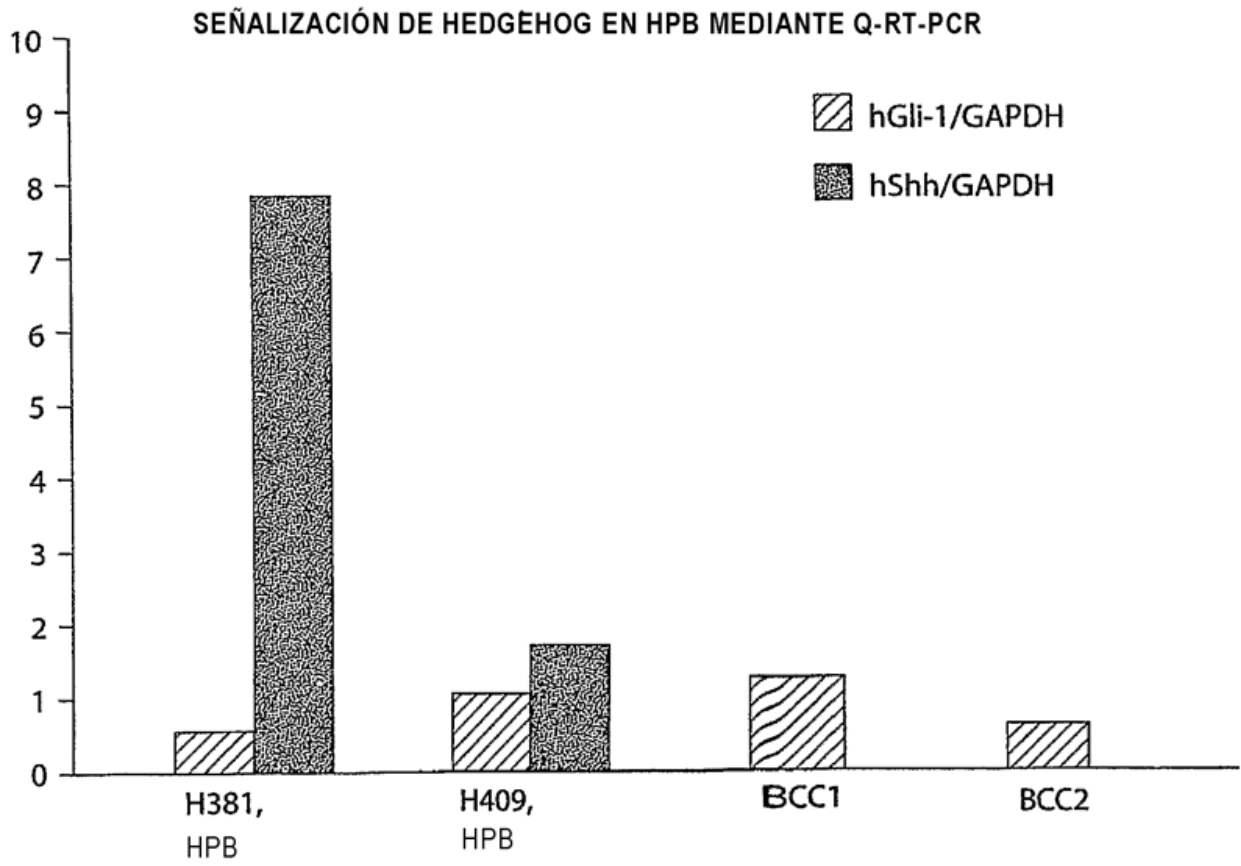


Fig. 34

SEÑALIZACIÓN DE HEDGEHOG DE ALTO NIVEL EN LÍNEAS CELULARES CON HPB

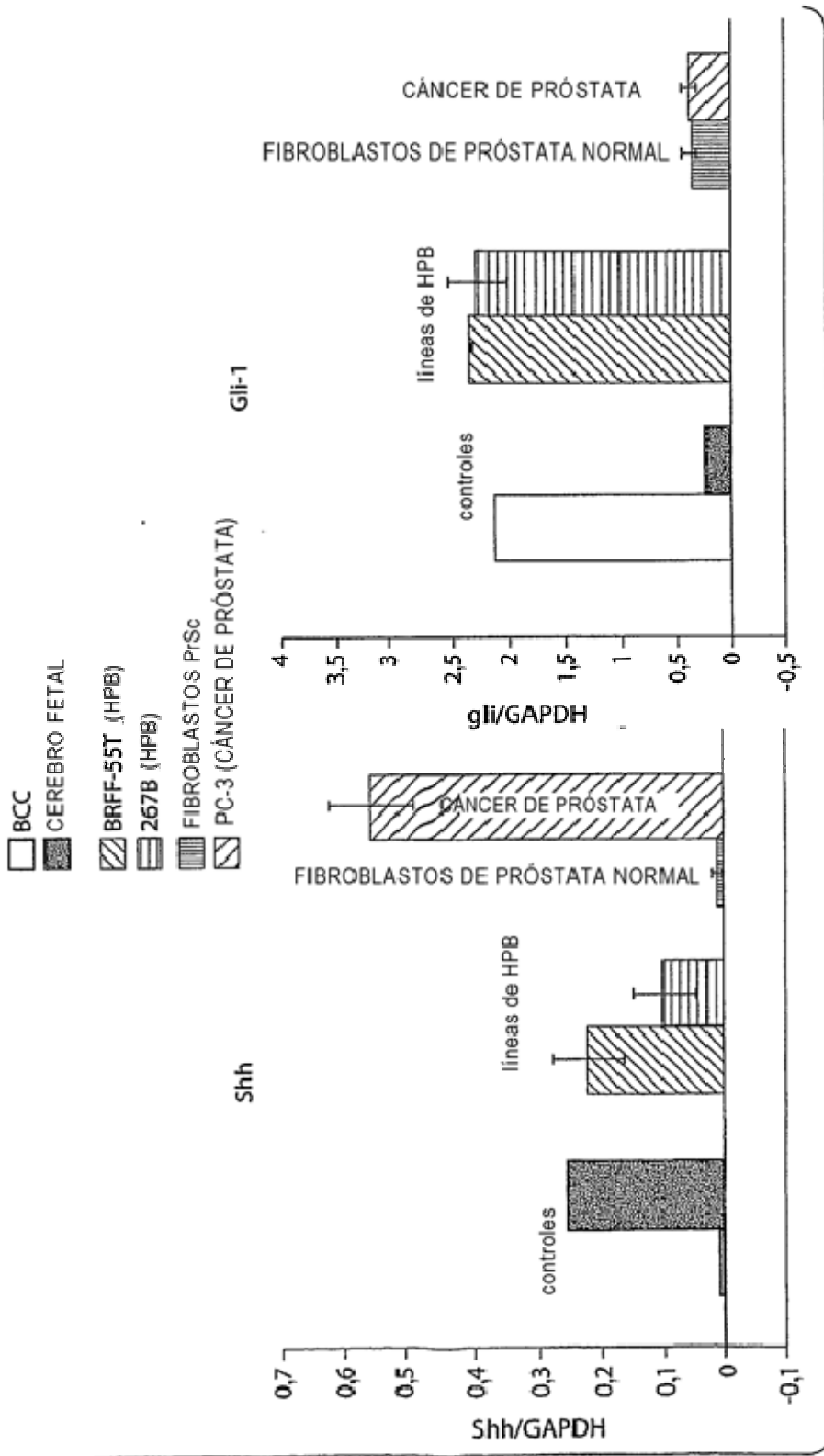


Fig. 35

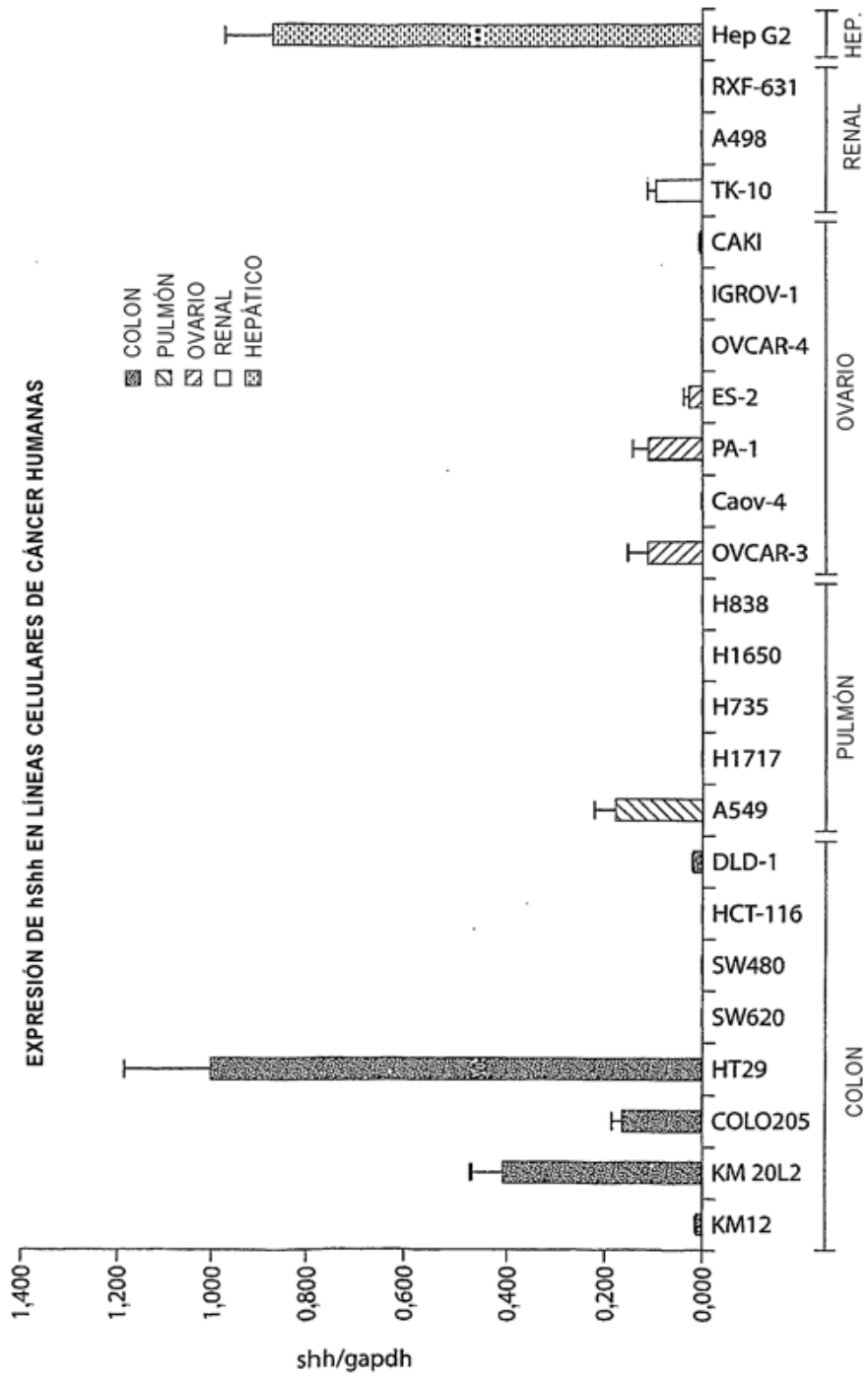


Fig. 36

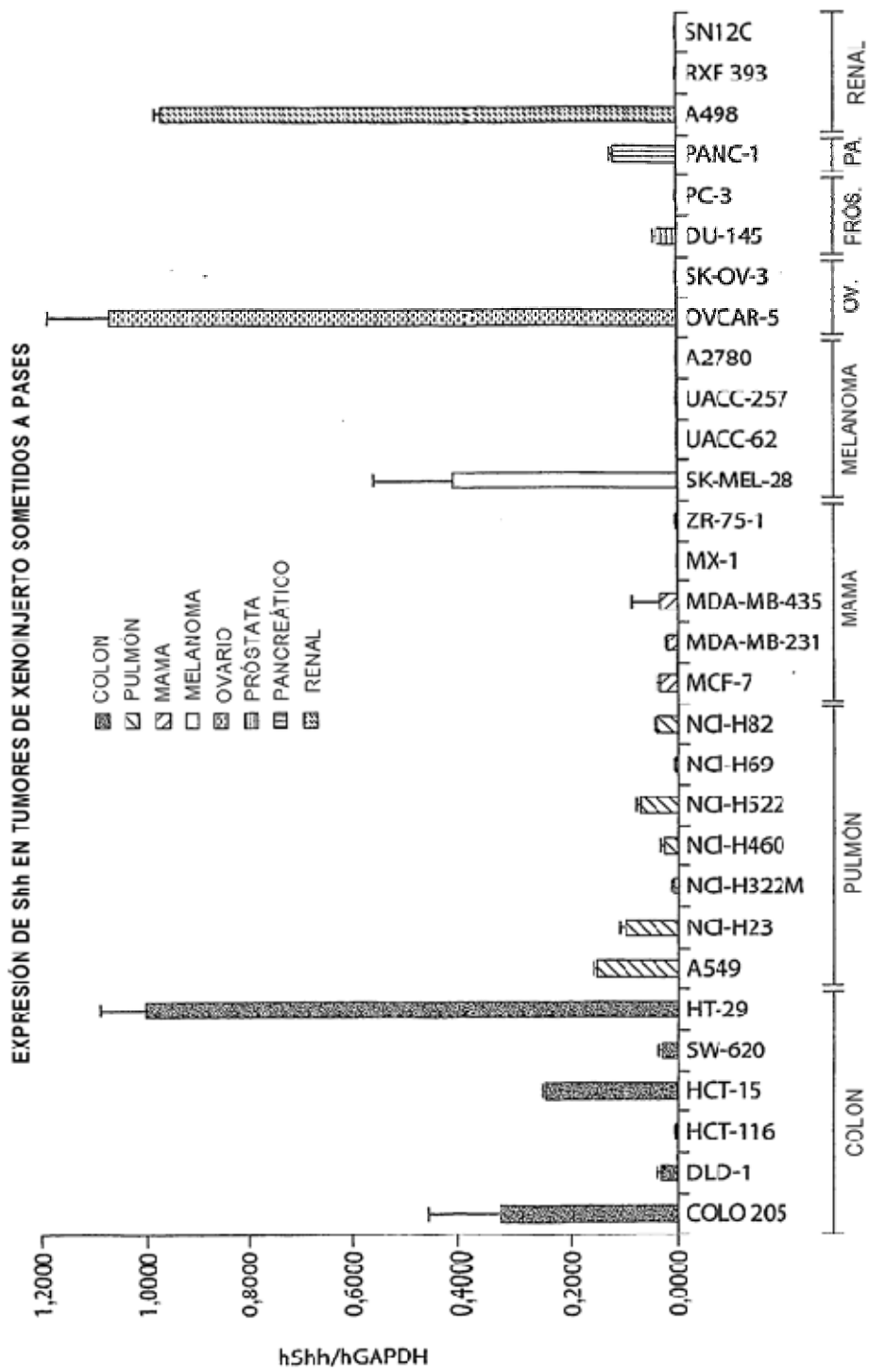


Fig. 37

LA PROTEÍNA Hh SE EXPRESA EN TEJIDOS HUMANOS NORMALES

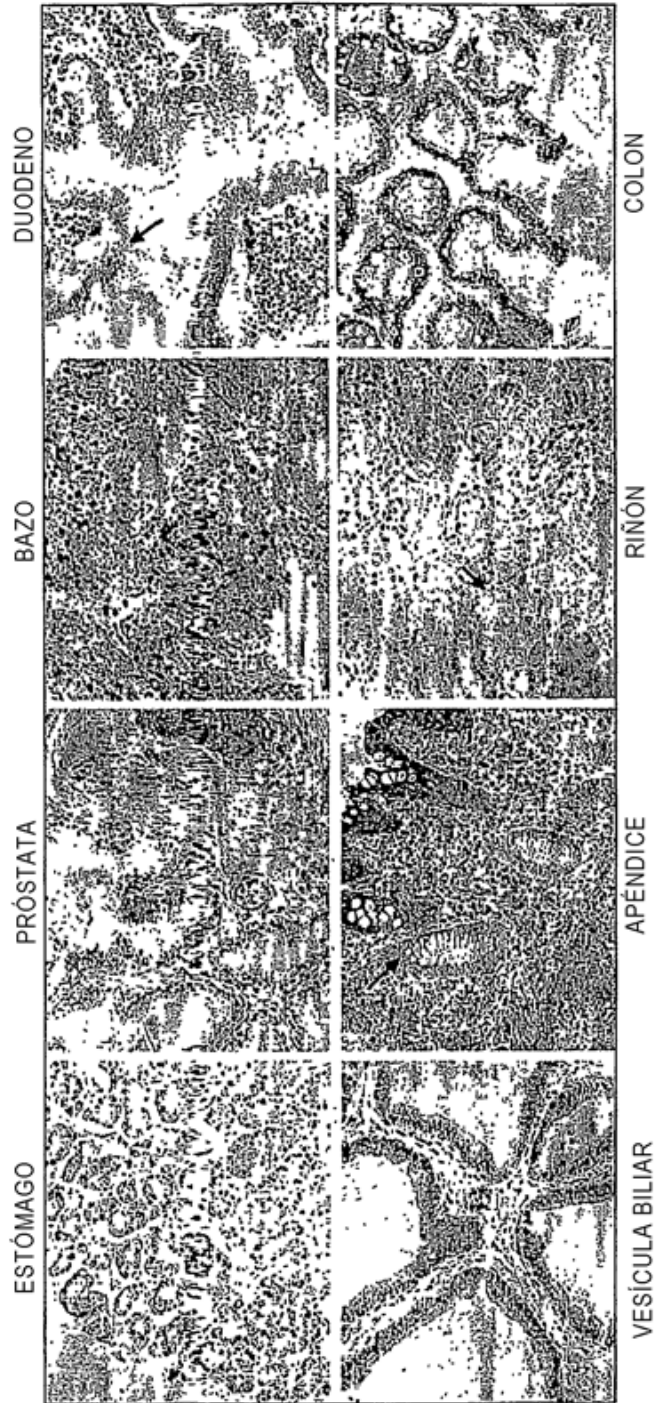


Fig. 38

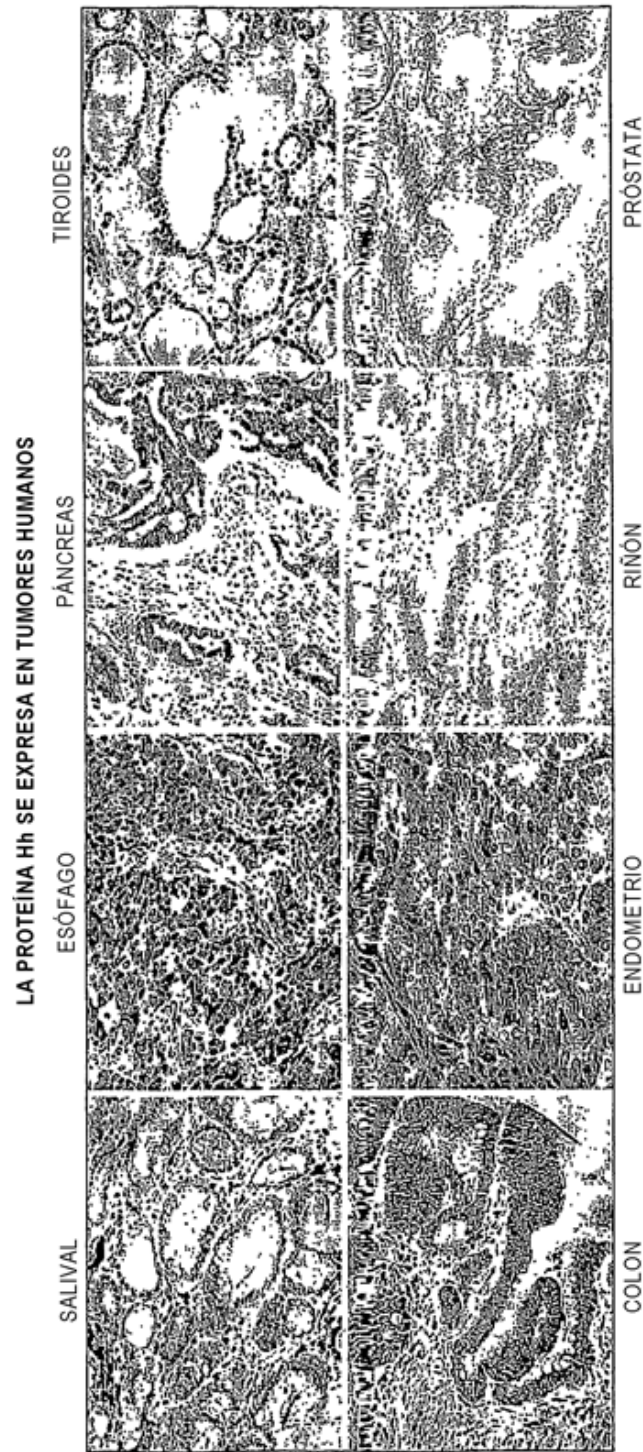


Fig. 39

LA PROTEÍNA HEDGEHOG SE EXPRESA EN CÁNCER DE PÁNCREAS

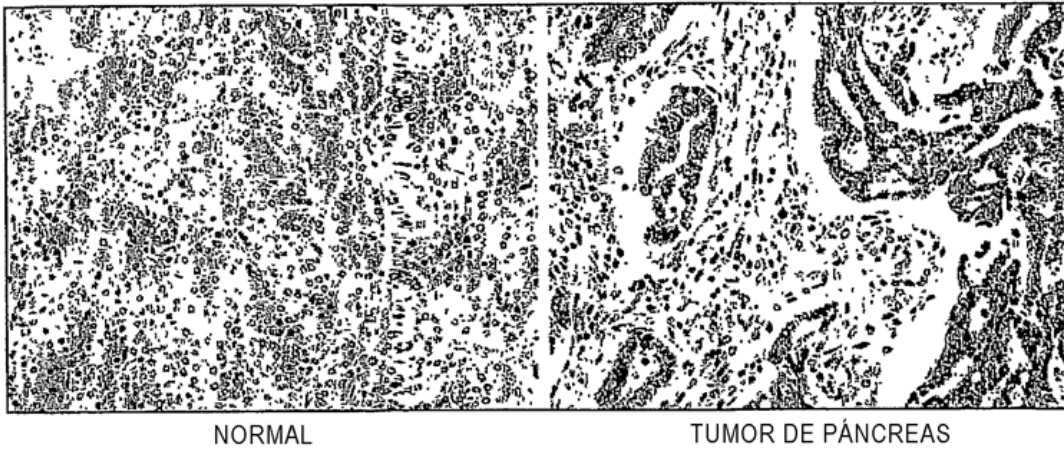


Fig. 40

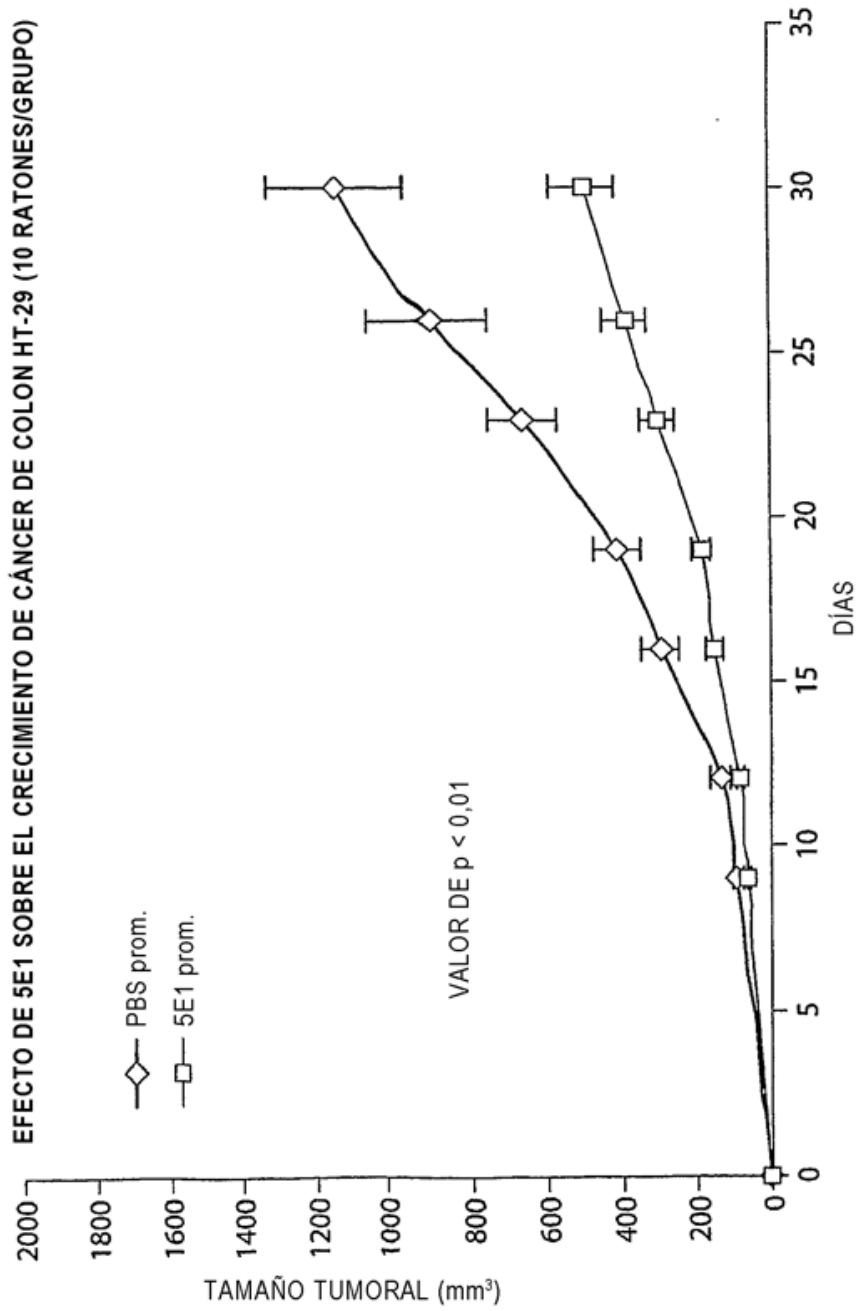


Fig. 41

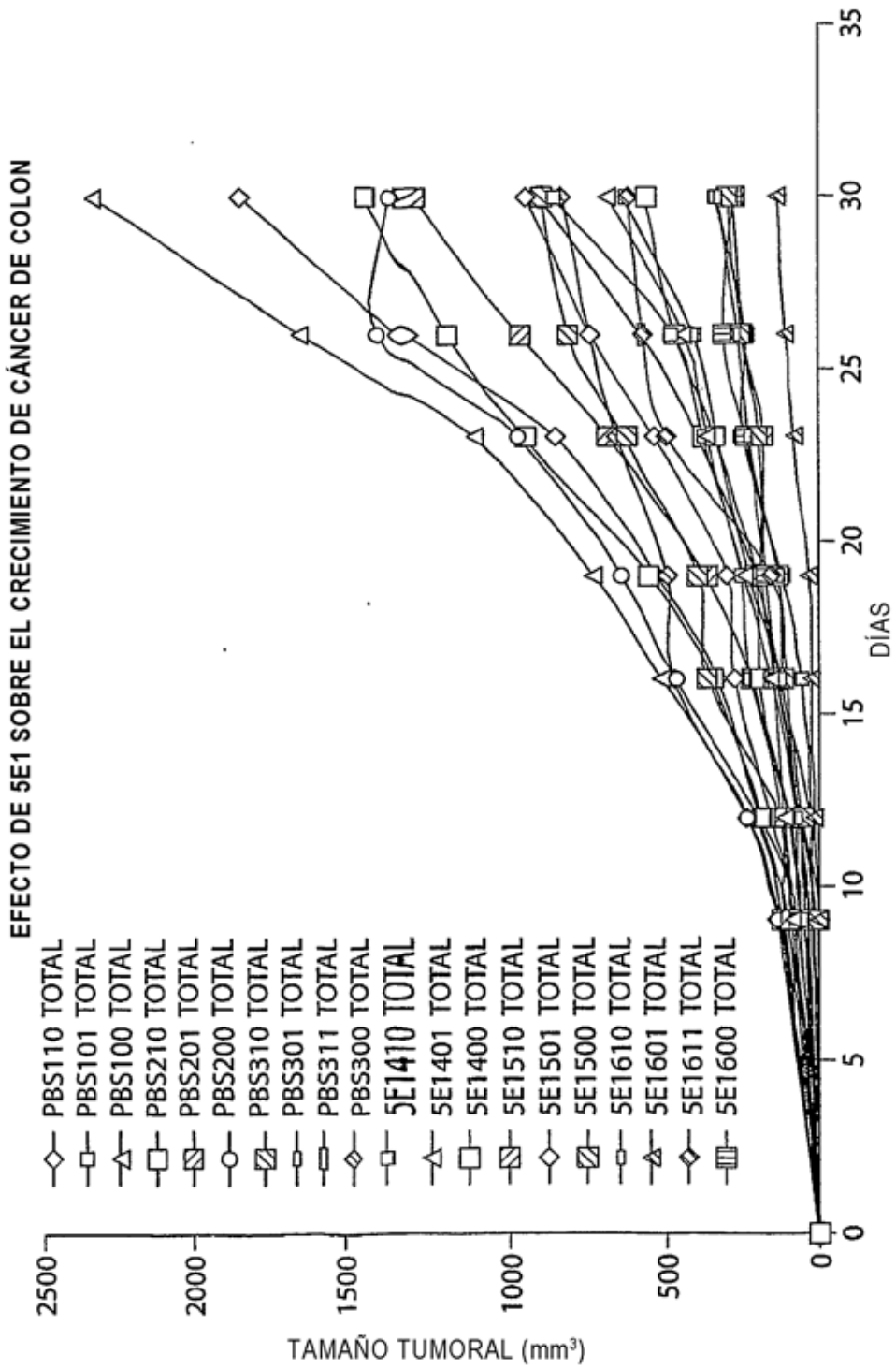


Fig. 42

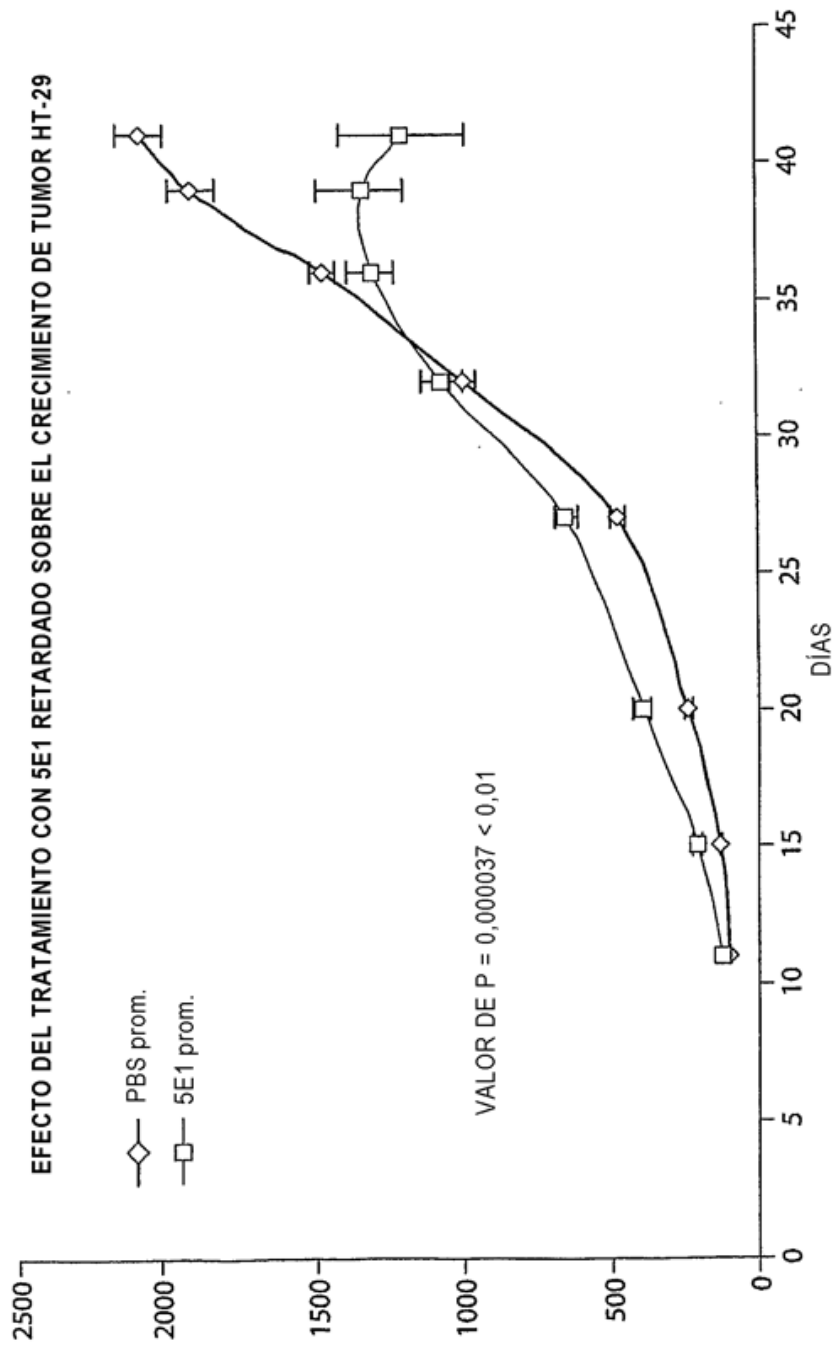


Fig. 43

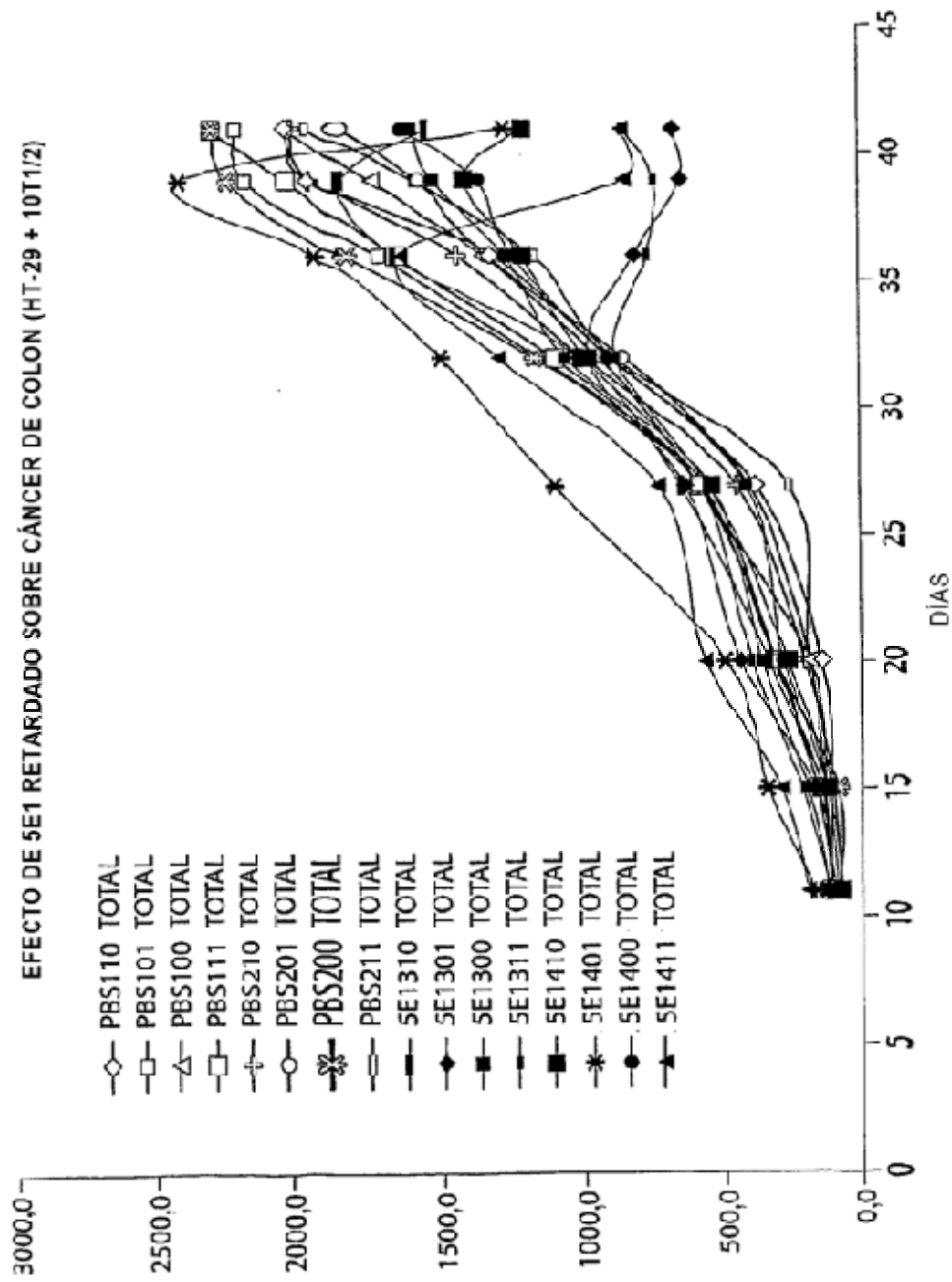
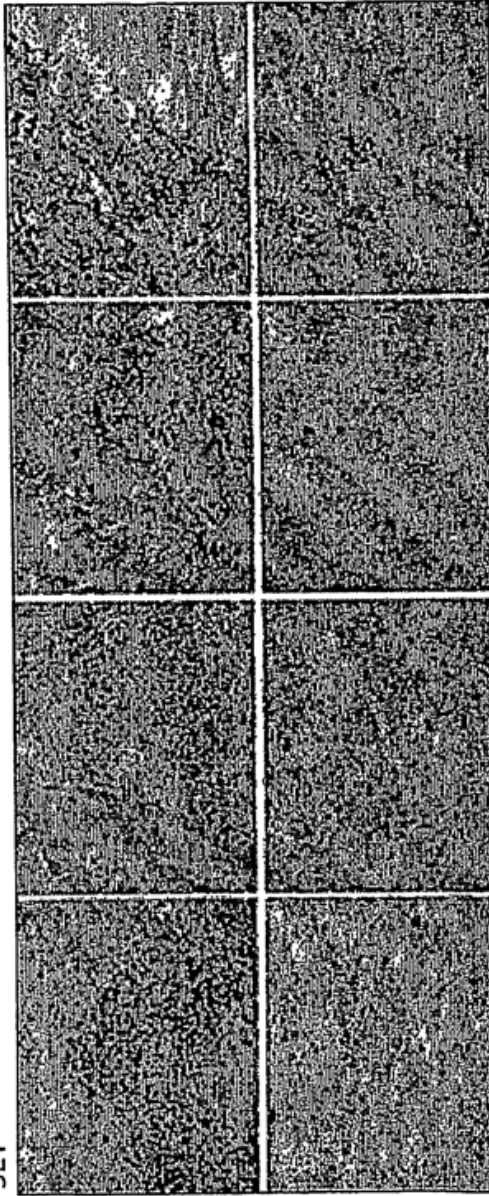


Fig. 44

INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN TUMORES HT-29/10T1/2

5E1



CONTROL

Fig. 45

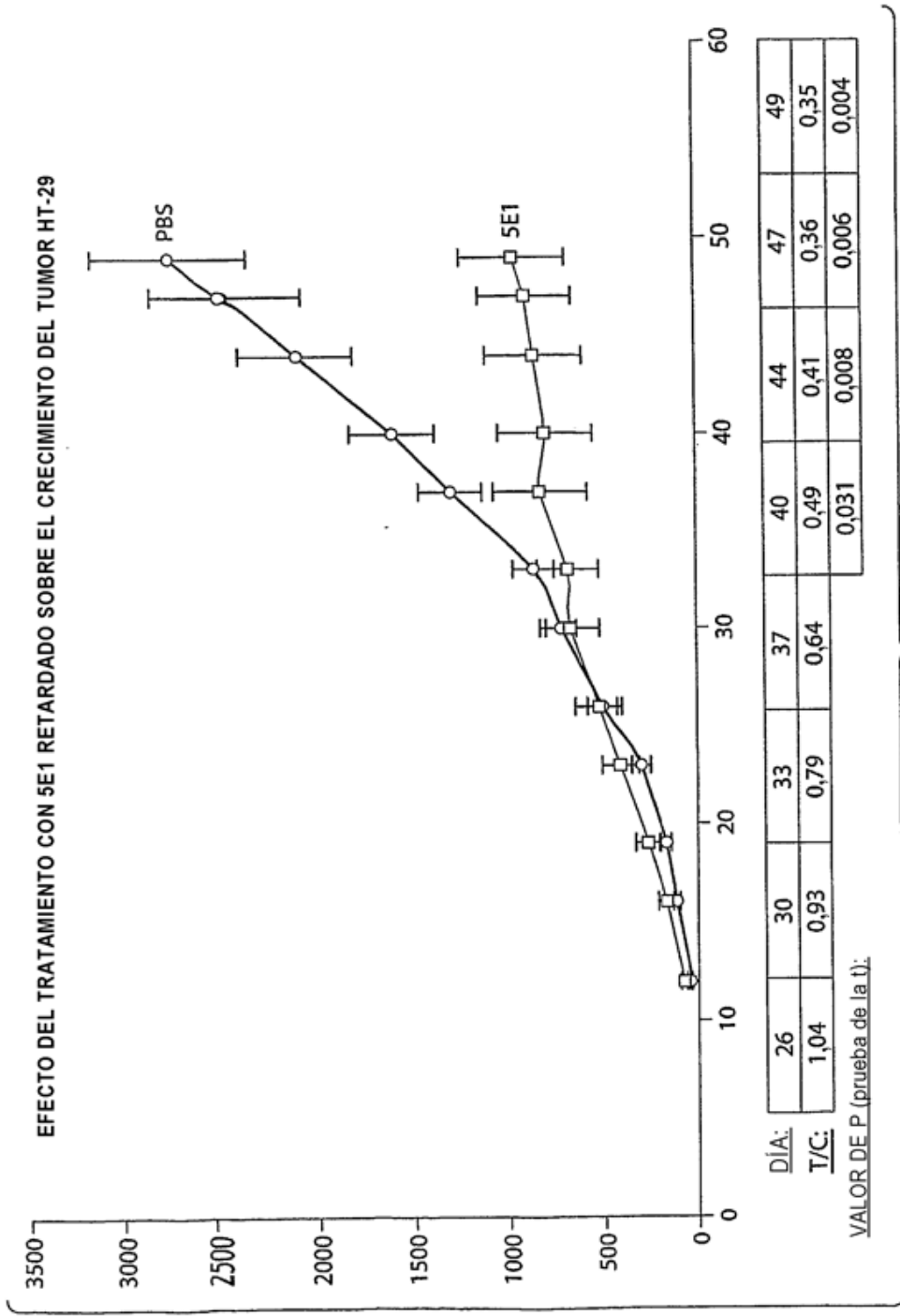


Fig. 46

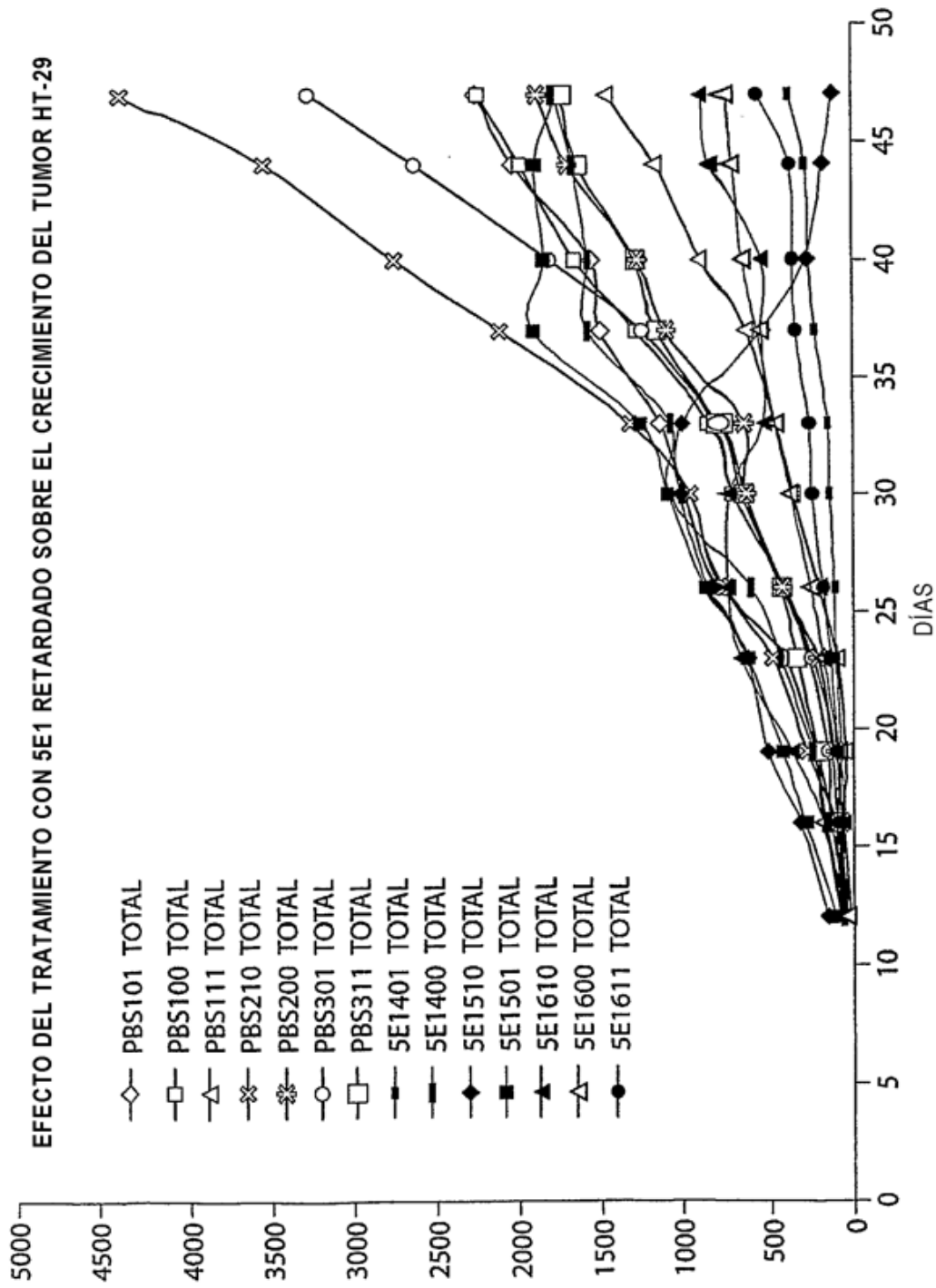


Fig. 47

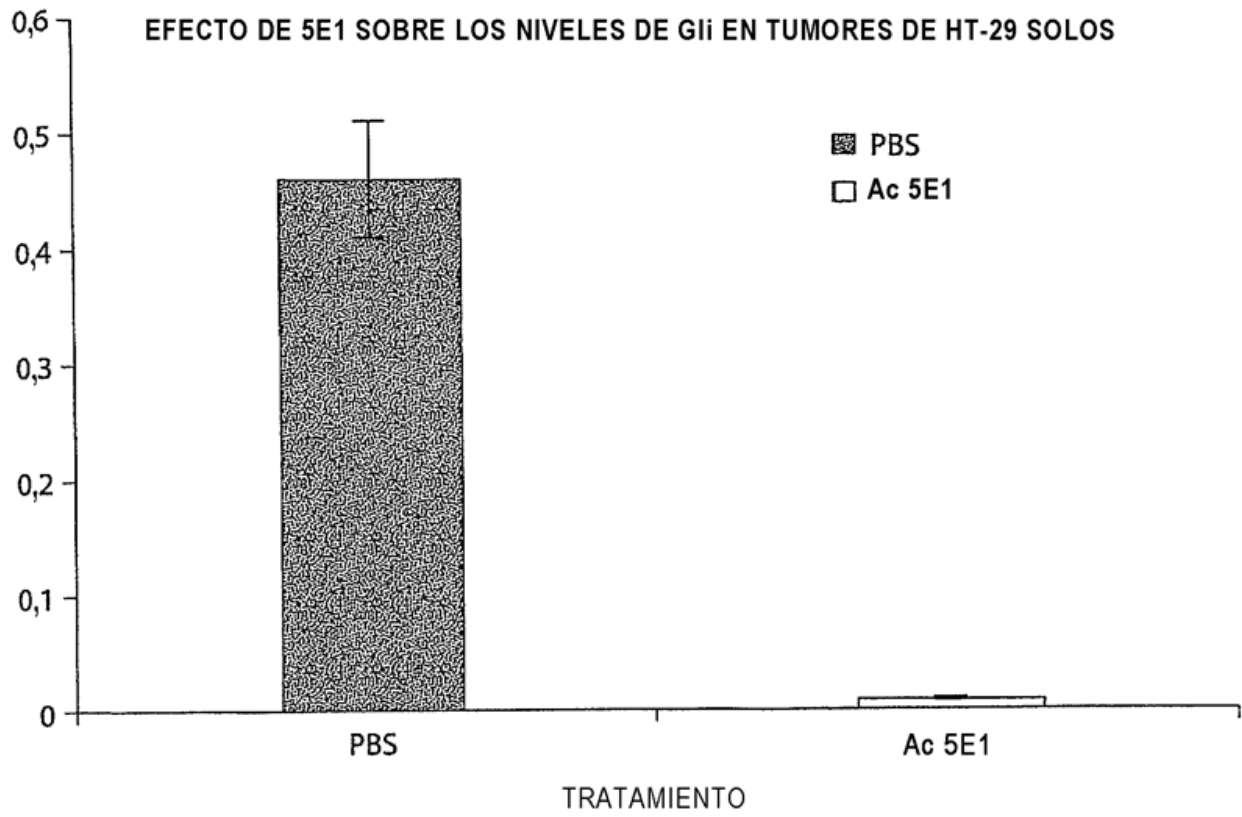


Fig. 48

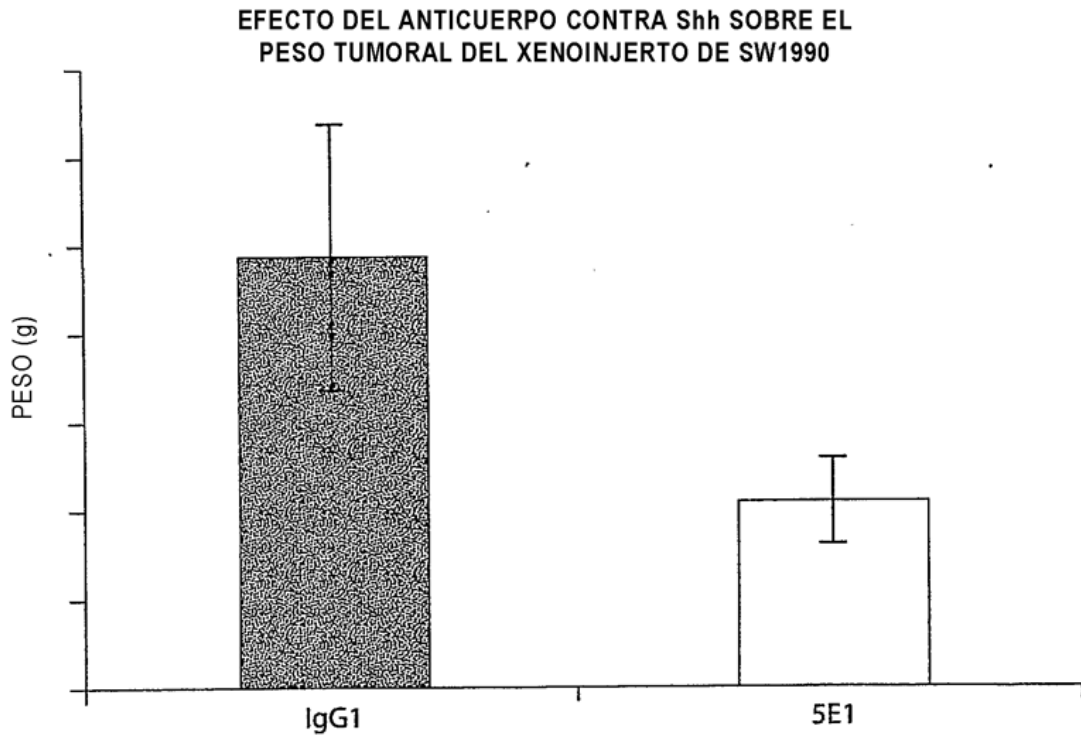


Fig. 49

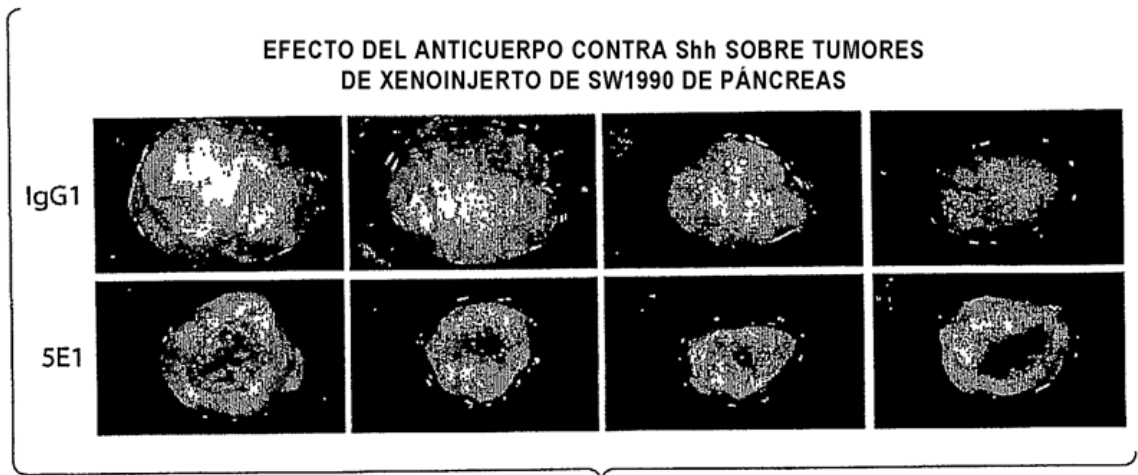


Fig. 50

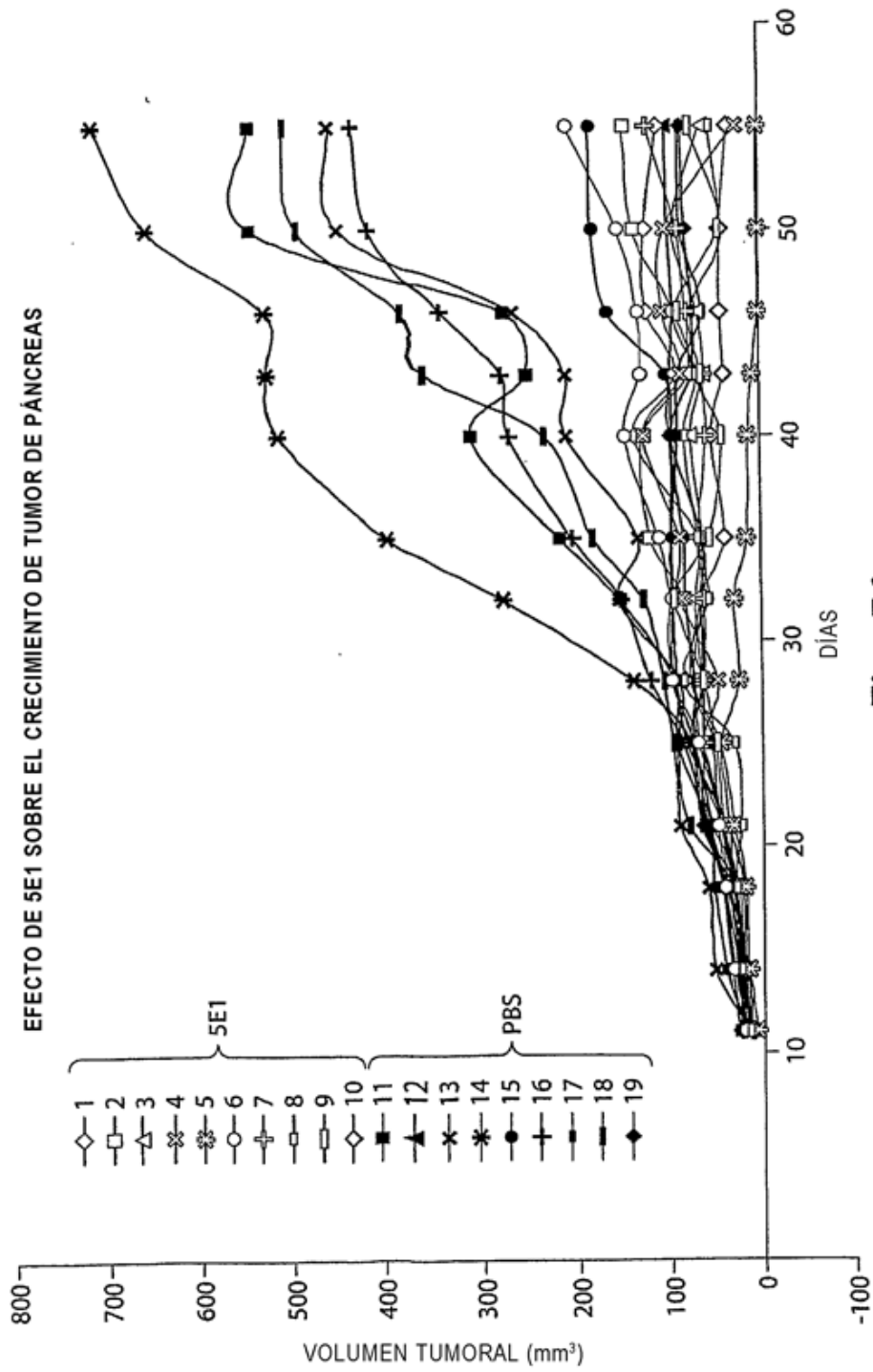


Fig. 51

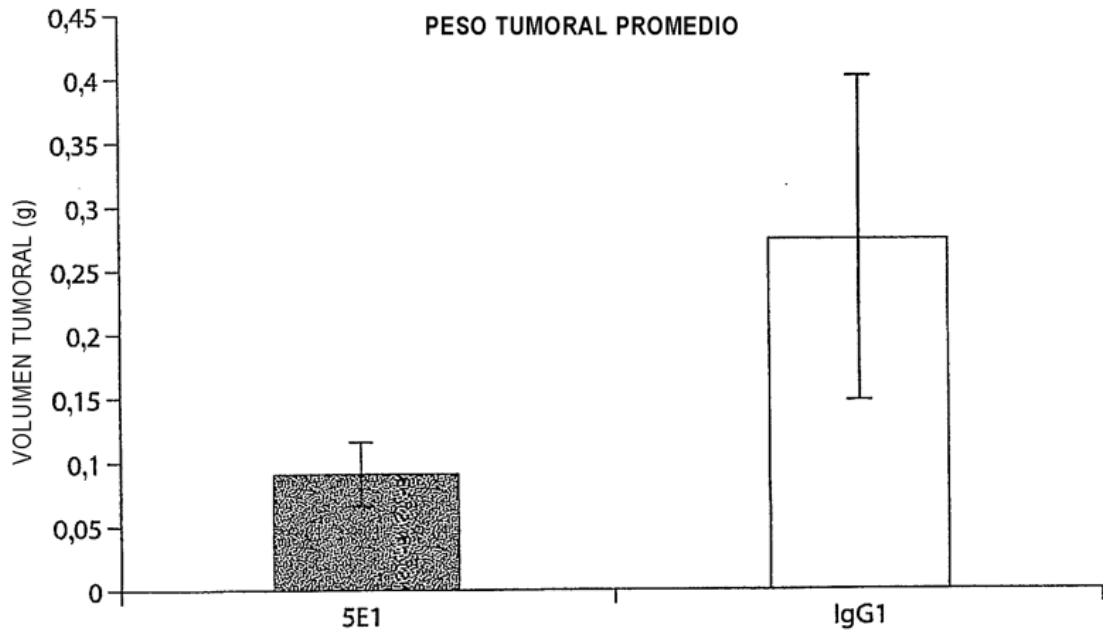


Fig. 52

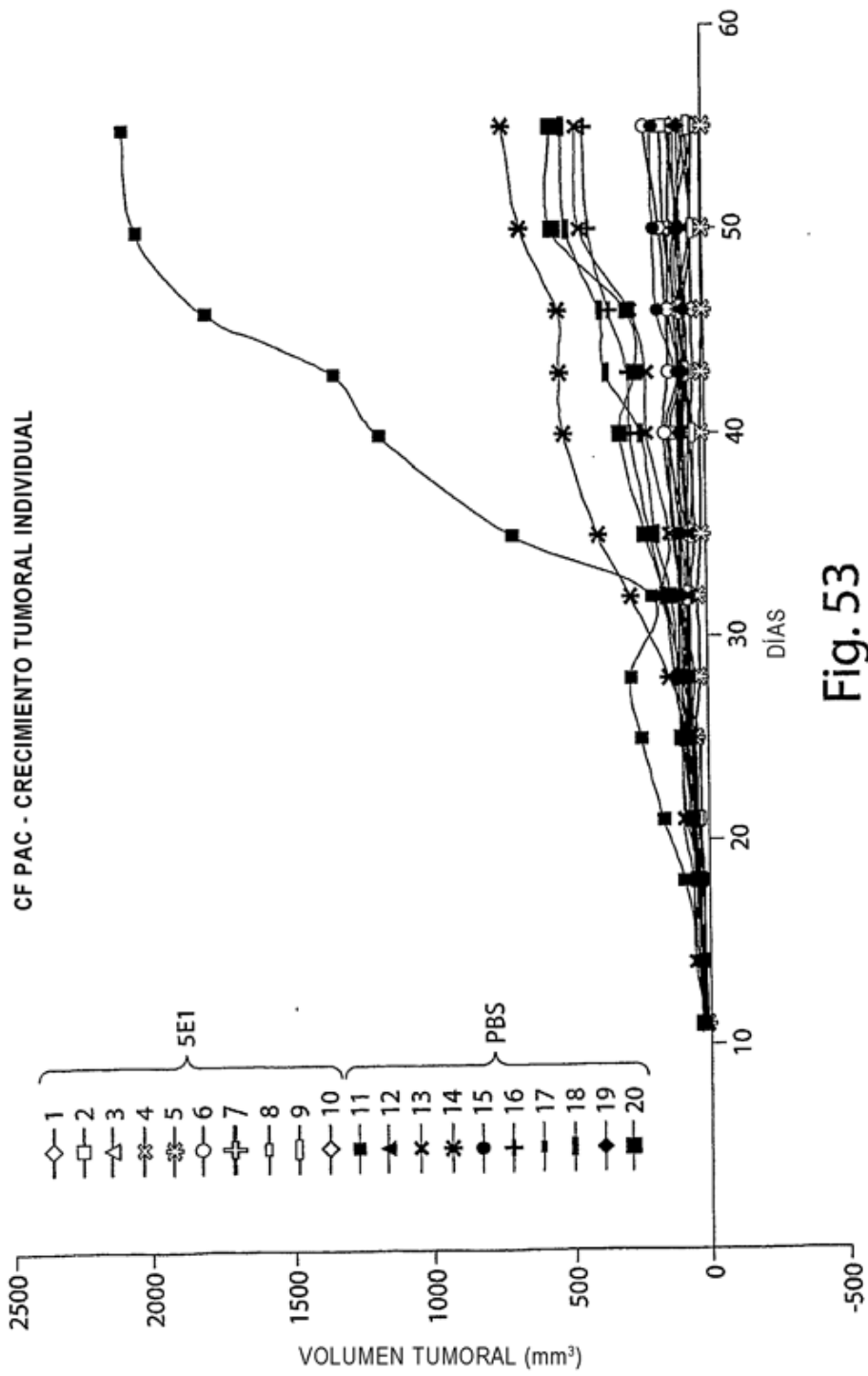


Fig. 53

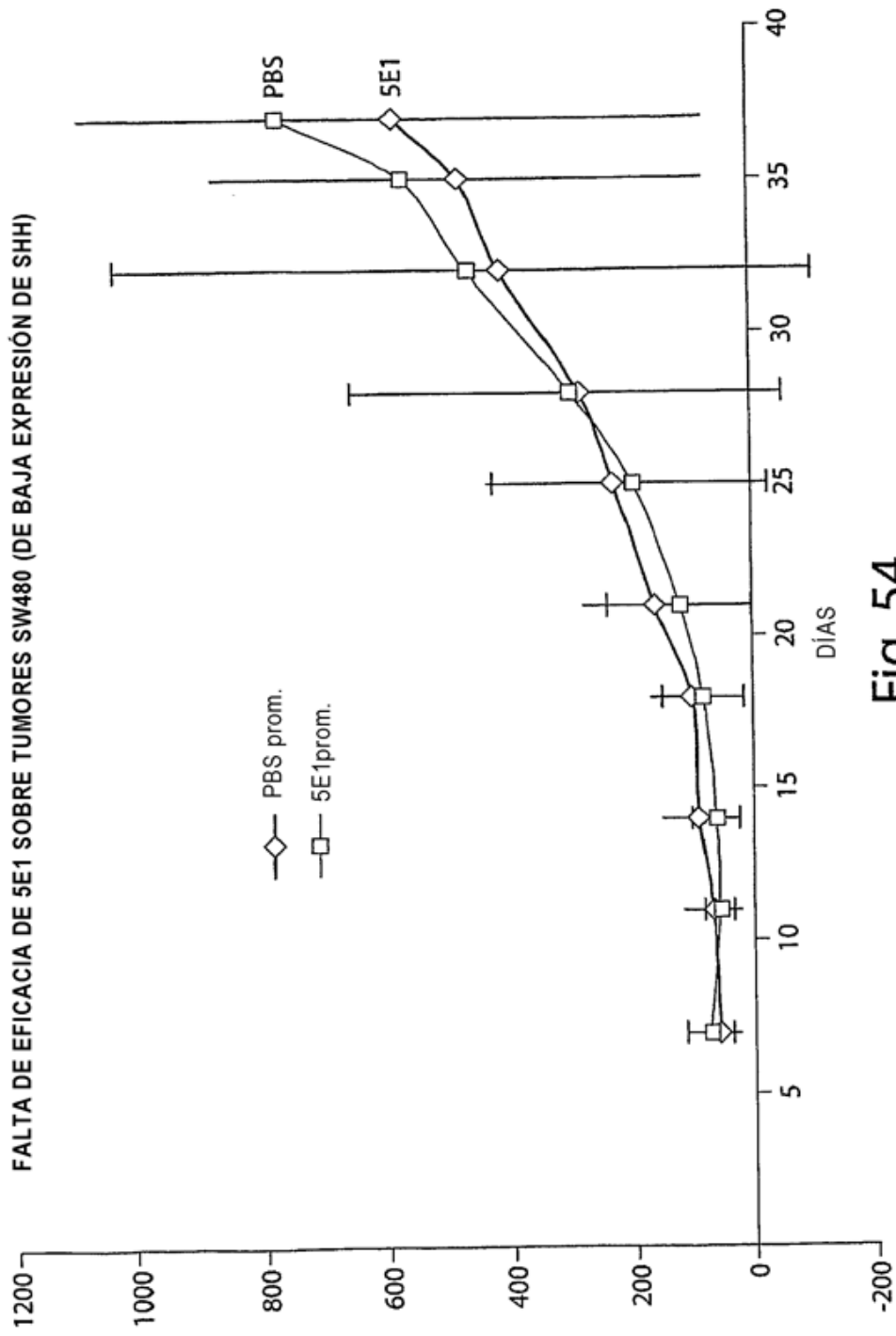


Fig. 54

Ca DE MAMA

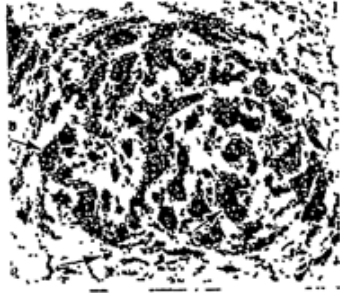


Fig. 55A

Ca DE OVARIO



Fig. 55B

Ca DE ÚTERO



Fig. 55C

Ca DE MAMA

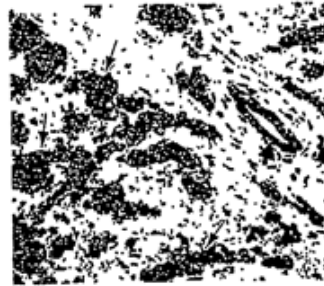


Fig. 55D

Ca DE OVARIO

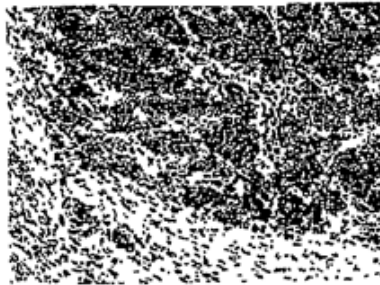


Fig. 55E

Ca DE ÚTERO

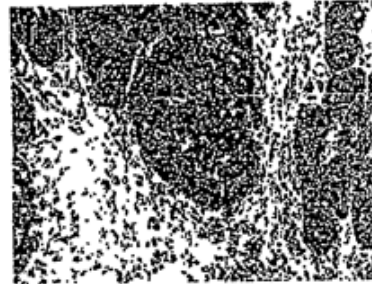


Fig. 55F