



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 950**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07813073 .9**

96 Fecha de presentación : **18.07.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2041320**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54

Título: **Procedimientos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento del cáncer.**

30

Prioridad: **19.07.2006 US 807794 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.06.2011

73

Titular/es: **Genentech, Inc.**
1 Dna Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72

Inventor/es: **Chant, John;**
Guerrero, Anthony S.;
Haverty, Peter;
Honchell, Cynthia;
Jung, Kenneth y
Wu, Thomas D.

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 361 950 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

Procedimientos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento de cánceres asociados con la amplificación génica.

10 ANTECEDENTES

[0002] El cáncer se caracteriza por un aumento en el número de células anómalas, o neoplásicas, derivadas de un tejido normal que proliferan y, en determinadas circunstancias, invaden tejidos adyacentes y finalmente se metastatizan a través de la sangre o del sistema linfático. La alteración de la expresión génica está íntimamente relacionada con el crecimiento celular incontrolado y la desdiferenciación, que son características frecuentes del cáncer. Determinados cánceres se caracterizan por la sobreexpresión de determinados genes, es decir, oncogenes. Un mecanismo bien conocido de la sobreexpresión génica en las células cancerígenas es la amplificación génica. La amplificación génica es un proceso en el que se producen múltiples copias de uno o más genes en el cromosoma de una célula. En ciertos casos, el proceso implica la replicación no programada de la región del cromosoma que contiene estos genes, seguida de la recombinación de los segmentos replicados de nuevo dentro del cromosoma (Alitalo y col., *Adv. Cancer Res.*, 47:235-281 [1986]). En determinados casos, la sobreexpresión de un gen se correlaciona con la amplificación génica, es decir, es proporcional al número de copias producidas.

[0003] La amplificación y/o sobreexpresión de determinados protooncogenes, es decir, aquellos que codifican factores de crecimiento y receptores de los factores de crecimiento, tiene una función importante en la patogénesis de diversas enfermedades neoplásicas humanas. En determinadas circunstancias, la amplificación y/o sobreexpresión se asocian con formas más malignas del cáncer y, por tanto, pueden predecir el resultado clínico (Schwab y col., *Genes Chromosomes Cancer*, 1:181-193 [1990]; Alitalo y col., *supra*). Por ejemplo, el gen humano *erbB2* (también conocido como *her2* o *c-erbB-2*), que codifica un receptor glicoproteína transmembrana 185 kd (p185^{HER2} o HER2) relacionado con el receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR, se sobreexpresa en aproximadamente el 25% a 30% de los cánceres de mama humanos (Slamon y col., *Science*, 235:177-182 [1987]; Slamon y col., *Science*, 244:707-712 [1989]). La sobreexpresión de *erbB2* se considera un factor de predicción de un mal pronóstico, especialmente en pacientes con enfermedad primaria que afecta a los ganglios linfáticos axilares (Slamon y col., [1987] y [1989], *supra*; Ravdin y Chamness, *Gene*, 159:19-27 [1995] y Hynes y Stern, *Biochim. Biophys. Acta*, 1198:165-184 [1994]). La sobreexpresión de *erbB2* también se ha ligado a la sensibilidad y/o resistencia a determinada terapia hormonal y a regímenes quimioterapéuticos, incluyendo CMF (ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo) y antraciclinas (Baselga y col., *Oncology*, 11 (3 supl. 1): 43-48 [1997]). Los pacientes que sobreexpresan *erbB2* muestran una respuesta mayor al tratamiento con taxanos. *Id.*

[0004] La sobreexpresión de *erbB2* ha proporcionado la base para los tratamientos dirigidos de cáncer de mama. Un anticuerpo monoclonal anti-ErbB2 (anti-HER2) humanizado recombinante (HerceptinTM, Genentech, Inc.) se ha usado con éxito para tratar a pacientes con cáncer de mama metastásico que sobreexpresa ErbB2. (Baselga y col., *J. Clin. Oncol.*, 14:737-744 [1996]).

[0005] Existe una necesidad continua de composiciones y procedimientos que se dirijan a los genes amplificados y a los productos de estos genes en el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

[0006] También existe la necesidad continua de composiciones y procedimientos para el diagnóstico y/o tratamiento del cáncer gástrico (de estómago). Aproximadamente del 90% al 95% de los cánceres gástricos malignos son adenocarcinomas derivados de células epiteliales de la capa más interna del estómago. Los tumores gastrointestinales estromales (GIST, por sus siglas en inglés) son tumores no epiteliales derivados del tejido conjuntivo raros. Aproximadamente el 70% de los GIST aparecen en el estómago. Más de 800.000 personas fueron diagnosticadas de cáncer gástrico y más de 630.000 murieron de cáncer gástrico en el año 2000. El pronóstico del cáncer gástrico es malo, con prácticamente la mitad de los pacientes con enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico. La tasa de supervivencia a 5 años es, a menudo, menor del 20%. Véase Ajani (2002) "Gastric Cancer: Epidemiology and Therapy," en *Encyclopedia of Cancer*, vol. 2 (Elsevier Sciences, USA), páginas 249-252.

[0007] Se ha detectado transcripción del oncogén *myb* en algunos cánceres gástricos aunque también en tejidos no relacionados y los autores concluyeron que es improbable que el marcador sirva

para diagnosticar dicho tipo de cáncer (Spikoeskii y col.; Voprosy Onkologii vol. 31, N° 12, 1985, páginas 44-49).

[0008] La invención descrita en este documento cumple las necesidades descritas anteriormente y proporciona otros beneficios.

RESUMEN

[0009] En un aspecto, se proporcionan procedimientos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento de cánceres gástricos asociados con la amplificación y/o sobreexpresión del gen c-Myb.

[0010] En un aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar la presencia de un cáncer gástrico en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la detección de si el gen c-Myb está amplificado en una muestra gástrica de ensayo del mamífero en relación con una muestra control, donde la amplificación del gen c-Myb indica la presencia de cáncer gástrico en el mamífero. En una realización, detectar si el gen c-Myb está amplificado comprende detectar si el número de copias del gen c-Myb está aumentado en al menos 5 veces.

[0011] En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar la presencia de un cáncer gástrico en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la detección de si el gen c-Myb está amplificado en una muestra gástrica de ensayo del mamífero, donde un nivel más alto de exposición del gen c-Myb en la muestra gástrica de ensayo en relación con una muestra control indica la presencia de cáncer gástrico en el mamífero. En una realización, la detección de la expresión del gen c-Myb comprende determinar el nivel de transcripción del ARNm del gen c-Myb. En una realización, un nivel más alto de expresión del gen c-Myb comprende al menos un aumento de 5 veces en la transcripción del ARNm del gen c-Myb en la muestra gástrica de ensayo en relación con la muestra control. En una realización, la detección de la expresión del gen c-Myb comprende determinar el nivel de c-Myb. En una realización, la detección de la expresión del gen c-Myb comprende poner en contacto la muestra gástrica de prueba con un anticuerpo anti-c-Myb y determinar el nivel de expresión de c-Myb en la muestra gástrica de prueba detectando la unión del anticuerpo anti-c-Myb a c-Myb. En una realización, un nivel más alto de expresión del gen c-Myb comprende al menos un aumento de 5 veces en los niveles de c-Myb.

[0012] En otro aspecto, se proporciona un procedimiento de inhibición de la proliferación de una célula de cáncer gástrico, comprendiendo el procedimiento la exposición de la célula a un antagonista de c-Myb. En una realización, el antagonista de c-Myb es un ácido nucleico complementario de 10-30 nucleótidos de longitud que se une y reduce la expresión de un ácido nucleico que codifica c-Myb. En una realización, el ácido nucleico complementario es un oligodesoxinucleótido. En una realización, el antagonista de c-Myb es un ácido nucleico que se une al dominio de unión a ADN de c-Myb. En una realización, el antagonista de c-Myb es una molécula orgánica pequeña que se une a c-Myb. En una realización, el antagonista de c-Myb es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo que se une a c-Myb. En una realización, el anticuerpo que se une a c-Myb es un fragmento de anticuerpo. En una realización, el anticuerpo que se une a c-Myb es un scFv.

[0013] En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para tratar un cáncer gástrico asociado con la amplificación o sobreexpresión del gen c-Myb, comprendiendo el procedimiento la administración al individuo que tiene el cáncer gástrico una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un antagonista de c-Myb. En una realización, el antagonista de c-Myb es un ácido nucleico complementario de 10-30 nucleótidos de longitud que se une y reduce la expresión de un ácido nucleico que codifica c-Myb. En una realización, el ácido nucleico complementario es un oligodesoxinucleótido. En una realización, el antagonista de c-Myb es un ácido nucleico que se une al dominio de unión a ADN de c-Myb. En una realización, el antagonista de c-Myb es una pequeña molécula orgánica que se une a c-Myb. En una realización, el antagonista de c-Myb es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo que se une a c-Myb. En una realización, el anticuerpo que se une a c-Myb es un fragmento de anticuerpo. En una realización, el anticuerpo que se une a c-Myb es un scFv.

[0014] En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para determinar si un individuo que tiene cáncer gástrico responderá a un agente terapéutico dirigido a c-Myb o al gen c-Myb, comprendiendo el procedimiento determinar si el gen c-Myb está amplificado en el cáncer colorrectal, donde la amplificación del gen c-Myb indica que el individuo responderá al agente terapéutico. En una realización, el agente terapéutico se selecciona entre un ácido nucleico complementario, un ácido nucleico que se une al dominio de unión a ADN de c-Myb, una molécula orgánica pequeña que se une a c-Myb y un ácido nucleico que codifica un anticuerpo que se une a c-Myb.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**5 [0015]**

En la Figura 1 se muestra el análisis del número de copias de ADN en una región del cromosoma 6 que comprende el gen c-Myb para nueve muestras de tumores gástricos (cinco tumores estromales gastrointestinales y cuatro adenocarcinomas gástricos).

- 10 En la Figura 2 se muestra el análisis del número de copias de ADN y la expresión de ARNm para dos de los cuatro adenocarcinomas mostrados en la Figura 1. En la Figura 2 también se muestran las localizaciones de las fases de lectura abierta que aparecen dentro de la región del cromosoma 6 mostrada.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

[0016] Se proporcionan procedimientos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento de cánceres asociados con la amplificación génica. En determinadas realizaciones, la invención proporciona procedimiento y composiciones para el tratamiento del cáncer gástrico asociado con la

- 20 amplificación y/o sobreexpresión del gen c-Myb.

I. DEFINICIONES

[0017] Las frases "amplificación génica" y "duplicación génica" (y variantes como "amplificación de un gen" o "duplicación de un gen") se usan indistintamente y se refieren a un proceso por el cual se forman múltiples copias de un gen o fragmento génico en una célula o línea celular en particular. La región duplicada (una tira de ADN amplificado) se refiere a menudo como un "amplicón". Normalmente, la cantidad del ARN mensajero (ARNm) producida, es decir, el nivel de expresión génica, también aumenta en proporción al número de copias hechas del gen en particular.

30

[0018] El término "c-Myb" según se usa en este documento, se refiere a cualquier proteína c-Myb nativa de cualquier fuente de vertebrados, incluso mamíferos como primates (p. ej., humanos y monos) y roedores (p. ej. ratones y ratas), siempre que no se indique otra cosa. El término abarca a c-Myb sin procesar de "longitud completa" así como cualquier forma de c-Myb que sea el resultado del procesamiento en la célula. El término también abarca a variantes naturales de c-Myb, p. ej., variantes de ajuste, variantes alélicas y otras isoformas. El término también abarca fragmentos o variantes de una c-Myb nativa que mantiene al menos una actividad biológica de c-Myb. El término "gen c-Myb" se refiere a cualquier gen de cualquier fuente de vertebrados que codifica una proteína c-Myb, siempre que no se indique otra cosa.

40

[0019] Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que se asocian con cierto grado de proliferación celular anómala. En una realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

45 **[0020]** "Tumor" según se usa en este documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásicos, tanto malignos como benignos, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son exclusivos entre sí como se refiere en este documento.

50 **[0021]** Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que típicamente se caracteriza por crecimiento/proliferación celular no regulada. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma (p. ej., linfomas de Hodgkin y no Hodgkin), blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más en particular de estos cánceres son carcinoma de células escamosas, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioma, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer gástrico, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, carcinoma de riñón, cáncer hepático, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otras enfermedades linfoproliferativas y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

65 **[0022]** El término "cáncer gástrico" se refiere a cáncer de estómago y excluye al cáncer esofágico, cáncer de la unión gastroesofágica, cáncer de intestino delgado y cáncer colorrectal (cualquier cáncer del intestino grueso y/o recto), siempre que no se indique otra cosa.

- [0023]** El término "neoplasma" o "célula neoplásica" se refiere a un tejido o célula anómala que prolifera más rápidamente que los tejidos o células normales correspondientes y continúa creciendo después de eliminar el estímulo que inicia el crecimiento.
- 5
- [0024]** La expresión "célula de cáncer gástrico" se refiere a una célula de cáncer de estómago, tanto *in vivo* como *in vitro*, y abarca a líneas celulares derivadas de células de cáncer gástrico. En una realización, una célula de cáncer gástrico es un adenocarcinoma.
- 10 **[0025]** Según se usa en este documento, "tratamiento" (y variaciones como "tratar" o "tratando") se refieren a una intervención clínica en un intento por alterar el curso natural del individuo o de la célula que está siendo tratada, y puede realizarse como profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Entre los efectos deseables del tratamiento se incluyen prevenir la aparición o recurrencia de la enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa
- 15 o indirecta de la enfermedad, prevenir metástasis, disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión y mejora del pronóstico.
- [0026]** Un "individuo" es un vertebrado. En determinadas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Entre los mamíferos se incluyen, pero sin limitaciones, animales de granja (como vacas),
- 20 animales de competición, mascotas (como gatos, perros o caballos), primates, ratones y ratas. En determinadas realizaciones, el mamífero es un humano.
- [0027]** Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado terapéutico o profiláctico deseado.
- 25 **[0028]** Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención puede variar según factores como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz abarca una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la
- 30 sustancia/molécula se ve superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Típica, pero no necesariamente, puesto que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa inicial de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz debería ser menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.
- 35 **[0029]** El término "agente citotóxico" según se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o causa la muerte o destrucción celular. El término pretende incluir isótopos radiactivos (p. ej., At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (p. ej., metotrexato, adriamicina,
- 40 alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas como toxinas que son moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos descritos a
- 45 continuación. A continuación se describen otros agentes citotóxicos. Un agente "tumoricida" puede causar la destrucción de las células tumorales.
- [0030]** Una "toxina" es cualquier sustancia capaz de tener un efecto perjudicial sobre el crecimiento o proliferación de una célula.
- 50 **[0031]** Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes como tiopea y CYTOXAN[®], ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamilaminas incluyendo
- 55 altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL[®]); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMPIN[®]), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR[®]), acetilcamptotecina, escoplectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos
- 60 sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposido; criptoficinas (especialmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatrina, mostazas nitrogenadas como clorambucilo, clornafacina, cholofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato del óxido de mecloretamina, melfalán,
- 65 novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas como

- carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos como los antibióticos de enedina (p. ej., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma II y caliqueamicina omega II (véase, p. ej., Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos
- 5 cromoproteínas de antibióticos de enedina), aclacinomicinas, actinomicina, autracina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina ADRIAMYCIN[®] (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y deoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas como mitomicina C, ácido
- 10 micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur,
- 15 citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; ácido fólico relleno como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elfornitina; acetato de eliptino; una epotilona; etoglucido; nitrato
- 20 de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides como maitansina y ansamitocinas; mitoguanona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK[®] (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente la toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina);
- 25 uretano; vindesina (ELDISINE[®], FILDESIN[®]); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel TAXOL[®] (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE[™] sin Cremofor, formulación de nanopartículas de paclitaxel estabilizadas con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y TAXOTERE[®] docetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; gemcitabina
- 30 (GEMZAR[®]); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN[®]); platino; etoposido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN[®]); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE[®]); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides como ácido retinoico; capecitabina (XELODA[®]); sales, ácido o derivados
- 35 farmacéuticamente aceptables de cualquier de los anteriores, así como combinaciones de dos o más de los anteriores, como CHOP, abreviatura de una politerapia de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN[™]) combinado con 5-FU y leucovovina.
- 40 **[0032]** También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer y, a menudo, están en forma de tratamiento sistémico, o para el cuerpo completo. Pueden ser hormonas ellos mismos. Entre los ejemplos de antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM) se incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX[®]) tamoxifeno),
- 45 EVISTA[®] raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON[®] toremifeno; antiprogesteronas; reguladores por disminución de los receptores de estrógenos (ERD); agentes que suprimen o anulan las funciones de los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) como LUPRON[®] y ELIGARD[®] acetato de leuprolídeo, acetato de goserelina, acetato de buserelina y triptorelina; otros antiandrógenos
- 50 como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, los cuales regulan la producción de estrógenos en las glándulas adrenales como, por ejemplo 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE[®] acetato de megestrol, AROMASIN[®] exemestano, formestano, fadrozol, RIVISOR[®] vorozol, FEMARA[®] letrozol y ARIMIDEX[®] anastrozol. Además, en esta definición de agentes quimioterapéuticos se incluyen bisfosfonatos como clodronato
- 55 (por ejemplo, BONEFOS[®] o OSTAC[®]), DIDROCAL[®] etidronato, NE-58095, ZOMETA[®] ácido zoledrónico/zoledronato, FOSAMAX[®] alendronato, AREDIA[®] pamidronato, SKELID[®] tiludronato o ACTONEL[®] risedronato; así como troxacitabina (un análogo del nucleósido de citosina 1,3-dioxolano); oligonucleótidos complementarios, especialmente aquellos que inhiben la expresión de los genes de las rutas de señalización implicados en la proliferación de células adherentes, como por ejemplo, alfa-
- 60 PKC, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas como la vacuna THERATOPE[®] y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN[®], vacuna LEUVECTIN[®] y vacuna VAXID[®]; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN[®]; ABARELIX[®] rmRH; lapatinib ditosilato (una pequeña molécula inhibidora de la tirosina quinasa doble ErbB-2 y EGFR también conocida como GW572016); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de
- 65 cualquiera de los anteriores.

[0033] Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (como una célula que expresa c-Myb) *in vitro* o *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser aquel que reduzca significativamente el porcentaje de células (como una célula que expresa c-Myb) en fase S. Entre los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento se incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto a la fase S), como agentes que inducen la parada en G 1 y la parada en fase M. Entre los bloqueantes de la fase-M clásicos se incluyen los derivados de la vinca (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de la topoisomerasa II como doxorubicina, epirrubicina, daunorrubicina, etoposido y bleomicina. Estos agentes que detienen el ciclo celular en la fase G 1 también se expande a la parada en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Pueden encontrarse información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami y col. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente la pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerígenos derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE[®], Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos previniendo la despolimerización, lo que da lugar a la inhibición de la mitosis celular.

[0034] El término "antagonista" se usa en sentido amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido, como c-Myb o la transcripción o traducción del mismo. Entre las moléculas antagonistas adecuadas se incluyen, pero sin limitaciones, anticuerpos antagonistas, fragmentos polipeptídicos, oligopéptidos, moléculas orgánicas (incluyendo moléculas pequeñas), ácidos nucleicos complementarios y ácidos nucleicos que codifican polipéptidos antagonistas.

[0035] Los términos "anticuerpos" (Acs) e "inmunoglobulinas" (Igs) hacen referencia a glucoproteínas que tienen características estructurales similares. Mientras los anticuerpos muestran especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que generalmente carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos de esta última clase son producidos, por ejemplo, a niveles bajos por el sistema linfático y a niveles elevados por los mielomas.

[0036] Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (p. ej., anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos siempre que inhiban la actividad biológica deseada) y también pueden incluir determinados fragmentos de anticuerpo (como se describe con más detalle a continuación). Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado y/o de afinidad madurada.

[0037] El término "anticuerpo anti-c-Myb" o "un anticuerpo que se une a c-Myb" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a c-Myb con la afinidad suficiente como para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse frente a c-Myb. Preferiblemente, el grado de unión de un anticuerpo anti-c-Myb a una proteína que no sea c-Myb no relacionada es menor de aproximadamente el 10% de la unión del anticuerpo a c-Myb determinada, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA). En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une a c-Myb tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-c-Myb se une a un epítipo de c-Myb conservado entre los c-Myb de diferentes especies.

[0038] Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en este documento de forma indistinta para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta no a fragmentos de anticuerpo como se define a continuación. En particular, los términos se refieren a un anticuerpo con cadenas pesadas que contiene la región Fc.

[0039] Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden sólo una porción de un anticuerpo intacto, en el que la porción retiene al menos una, y muchas de la mayoría o todas, las funciones normalmente asociadas con esta porción cuando se presenta en un anticuerpo intacto. En una realización, el fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión al antígeno del anticuerpo intacto y, por tanto, retiene la capacidad para unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, aquel que comprende la región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando se presenta en un anticuerpo intacto, como su unión a FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función ADCC y unión al complemento. En una

realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semividua *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión al antígeno ligado a una secuencia Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

5

[0040] La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y sigue siendo capaz de provocar el entrecruzamiento del antígeno.

10

[0041] "Fv" es un fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión al antígeno completo. En una realización, una especie Fv de dos cadenas consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y otro de la cadena ligera en estrecha asociación no covalente. En una especie Fv de cadena sencilla (scFV), un dominio variable de la cadena pesada y otro de la cadena ligera pueden estar unidos covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de las especies Fv de dos cadenas. Es en esta configuración en la que los tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, los seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un dominio variable sencillo (de la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicos para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad más baja que la del sitio de unión completo.

15

20

25

[0042] El fragmento Fab contiene los dominios variables de las cadenas pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de algunos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en este documento para el Fab' en el que los restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $(F(ab')_2)$ se obtuvieron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros productos químicos para unir los fragmentos de anticuerpos.

30

35

[0043] Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFV" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, donde estos dominios se presentan en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido scFv además comprende un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite al scFv formar la estructura deseada para unirse al antígeno. Para una revisión de los scFV, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994).

40

[0044] El término "dianticuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un enlazador que sea demasiado corto como para permitir que los dos dominios de la misma cadena se apareen, se fuerza a los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión al antígeno. Los dianticuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los dianticuerpos se describen más exhaustivamente, por ejemplo en los documentos EP 404.097 y W093/1161 y en Hudson y col. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134 y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). También se describen trianticuerpos y tetraanticuerpos en Hudson y col. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

50

[0045] Según se usa en este documento, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, p. ej., mutaciones naturales, que pueden presentarse en cantidades menores. Por tanto, el adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que no es una mezcla de anticuerpos diferenciados. En determinadas realizaciones, este anticuerpo monoclonal incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, donde la secuencia polipeptídica de unión a la diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a la diana a partir de diversas secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon a partir de diversos clones, como un grupo de clones de hibridomas, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Debería entenderse que una secuencia de unión a la diana seleccionada puede además alterarse, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en el cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo

65

multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a la diana alterada es también un anticuerpo monoclonal de esta invención. Al contrario que en las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige hacia un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que típicamente no están contaminados por otras inmunoglobulinas.

[0046] El adjetivo “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que la producción del anticuerpo requiera ningún procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales usados según la presente invención pueden obtenerse mediante diversas técnicas incluyendo, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (p.ej., Kohler y col., *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición, 1988); Hammerling, y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), procedimientos de ADN recombinante (véase, p. ej., la patente de EE.UU. N° 4.816.567), tecnologías de despliegue de fagos (véase, p.ej., Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu y col., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee y col., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467-12472 (2004) y Lee y col., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004) y las tecnologías para la producción de anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen partes o todos los loci o genes de la inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, p. ej., los documentos WO98/24893; WO96/34096; WO96/33735; WO91/10741; Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann y col., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); patentes de EE.UU. N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016; Marks y col., *Bio. Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild y col., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

[0047] Los anticuerpos monoclonales de este documento incluyen especialmente anticuerpos “quiméricos” en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica, u homóloga, a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que el resto de las cadenas es idéntico, u homólogo, a secuencias correspondiente en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de estos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. N° 4.816.567 y Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)).

[0048] Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En una realización un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en el que los restos de una región hipervariables del receptor se sustituyen por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tales como ratón, rata, conejo o humano no primate que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden hacerse para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), que típicamente es el de una inmunoglobulina humana. Para obtener detalles adicionales, véase Jones y col., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature* 332:323-329 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véase también los siguientes artículos y referencias citados en estos: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

[0049] Un “anticuerpo humano” es aquel que comprende una secuencia de aminoácidos que se corresponden con las del anticuerpo producido por un humano y/o se ha construido usando cualquiera de las técnicas para obtener anticuerpos humano como se escribe en este documento. Estas técnicas, incluyendo la selección de bibliotecas combinatoriales derivadas de humanos, como bibliotecas de despliegue de fagos (véase, por ejemplo, Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) y

Hoogenboom y col., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991)); usando líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (véase p. ej. Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987) y Boerner y col., J. Immunol., 147: 86 (1991)) y generando anticuerpos monoclonales en animales transgénicos (p. ej., ratones) que son capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena (véase, p. ej., Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., Nature 362: 255 (1993); Bruggemann y col., Year in Immunol., 7: 33 (1993)). Esta definición de anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión al antígeno procedentes de un animal no humano.

[0050] Un anticuerpo con "afinidad madurada" es aquel con una o más alteraciones en uno o más CDR del mismo que da lugar a una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esas alteraciones. En una realización, un anticuerpo de afinidad madurada tiene afinidades nanomolares o, incluso, picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks y col. Bio/Technology 10:779-783 (1992) describen la maduración de la afinidad mediante mezcla aleatoria de dominios VH y VL. La mutagénesis aleatorizada de restos HVR y/o estructurales se describe en: Barbas y col. Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier y col. Gene 169:147-155 (1995); Yelton y col. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson y col., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995) y Hawkins y col, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

[0051] Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce una actividad biológica del antígeno al que se une. Determinados anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas inhiben parcial o completamente la actividad biológica del antígeno.

[0052] Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una secuencia de aminoácidos de la región Fc variante) de un anticuerpo, y varía con el isotipo de anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo se incluye: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (p. ej., receptor de células B) y activación de células B.

[0053] "Receptor Fc" o "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones, un FcR es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de ajuste alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación a base de tirosinas inmunorreceptor (ITAM, por sus siglas en inglés) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición a base de tirosinas inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase Daéron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92; Capel y col., 1994, Immunomethods, 4:25-34 y de Haas y col, 1995, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41. Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están incluidos en el término "FcR" de este documento.

[0054] El término "receptor Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer y col., 1976, J. Immunol., 117:587 y Kim y col., 1994, J. Immunol., 24:249) y de la regulación de la homeostasis de inmunoglobulinas. Se conocen procedimientos para medir la unión a FcRn. La unión al FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de los polipéptidos de unión de alta afinidad de FcRn humana pueden comprobarse, p. ej., en ratones transgénicos o en líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se han administrado polipéptidos variantes de Fc.

[0055] En el documento WO00/42072 (Presta) se describen las variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a los FcR. Véase también Shields y col., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).

[0056] Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En determinadas realizaciones, las células expresan al menos FcγRIII y realizan funciones efectoras ADCC. Entre los ejemplos de leucocitos humanos que median en la respuesta ADCC se incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células citotóxicas naturales

(NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse a partir una fuente nativa, p. ej., de la sangre.

[0057] “Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” o “ADCC” se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la inmunoglobulina se une a receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células efectoras citotóxicas (p.ej., células citotóxicas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permitiendo que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora del antígeno y matando posteriormente a la célula diana con citotoxinas. Las células principales que median en la ADCC, las células NK, expresan sólo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, como el que se describe en las patentes de EE.UU. N° 5.500.362 o 5.821.337, o en la patente de EE.UU. de Presta N°. 6.737.056. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citotóxicas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes y col. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

[0058] “Citotoxicidad dependiente de complemento” o “CDC” se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que está unido a su antígeno relacionado. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, p. ej., como se describe en Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

[0059] Las variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y aumento o disminución de la capacidad de unión a C1q se describen en la patente de EE.UU. N° 6.194.551B1 y en el documento WO99/51642. Véase también, Idusogie y col., *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

[0060] El término “polipéptido que comprende la región Fc” se refiere a un polipéptido, como un anticuerpo o inmunoadhesina, que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (resto 447 según el sistema de numeración de la UE) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o mediante técnicas de ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Por consiguiente, una composición que comprende un polipéptido que tiene una región Fc según está invención puede comprender polipéptidos con K447, con todos los K447 eliminados, o una mezcla de polipéptidos con y sin el resto K447.

[0061] Un “anticuerpo citotóxico” es un anticuerpo que es capaz de una función efectora y/o de inducir la muerte celular tras la unión a su antígeno diana.

[0062] Un “inmunoconjugado” se refiere a un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos.

[0063] Como se usa en este documento, el término “inmunoadhesina” designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden la fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta al reconocimiento del antígeno y al sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es “heteróloga”) y una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. La parte adhesina de una molécula de inmunoadhesina típicamente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, como de los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4 (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

[0064] Una “molécula pequeña” o “molécula orgánica pequeña” se define en este documento como una molécula orgánica que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 500 daltons.

[0065] Un “oligopéptido de unión a c-Myb” o un “oligopéptido que se une a c-Myb” es un oligopéptido que es capaz de unirse a c-Myb con la afinidad suficiente como para que el oligopéptido sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido frente a c-Myb. En determinadas realizaciones el grado de unión de un oligopéptido que se une a c-Myb a una proteína que no sea c-Myb no relacionada es menor de aproximadamente el 10% de la unión del oligonucleótido que se une

a c-Myb a c-Myb como se determina, por ejemplo, mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial. En determinadas realizaciones, un oligopéptido que se une a c-Myb tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$.

5 **[0066]** Una "molécula orgánica de unión a c-Myb" o una "molécula orgánica que se une a c-Myb" es una molécula orgánica distinta a un oligopéptido o anticuerpo como se define en este documento que es capaz de unirse a c-Myb con la afinidad suficiente como para que la molécula orgánica sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido frente a c-Myb. En determinadas realizaciones el grado de unión de una molécula orgánica que se une a c-Myb a una proteína que no sea c-Myb no relacionada es menor de aproximadamente el 10% de la unión de la molécula orgánica que se une a c-Myb a c-Myb como se determina, por ejemplo, mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial. En determinadas realizaciones, una molécula orgánica que se une a c-Myb tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$.

15 **[0067]** La constante de disociación (Kd) de cualquier molécula que se une a un polipéptido diana puede medirse convenientemente usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial. Este ensayo pueden emplear un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 con el polipéptido diana inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, por ejemplo, los chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. El polipéptido diana se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8 a 5 $\mu\text{g/ml}$ (~0,2 μM) antes de la inyección a un flujo de 5 $\mu\text{l/min}$ para alcanzar aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína conjugada. Tras la inyección del polipéptido diana, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reactivos. Para las medidas cinéticas, se inyectan diluciones seriadas de factor 2 de la molécula de unión (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25°C a un flujo de aproximadamente 25 $\mu\text{l/min}$. La velocidad de asociación (K_{on}) y la velocidad de disociación (K_{off}) se calculan usando un modelo de unión de Langmuir 1:1 (versión de software de evaluación BIAcore 3.2) alternando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como el cociente K_{off}/K_{on} . Véase, por ejemplo Chen, Y. y col. (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Si la constante de asociación de un anticuerpo excede de $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces dicha constante de asociación puede determinarse usando una técnica de inhibición de la fluorescencia que mide el incremento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, pasa-banda de 16 nm) a 25°C de un anticuerpo a 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2 en presencia de concentraciones mayores de antígeno según se determina en un espectrofotómetro, como un espectrofotómetro equipado con parada de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

40 **[0068]** Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para la administración de un agente, p. ej., un fármaco, a un mamífero. Los componentes del liposoma normalmente se disponen en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

45 **[0069]** La palabra "marcador" cuando se usa en este documento, se refiere a un compuesto o composición detectable. El marcador puede ser detectable por sí mismo (p. ej., marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar una alteración química de un compuesto o composición sustrato que da lugar a un producto detectable. Entre los radionucleidos que pueden servir como marcadores detectables se incluyen, por ejemplo, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212 y Pd-109.

[0070] Una molécula biológica "aislada", como un ácido nucleico, polipéptido o anticuerpo, es aquella que ha sido identificada y separada y/o recuperada de al menos un componente de su entorno natural.

55

II. REALIZACIONES DE LA INVENCION

[0071] Se proporcionan procedimientos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento de cánceres asociados con la amplificación y/o sobreexpresión génica. En un aspecto, se proporcionan procedimientos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento del cáncer gástrico. Esos procedimientos y composiciones se basan, en parte, en el descubrimiento de que una región del cromosoma 6 que comprende el gen c-Myb se amplifica en determinados cánceres gástricos, y esta amplificación está correlacionada con un aumento de la expresión del ARNm de c-Myb.

60

[0072] El c-Myb se identificó por primera vez como un equivalente celular de un oncogén vírico. Por consiguiente, c-Myb es un "protooncogén" que puede convertirse en una forma oncogénica, p. ej., mediante sobreexpresión y mutación, como el truncado de los extremos N y/o C-terminales. Véase Ramsay y col. (2003) Expert Opin. Ther. Targets 7(2):235-248; Gewirtz (1999) Oncogene 18:3056-5 3062.

[0073] El c-Myb es un factor de transcripción que tiene dominios funcionales conversados diferenciados. Contiene un dominio N-terminal de unión a ADN que tiene tres repeticiones en tándem imperfectas que mantiene una estructura de hélice-vuelta-hélice. También contiene un dominio de transactivación central y un dominio C-terminal regulador negativo. Véase Majello y col. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:9636-9640; Ness (1999) Oncogene 18:3039-3046; Ramsay y col. (2003) Expert Opin. Ther. Targets 7(2):235-248. En la SEC ID N° 1 se muestra una forma de longitud completa del c-Myb humano. Esta secuencia contiene las siguientes características:

15

TABLA 1

Característica	Restos de aminoácidos
Repeticiones del dominio de unión de ADN	35-86
	87-138
	139-189
Dominio de transactivación	275-327
Dominio regulador negativo	328-465
Cremallera de leucina	367-397

[0074] Los ajustes alternativos del ARNm de c-Myb generan diversas isoformas, entre las que se incluyen isoformas que tienen inserciones, deleciones o sustituciones en las porciones central y/o C-terminal de la proteína. Véase, p. ej., Westin y col. (1990) "Alternative splicing of the human c-Myb gene," *μ* 5:1117-1124; Dasgupta y col. (1989) "Identification of alternatively spliced transcripts for human c-Myb: molecular cloning and sequence analysis of human c-Myb exon 9A sequences," Oncogene 4:1419-1423 y N° de acceso del NCBI: U22376.1. Adicionalmente, la localización cromosómica del gen c-Myb es 6q22-23 en el brazo corto del cromosoma 6.

25 **A. Procedimientos de diagnóstico y detección**

[0075] En un aspecto, se proporcionan procedimientos de diagnóstico del cáncer gástrico. Como se describe a continuación en los Ejemplos, se descubrieron tumores gástricos en los que se amplificó una región del cromosoma 6. El gen c-Myb se encuentra completamente dentro de la región de amplificación, como se muestra en la Figura 1 y, por tanto, es una diana atractiva para el diagnóstico y tratamiento del cáncer gástrico.

[0076] Por consiguiente, en un aspecto se proporciona un procedimiento para diagnosticar la presencia de un cáncer gástrico en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la detección de si el gen c-Myb está amplificado en una muestra gástrica de ensayo de un mamífero en relación con una muestra control, donde la amplificación del gen c-Myb indica la presencia de cáncer gástrico en el mamífero. Como se usa en este documento, el término "detección" abarca la detección cuantitativa o cualitativa. Una "muestra gástrica de ensayo" es una muestra biológica derivada de tejido gástrico que puede o no ser cancerosa, p. ej., una muestra de células gástricas que se sospecha son cancerosas o un extracto celular completo o un extracto fraccionado (como un extracto nuclear) derivado de células gástricas. Una "muestra control" es una muestra biológica derivada de (a) tejido normal, p. ej., células gástricas normales o un extracto celular completo o extracto fraccionado (como un extracto nuclear) derivado de dichas células o (b) tejido de cáncer gástrico en el que se sabe que el gen c-Myb no está amplificado o sobreexpresado, o un extracto celular completo o extracto fraccionado derivado de este. Se dice que el gen c-Myb está "amplificado" si el número de copias del gen c-Myb está aumentado en al menos 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 veces en la muestra gástrica de ensayo en relación con la muestra control.

[0077] En determinadas realizaciones, la detección de la amplificación del gen c-Myb se consigue usando determinadas técnicas conocidas por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, puede usarse hibridación comparativa del genoma para obtener un mapa del número de copias de las secuencias de ADN como una función de la localización cromosómica. Véase, p. ej., Kallionicmi y col. (1992) Science 258:818-821. La amplificación del gen c-Myb también puede detectarse, por ejemplo, mediante hibridación de tipo Southern usando una sonda específica para el gen c-Myb o mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

[0078] En determinadas realizaciones, la detección de la amplificación del gen c-Myb se consigue evaluando directamente el número de copias del gen c-Myb, por ejemplo, usando una sonda que hibrida con el gen c-Myb. En determinadas realizaciones, la detección de la amplificación del gen c-Myb se consigue evaluando indirectamente el número de copias del gen c-Myb, por ejemplo, evaluando el número de copias de una región cromosómica que está fuera del gen c-Myb pero que se amplifica conjuntamente con el gen c-Myb. Los consejos para seleccionar esta región se proporcionan, por ejemplo, en las Figuras 1 y 2.

[0079] En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar la presencia de un cáncer gástrico en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la detección de la expresión del gen c-Myb en una muestra gástrica de prueba de un mamífero donde un nivel más alto de expresión del gen c-Myb en la muestra gástrica de ensayo en relación con una muestra control indica la presencia de cáncer gástrico en el mamífero. En determinadas realizaciones, la expresión del gen c-Myb se detecta determinando el nivel de transcripción del ARNm del gen c-Myb. Los niveles de transcripción del ARNm pueden determinarse, cuantitativa o cualitativamente, mediante diversos procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Los niveles de transcripción de ARNm también pueden determinarse directa o indirectamente mediante la detección de los niveles de ADNc generados a partir del ARNm. Entre los ejemplos de procedimientos para la determinación de los niveles de transcripción de ARNm se incluyen, pero sin limitaciones, RT-PCR cuantitativa en tiempo real y ensayos basados en hibridación, incluyendo ensayos a base de micromatrices y ensayos basados en el ajuste como las inmunotransferencias. En determinadas realizaciones, "un nivel más alto de expresión génica de c-Myb" significa un aumento de al menos 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 veces en la transcripción del ARNm a partir del gen c-Myb.

[0080] En otras realizaciones, la expresión del gen c-Myb se detecta determinando el nivel de c-Myb. Los niveles de c-Myb pueden determinarse, cuantitativa o cualitativamente, mediante determinados procedimientos conocidos por los expertos, incluyendo procedimientos de detección basados en anticuerpos. En una realización, la detección de la expresión del gen c-Myb en una muestra gástrica de ensayo comprende poner en contacto la muestra gástrica de ensayo con un anticuerpo anti-c-Myb y determinar el nivel de expresión (cuantitativa o cualitativamente) de c-Myb en la muestra gástrica de ensayo detectando la unión del anticuerpo anti-c-Myb a c-Myb. En determinadas realizaciones, la unión de un anticuerpo anti-c-Myb a c-Myb, puede ser detectada mediante diversos procedimientos por expertos en la técnica incluyendo, pero sin limitaciones, la clasificación de células activada por fluorescencia, inmunofluorescencia, radioinmunoensayo, ELISA y similares. En determinadas realizaciones, "un nivel más alto de expresión génica de c-Myb" significa un aumento de al menos 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 veces en los niveles de c-Myb.

[0081] Para cualquier de los procedimientos anteriores, la finalidad establecida de "diagnóstico de la presencia de un cáncer gástrico en un mamífero" no es limitante y abarca la clasificación del tipo de cáncer gástrico presente en un mamífero detectando si el gen c-Myb está amplificado y/o se expresa a un nivel más alto en una muestra de ensayo de cáncer gástrico en relación con una muestra control. La clasificación de un cáncer gástrico en base a si el gen c-Myb está amplificado y/o sobreexpresado es útil, p. ej., para determinar si un individuo que tiene cáncer gástrico responderá a un agente terapéutico que se dirige a c-Myb o al gen c-Myb y, por tanto, para la selección del régimen óptimo para el tratamiento del cáncer gástrico, como se describe adicionalmente a continuación.

[0082] Por ejemplo, se proporciona un procedimiento para determinar si un individuo que tiene un cáncer gástrico responderá a un agente terapéutico que se dirige a c-Myb o al gen c-Myb, comprendiendo el procedimiento la determinación de si el gen c-Myb está amplificado y/ sobreexpresado en el cáncer gástrico (p. ej., usando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente), en el que la amplificación y/o sobreexpresión del gen c-Myb indica que el individuo responderá al tratamiento terapéutico. Un "agente terapéutico que se dirige hacia c-Myb o hacia el gen c-Myb" significa cualquier agente que afecta a la expresión y/o a una actividad de c-Myb o al gen Myb incluyendo, pero sin limitaciones, cualquiera de los antagonistas de c-Myb descritos a continuación, en la Parte B, incluyendo agentes terapéuticos que ya son conocidos en la técnica así como aquellos que se desarrollen posteriormente.

B. Composiciones y formulaciones farmacéuticas

[0083] Se proporcionan formulaciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer gástrico. En determinadas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende al menos un antagonista de c-Myb, un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional. Un antagonista de c-Myb puede ser cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente 1) una actividad biológica de c-Myb, p. ej., la actividad de activación transcripcional o la actividad de unión al ADN de c-Myb, o 2) la transcripción o traducción de c-Myb.

En determinadas realizaciones, un antagonista de c-Myb comprende un anticuerpo anti-c-Myb o un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-c-Myb; un oligopéptido; una molécula orgánica, un ácido nucleico que se une a c-Myb o un ácido nucleico complementario, como un oligodeoxinucleótido complementario.

5

[0084] En otras realizaciones, una formulación farmacéutica comprende al menos un anticuerpo anti-c-Myb citotóxico, un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional. Aún en otras realizaciones, una formulación farmacéutica comprende al menos un inmunoconjugado, donde el inmunoconjugado comprende un anticuerpo que se une a c-Myb y un agente citotóxico; un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional.

10

1. Antagonistas de c-Myb

[0085] En un aspecto, un antagonista de c-Myb es un anticuerpo anti-c-Myb. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-c-Myb es un "anticuerpo bloqueante", p. ej., un anticuerpo que bloquea parcial o completamente una actividad de c-Myb. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-c-Myb se une al dominio de unión a ADN de un c-Myb. En la Tabla 1 se muestra un ejemplo de dominio de unión a ADN de un c-Myb humano. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-c-Myb se une al dominio de transactivación de un c-Myb. En la Tabla 1 se muestra un ejemplo de dominio de transactivación de c-Myb humano.

20

[0086] En un aspecto, un antagonista de c-Myb es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-c-Myb. En la técnica se conocen determinados anticuerpos bloqueantes anti-c-Myb y se han expresado en células mediante la transfección de las células con el ácido nucleico que codifica los anticuerpos. Por tanto, los anticuerpos expresados eran eficaces en la reducción de la actividad de c-Myb en la célula. Véase, p. ej., Afrozé y col. (2003) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285:C88-C95; Kasono y col. (1998) *Biochem Biophys Res Commun.* 251(1):124-30. En particular, Kasono y col., describieron la expresión de un scFv anti-c-Myb que bloqueaba funcionalmente c-Myb y tenía efecto citotóxico sobre una línea celular de leucemia que expresaba Myb, sugiriendo por tanto, una utilidad para este anticuerpo en terapia génica. *Id.*

30

[0087] En diversas realizaciones de la invención, un anticuerpo anti-c-Myb (incluyendo anticuerpos antagonistas anti-c-Myb y anticuerpos citotóxicos anti-c-Myb, descritos a continuación en la Parte 2) es un anticuerpo monoclonal. En diversas realizaciones, un anticuerpo anti-c-Myb es un fragmento de anticuerpo, p. ej., un Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, un fragmento (Fab')₂ o un anticuerpo de dominio único (Domantis, Inc., Watham, MA; véase p. ej., la patente de EE.UU. N° 6.248.516 B1). En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-c-Myb es un anticuerpo biespecífico (véase, p. ej., el documento WO94/04690 y Suresh y col. (1986) *Methods in Enzymology* 121:210). En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-c-Myb es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.

35

[0088] En otro aspecto, un antagonista de c-Myb es un oligopéptido que se une a c-Myb. En una realización, un oligopéptido se une al dominio de unión a ADN de un c-Myb. En una realización, un oligopéptido se une al dominio de unión de transactivación de un c-Myb. Los oligopéptidos pueden sintetizarse químicamente usando metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o pueden prepararse y purificarse usando tecnología recombinante. Estos oligopéptidos normalmente tienen una longitud de al menos 5 aminoácidos, alternativamente tienen una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 aminoácidos. Estos oligonucleótidos pueden identificarse sin realizar experimentación usando técnicas bien conocidas. A este respecto, se menciona que las técnicas para la selección en bibliotecas de oligopéptidos de oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143 y las publicaciones internacionales N° WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:3998-4002 (1984); Geysen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:178-182 (1985); Geysen y col., en *Synthetic Peptides as Antigens*, 130-149 (1986); Geysen y col., *J. Immunol. Meth.*, 102:259-274 (1987); Schoofs y col., *J. Immunol.*, 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. y col. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378; Lowman, H.B. y col. (1991) *Biochemistry*, 30:10832; Clackson, T. y col. (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J. D. y col. (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581; Kang, A.S. y col. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8363 y Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668). En determinadas realizaciones, un oligopéptido puede estar conjugado con un agente citotóxico.

55

60

[0089] Aún en otro aspecto, un antagonista de c-Myb es una molécula orgánica que se une a c-Myb, distinta de un oligopéptido o anticuerpo como se describe en este documento. Una molécula orgánica puede, por ejemplo, ser una molécula pequeña. En una realización, una molécula orgánica se une al dominio de unión a ADN de un c-Myb. En otra realización, una molécula orgánica se une al dominio de transactivación de un c-Myb. En una realización, una molécula orgánica bloquea la transcripción de c-Myb. Algunas de estas moléculas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, es sabido que el gen c-Myb es transcrito por la ARN polimerasa II, que se para en un segmento poli-T de 19-20 restos en el primer intrón. Véase Ramsay y col. (2003) *Expert Opin. Ther. Targets* 7(2):235-248. Esta parada puede potenciarse exponiendo a las células a agentes que promueven la diferenciación, como DMSO, o que inhiben la desacetilación de histonas, como butirato sódico hexamtilen bisacetamida (HMBA) y ácido suberoilánilido hidroxámico (SAHA). *Id.*

[0090] Una molécula orgánica que se une a c-Myb puede identificarse y sintetizarse químicamente usando metodología conocida (véase, p. ej., las publicaciones PCT N° WO00/00823 y WO00/39585). Estas moléculas orgánicas normalmente tiene un tamaño de menos de aproximadamente 2.000 daltons, alternativamente un tamaño de menos de aproximadamente 1.500, 750, 500, 250 o 200 daltons, donde estas moléculas orgánicas que son capaces de unirse a c-Myb pueden identificarse sin realizar experimentación usando técnicas bien conocidas. A este respecto, se menciona que las técnicas para la selección de moléculas en bibliotecas de moléculas orgánicas que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N° WO00/00823 y WO00/39585). En determinadas realizaciones, una molécula orgánica puede estar conjugada con un agente citotóxico.

[0091] Aún en otro aspecto, un antagonista de c-Myb es un ácido nucleico. En determinadas realizaciones, un ácido nucleico codifica un polipéptido antagonista de c-Myb, p. ej., un anticuerpo que se une a c-Myb. En determinadas realizaciones, un ácido nucleico comprende una secuencia que se une a un dominio de unión al ADN de c-Myb. En una de estas realizaciones, el ácido nucleico comprende una secuencia derivada de un sitio de unión c-Myb natural, p. ej., todo o una porción de un sitio de unión a c-Myb natural o una variante del mismo que mantiene la capacidad para unirse a c-Myb. Este ácido nucleico puede usarse, p. ej., para valorar c-Myb a partir de su sitio de unión natural. Se han identificado las secuencias de ácido nucleico de diversos sitios de unión de c-Myb (véase Lang y col. (2005) *Oncogene* 24:1375-1384). En determinados ejemplos de realizaciones, un antagonista de c-Myb puede ser un ácido nucleico que comprende cualquiera de aquellas secuencias, o un fragmento de variantes de las mismas, que mantienen la capacidad para unirse a c-Myb.

[0092] Aún en otro aspecto, un antagonista de c-Myb es un ácido nucleico complementario que disminuye la expresión del gen c-Myb (es decir, que disminuye la transcripción del gen c-Myb y/o la traducción del ARNm de c-Myb. En determinadas realizaciones, un ácido nucleico complementario se une a un ácido nucleico (ADN o ARN) que codifica c-Myb. En determinadas realizaciones, un ácido nucleico complementario es un oligonucleótido con una longitud de aproximadamente 10-30 nucleótidos (incluyendo todos los puntos entre esos extremos). En determinadas realizaciones, un ácido nucleico complementario es un oligonucleótido con una longitud de aproximadamente 18-24 nucleótidos (incluyendo todos los puntos entre esos extremos). En determinadas realizaciones, un oligonucleótido complementario comprende cadenas principales de azúcar-fosfodiéster modificadas (u otras uniones de azúcares, como uniones fosforotioato y uniones como las descritas en el documento WO 91/06629), donde dichas cadenas principales de azúcar-fosfodiéster modificadas son resistentes a nucleasas endógenas.

[0093] En una realización, un ácido nucleico complementario es un oligodexosirribonucleótico (ODN), que tiene como resultado la degradación y/o transcripción o traducción reducida del ARNm de c-Myb. En determinadas realizaciones, se prefieren ODN unidos a fosfotioato (PS-ODN). Determinados ejemplos de ODN específicos de c-Myb son conocidos por los expertos en la técnica y se describen, p. ej., en Ramsay y col. (2003) *Expert Opin. Ther. Targets* 7(2):235-248. Determinados ODN están dirigidos al sitio de inicio de la traducción del ARN de c-Myb y las regiones en dirección 3' o, preferiblemente, en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción. *Id.* Se han administrado con éxito ODN que se dirigen hacia c-Myb de una forma específica del tipo celular *in vivo* e *in vitro* usando preparaciones catiónicas de liposoma. *Id.*; Brignole et al. (2003) *Cancer Lett.* 197:231-235. De hecho, se han administrado ODN que se dirige a c-Myb en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer hematopoyético usando procedimientos *ex vivo*. Véase Gewirtz (1999) *Oncogene* 18:3056-3062.

[0094] En determinadas realizaciones, un ácido nucleico complementario es un ARN que reduce la expresión de un ácido nucleico diana mediante "interferencia de ARN" ("ARNi"). Para la revisión del ARNi, véase, p. ej., Novina y col. (2004) *Nature* 430:161-164. Estos ARN derivan, por ejemplo, de ARN de interferencia corto (ARNic) y de microARN. Los ARNic, p. ej., pueden sintetizarse como oligonucleótidos de cadena doble con una longitud de aproximadamente 18-26 nucleótidos. *Id.*

Por tanto, los ácidos nucleicos complementarios que disminuyen la expresión de c-Myb son bien conocidos para los expertos.

[0095] Aún en otro aspecto, un antagonista de c-Myb es un ODN que forma una triple hélice.

- 5 Aún en otro aspecto, un antagonista de c-Myb es una ribozima dirigida frente a un ARNm de c-Myb. Los ODN que forman una triple hélice y las ribozimas se describen, p. ej., en Gewirtz (1999) *Oncogene* 18:3056-3062; Gunther y col. (1996) *Photochem. Photobiol.* 63:207-212; James y col. (1997) *Methods Mol. Biol.* 74:1-9.

10 **2. Anticuerpos citotóxicos**

[0096] En un aspecto, se proporcionan anticuerpos citotóxicos. En determinadas realizaciones, un anticuerpo citotóxico es un anticuerpo anti-c-Myb, como los proporcionados anteriormente, que ejercen una función efectora y/o induce la muerte celular.

15

3. Inmunoconjugados

[0097] Los inmunoconjugados o "conjugados anticuerpo-fármaco" son útiles para la administración local de agentes citotóxicos en el tratamiento del cáncer. Véase, p. ej., Syrigos y col.

- 20 (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y col. (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26:151-172; Patente de EE.UU. N° 4.975.278. Los inmunoconjugados permiten la administración dirigida de un resto farmacológico a un tumor, mientras que la administración sistémica de agentes citotóxicos no conjugados puede producir niveles inaceptables de toxicidad en las células normales así como sobre las células tumorales que se van a eliminar. Véase Baldwin y col. (Mar. 15, 1986) *Lancet* pág. 603-05; 25 Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications* (A. Pinchera y col., eds.) pág. 475-506.

[0098] En un aspecto, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo que se une a c-Myb, como los proporcionados anteriormente, y un agente citotóxico, como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (p. ej., una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado): En un aspecto, un antagonista de c-Myb es un ácido nucleico que codifica un inmunoconjugado.

30

- 35 [0099] Anteriormente se han descrito agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse se incluyen, la cadena A de la toxina diftérica, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas 40 de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Están disponibles diversos radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re.

- 45 [0100] Pueden hacerse conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico usando diversos agentes bifuncionales de conjugación de proteínas como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)-propionato (SPDP), iminotilano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (como suberato de disuccinimidilo), aldehidos (como glutaraldehido), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobezoilo)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (como bis-(p-diazoniumbenzoilo)-etilendiamino), diisocianatos (como tolieno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor 50 bis activos (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzono). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina con ricina como se describe en Vitetta y col., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

55

[0101] También se contemplan en este documento los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, como caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad como toxina.

60 **Maitansina y maitansinoides**

[0102] En una realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-c-Myb conjugado con una o más moléculas de maitansinoides. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primer vez del 65 arbusto de África del este *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. N° 3.896.111). Posteriormente, se

descubrió que determinados microbios también producían maitansinoides, como maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol (patente de EE.UU. N° 4.151.042). Maitansinol sintético y derivados y análogos de este se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663 y 4.371.533.

[0103] En un intento por mejorar su índice terapéutico, se han conjugado la maitansina y los maitansinoides con anticuerpos que se unen a antígenos de la superficie de células tumorales. Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 5.208.020, 5.416.064 y en la patente europea EP 0 425 235 B1. Liu y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describen inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 conjugado con el anticuerpo monoclonal C242 dirigido frente al cáncer gástrico humano. Se encontró que el conjugado era extremadamente citotóxico en células de cáncer de colon en cultivo y mostraba una actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se ha conjugado a través de un enlazador disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno de líneas celulares de cáncer de colon humano o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/*neu*. La citotoxicidad de conjugado TA. 1-maitansinoide se probó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 moléculas del antígeno superficial HER-2 por célula. El conjugado del fármaco alcanzaba un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre que podía aumentarse aumentando el número de moléculas maitansinoides por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostraba una citotoxicidad sistémica menor en ratones.

[0104] Se prepararon conjugados anticuerpo anti-c-Myb-maitansinoide mediante conjugación química de un anticuerpo anti-c-Myb a una molécula de maitansinoide sin que disminuyera significativamente la actividad biológica ni del anticuerpo ni de la molécula de maitansinoide. Una media de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia para potenciar la citotoxicidad de las células diana sin afectar de forma negativa a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque incluso cabría esperar que una molécula de toxina por anticuerpo potenciara la citotoxicidad por encima del uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y pueden sintetizarse usando técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se describen maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5.208.020 y en las otras publicaciones de patentes y no patentes referidas a partir de ahora en este documento. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, como diversos ésteres de maitansinol.

[0105] Existen muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para obtener conjugados anticuerpo-maitansinoides incluyendo, por ejemplo los descritos en la patente de EE.UU. N° 5.208.020 y en la patente EP 0 425 235 B1, y en Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992). Entre los grupos de unión se incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles al ácido, grupos lábiles a la luz, grupos lábiles a la peptidasa o grupos lábiles a la estearasa, como se describe en las patentes identificadas anteriormente, siendo los preferidos los grupos disulfuro y tioéter.

[0106] Pueden hacerse conjugados del anticuerpo y el maitansinoide usando diversos agentes de conjugación de proteínas bifuncionales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotilano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (como suberato de disuccinimidilo), aldehidos (como glutaraldehido), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobezoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamino), diisocianatos (como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis activos (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Determinados agentes de conjugación, como el N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson y col., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y el N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP), proporcionan un enlace disulfuro.

[0107] El enlazador puede estar unido a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster mediante la reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de conjugación convencionales. La reacción puede darse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, en la posición C-14 modificada con hidroximetilo, en la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y en la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o de un análogo de maitansinol.

Auristatinas y dolastatinas

[0108] En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-c-Myb conjugado con una dolastatina o análogo o derivado peptídico de dolastatina, p. ej., una auristatina (Patentes de EE.UU. N° 5.635.483; 5.780.588). Se ha mostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis del GTP y la división nuclear y celular (Woyke y col. (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) y tiene actividad anticancerígena (patente de EE.UU. N° 5.663.149) y actividad antifúngica (Pettit y col. (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). El resto farmacológico dolastatina o auristatina puede estar unido al anticuerpo a través del extremo N (amino) terminal o del extremo C (carboxilo) terminal del resto farmacológico peptídico (documento WO 02/088172).

[0109] Entre los ejemplos de realizaciones con auristatina se incluyen restos farmacológicos DE y DF de monometilauristatina unidos al extremo N-terminal, descritos en la solicitud de publicación de patente de EE.UU. N° 2005-0238649 A1 "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands".

[0110] Típicamente, pueden prepararse restos farmacológicos a base de péptidos formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Estos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según el procedimiento de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pág 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los restos farmacológicos auristatina/dolastatina pueden prepararse según los procedimientos de: documentos US 5.635.483 y US 5.780.588; Pettit y col. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit y col.(1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R, y col. *Synthesis*, 1996, 719-725 y Pettit y col.(1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 15:859-863. Véase también Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784; publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2005-0238649 A1, (en la que se describen, por ejemplo, enlazadores y procedimientos de preparación de compuestos monometilvalina como MMAE y MMAF conjugados a enlazadores).

Caliqueamicina

[0111] Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo anti-c-Myb conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. Los antibióticos de la familia de la caliqueamicina son capaces de producir roturas del ADN de doble hélice a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina, consulte las patentes de EE.UU. N° 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales de caliqueamicinas que pueden usarse se incluyen, pero sin limitaciones, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG y θ^I (Hinman y col., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode y col., *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) y las patentes de EE.UU. de American Cyanamid mencionadas previamente). Otro fármaco antitumoral al cual puede conjugarse el anticuerpo es el QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios de acción intracelulares y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por tanto, la captación celular de estos agentes a través de internalización mediada por anticuerpos potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

[0112] Entre otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con un anticuerpo anti-c-Myb se incluyen BCNU, estreptozoicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en las patentes de EE.UU. N° 5.053.394 y 5.770.710 así como esperamicinas (patente de EE.UU. N° 5.877.296).

[0113] Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse se incluyen la cadena A de la toxina diftérica, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantinas, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S) inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

[0114] En otro aspecto, un inmunoconjugado puede comprender un anticuerpo anti-c-Myb y un compuesto con actividad nucleotídica (p. ej., una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN, como una desoxirribonucleasa; ADNasa).

[0115] Para la destrucción selectiva de un tumor, un inmunoc conjugado puede comprender un anticuerpo anti-c-Myb y un átomo altamente radiactivo. Están disponibles diversos isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos anti-c-Myb radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{187} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para diagnóstico, puede comprender un átomo radiactivo para estudios de centelleo, por ejemplo Tc^{99m} o I^{123} , o un marcador de spin para adquisición de imagen por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como adquisición de imagen por resonancia magnética, mri, por sus siglas en inglés), como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[0116] El radio u otros marcadores pueden incorporarse en el inmunoc conjugado por vías conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que incluyan, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores como Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{187} e In^{111} pueden estar unidos a través de un resto de cisteína del péptido. El Itrio-90 puede estar unido a través de un resto de lisina. Puede usarse el procedimiento de IODOGEN (Fraker y col. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 para incorporar yodo-123. En "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal. CRC Press 1989) se describen otros procedimientos detallados.

20

4. Agentes terapéuticos adicionales

[0117] Opcionalmente, las formulaciones farmacéuticas pueden comprender al menos un agente terapéutico adicional (es decir, además de un antagonista de c-Myb, anticuerpo citotóxico o inmunoc conjugado). Estos agentes terapéuticos adicionales se describen con más detalle a continuación, en la Parte C.

25

5. Preparación de formulaciones farmacéuticas

[0118] Las formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los agentes anteriores se preparan para su almacenamiento mezclando el anticuerpo o inmunoc conjugado que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980)) en forma de soluciones acuosas o liofilizadas u otras formulaciones secas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes como ácido ascórbico y metionina; conservantes (como cloruro de amonio de octadecildimetilbencilo; cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio); fenol, butilo o alcohol bencilo; alquilparabenos como metil o propilparabeno, catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparragina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono como glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones farmacológicas utilizadas para su administración *in vivo* generalmente están estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril.

[0119] Un agente también puede estar incluido en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Estas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

55

[0120] Pueden prepararse preparaciones de liberación mantenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente de interés, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, p. ej., en películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación mantenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(vinilalcohol), polilactidas (patente de EE.UU. N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y y etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glucólico degradables como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestos de copolímero ácido láctico-ácido glucólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que

65

polímeros como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los agentes encapsulados permanecen en el organismo durante un periodo de tiempo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo que da lugar a una pérdida de actividad biológica y, en el caso de anticuerpos, a posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de un intercambio tiodisulfuro, puede conseguirse la estabilización modificando los restos sulfhidrilo, liofilizando soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

C. Procedimientos de tratamiento y procedimientos relacionados

15 [0121] Se proporcionan procedimientos terapéuticos que utilizan cualquiera de las composiciones o formulaciones farmacéuticas anteriores. Entre estos procedimientos se incluyen procedimientos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo*, siempre que no es indique otra cosa.

20 [0122] En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para inhibir la proliferación de una célula de cáncer gástrico, comprendiendo el procedimiento la exposición de la célula a un agente que comprende cualquiera de las composiciones o formulaciones farmacéuticas anteriores. La "exposición" de la célula a un agente abarca proporcionar el agente extracelularmente, intracelularmente, o ambos. En un aspecto en particular, la invención proporciona un procedimiento de inhibición de la proliferación de una célula de cáncer gástrico, comprendiendo el procedimiento la exposición de la célula a un antagonista de c-Myb. En determinadas realizaciones, el gen c-Myb está amplificado y/o sobreexpresado en la célula de cáncer gástrico. En determinadas realizaciones, la célula de cáncer gástrico deriva de un tumor gástrico, p. ej., un tumor gástrico en el que el gen c-Myb está amplificado y/o sobreexpresado. En determinadas realizaciones, la célula de cáncer gástrico puede ser de cualquiera de las siguientes líneas celulares: SNU-1, SNU-5, SNU-16, SNU-484, SNU-30 601, SNU-620, SNU-638 y SNU-668.

[0123] "Inhibir la proliferación" significa disminuir la proliferación de una célula en al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% e incluye la inducción de la muerte celular. La inhibición de la proliferación celular puede medirse usando procedimientos conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, un ensayo conveniente para medir la proliferación celular es el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo™, que puede obtenerse de Promega (Madison, WI). En este ensayo se determina el número de células viables en el cultivo en función de la cuantificación de la presencia de ATP que es una indicación de las células metabólicamente activas. Véase Crouch y col. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, patente de EE.UU. N° 6.602.677. Los ensayos pueden realizarse en formato de 96 o 384 pocillos, haciéndolo flexibles para el cribado de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés) automatizado. Véase Cree y col. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404. El procedimiento del ensayo conlleva la adición de un único reactivo (reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivadas. Esto da lugar a lisis celular y a la generación de una señal luminiscente producida por una reacción de la luciferasa. La señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente, que es directamente proporcional al número de células viables presente en el cultivo. Los datos pueden ser registrados por un luminómetro o por un dispositivo de captación de imágenes con cámara CCD. El resultado de la luminiscencia se expresa como unidades relativas de luz (URL).

50 [0124] En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para tratar un cáncer gástrico, comprendiendo el tratamiento la administración al individuo que tiene el cáncer gástrico una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones o formulaciones farmacéuticas anteriores. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un antagonista de c-Myb. En determinadas realizaciones, el cáncer gástrico se asocia con la amplificación y/o sobreexpresión del gen c-Myb. En determinadas realizaciones, el individuo es un modelo animal no humano para el cáncer gástrico. Los modelos murinos de cáncer gástrico se describen, por ejemplo, en McCarty y col. (2004) British Journal of Cancer 90:705-711. En determinadas realizaciones, el individuo es un humano. En determinadas realizaciones, una cantidad eficaz de la formulación farmacéutica da lugar a cualquiera de los siguientes efectos: reducción del número de células cancerosas o eliminación de las células cancerosas; reducción del tamaño del tumor; inhibición completa o parcial de la infiltración de las células cancerosas en órganos periféricos, incluyendo la expansión del cáncer a tejidos blandos y a los huesos; inhibición completa o parcial de las metástasis tumorales; inhibición completo o parcial del crecimiento tumoral y/o alivio completo o parcial de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer y reducción de la morbilidad y mortalidad.

65

- [0125]** En determinadas realizaciones, una composición o formulación farmacéutica según se proporciona anteriormente, se administra en combinación con al menos un agente terapéutico y/o adyuvante adicionales. En determinadas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico o un agente de inhibición del crecimiento. En una de estas realizaciones, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes utilizado en el tratamiento del cáncer gástrico. Entre estos agentes se incluyen, pero sin limitaciones, fluorouracilo (5-FU), ácido folínico, heptaplatino, cisplatino, taxanos, camptotecinas, fluoropirimidinas o combinaciones de los mismos.
- 10 **[0126]** Estas politerapias apuntadas anteriormente abarcan la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma formulación o en formulaciones independientes) y la administración independiente, en cuyo caso, la administración de un antagonista de c-Myb puede darse antes, simultáneamente y/o tras la administración del agente terapéutico y/o adyuvante adicionales. También puede usarse un antagonista de c-Myb en combinación con radioterapia.
- 20 **[0127]** Un agente comprendido en una composición o formulación farmacéutica descrita en este documento (y cualquier agente terapéutico o adyuvante adicionales) puede administrarse mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administraciones intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, un agente se administra de forma adecuada mediante infusión a intervalos, especialmente con la disminución de la dosis del agente. La administración puede ser por cualquier vía apropiada, por ejemplo, mediante inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.
- 25 **[0128]** Los procedimientos de terapia génica pueden usarse, p. ej., para administrar cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en este documento a las células *in vivo*. En determinadas realizaciones, un ácido nucleico codifica un polipéptido antagonista de c-Myb, p. ej., un anticuerpo que se une a c-Myb. Según una realización, se usa un agente de dirección para dirigir el vehículo que contiene el ácido nucleico a un tejido deseado.
- 30 **[0129]** En este momento, generalmente hay dos estrategias principales para introducir un ácido nucleico (contenido opcionalmente en un vector) dentro de las células de mamíferos: *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente dentro de un mamífero, normalmente en los lugares donde se desee el ácido nucleico y, si es aplicable, el polipéptido codificado. Para el tratamiento *ex vivo*, se retiran células del mamífero, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas se administran al mamífero directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el mamífero (véase, p. ej., las patentes de EE.UU. N° 4.892.538 y 5.283.187).
- 40 **[0130]** Existen diversas técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere a células cultivadas *in vitro* o se transfiere *in vivo* dentro de las células del hospedador deseado. Entre las técnicas adecuadas para la transferencia de ácidos nucleicos dentro de las células de mamífero *in vitro* se incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico, etc. La transducción supone la asociación de una partícula viral (incluyendo, pero sin limitaciones, retroviral) recombinante defectuosa para la replicación con un receptor celular, seguido de la introducción de los ácidos nucleicos contenidos en la partícula dentro de la célula. Un vector utilizado frecuentemente para la administración *ex vivo* de un ácido nucleico es un retrovirus.
- 50 **[0131]** Entre las técnicas de transferencia de ácido nucleico *in vivo* utilizadas frecuentemente se incluyen la transfección con vectores víricos o no víricos (como adenovirus, lentivirus, virus del Herpes simples I o virus adenoasociados (AAV) y sistemas a base de lípidos (los lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos de un ácido nucleico son, por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Col; véase, p. ej., Tonkinson y col., Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996)). Estos vectores se usan para sintetizar virus que pueden usarse como vehículos para los agentes de administración, como antagonistas y moléculas de ácido nucleico de esta invención. Los vectores utilizados más frecuentemente para su uso en terapia génica son virus, p. ej., adenovirus, AAV, lentivirus o retrovirus. En una realización, un vector vírico, como un vector retroviral, incluye al menos un promotor/potenciador de la transcripción o elementos que definen locus, u otros elementos que controlan la expresión génica mediante otros sistemas como el ajuste alternativo, exportación de ARN nuclear o modificación postraduccional del mensajero. Además, un vector vírico, como un vector retroviral, puede incluir una molécula de ácido nucleico que está unido de forma operativa a un ácido
- 65

nucleico de interés, y actúa como una secuencia de inicio de la traducción. Estas construcciones vectores también pueden incluir una señal de empaquetamiento, repeticiones terminales largas (LTR) o porciones de los mismos, y sitios de unión del cebador a las cadenas positiva o negativa apropiados para el virus utilizado (si no están presentes ya en el vector vírico). Además, estas construcciones

5 vectores pueden incluir una secuencia señal para la secreción del polipéptido codificado a partir de la célula hospedadora en la que se colocan. Opcionalmente, la construcción vector también puede incluir una señal que dirige la poliadenilación, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traducción. A modo de ejemplo, los vectores típicamente incluirán una LTR 5', un

10 sitio de unión del ARNt, una señal de empaquetamiento, una origen de síntesis de la segunda cadena de ADN y una LTR 3' o una porción de los mismos. Otros vectores que pueden usarse son no víricos, como lípidos catiónicos, polilisina y dendrímeros.

[0132] En determinadas situaciones, el vehículo utilizado para la administración de un ácido nucleico u otra molécula se asocia con un agente de dirección que dirige el vehículo a poblaciones

15 celulares específicas. En una realización, el agente de dirección es un anticuerpo específico para una proteína de membrana de la superficie celular en la célula diana, un ligando de un receptor en la célula diana, etc. Cuando se emplean liposomas, puede usarse proteínas que se unen a una proteína de membrana de la superficie celular asociada con la endocitosis para dirigir y/o facilitar la captación. La técnica de endocitosis mediada por receptor se describen, por ejemplo, en Wu y col., J. Biol. Chem.,

20 262: 4429-4432 (1987) y Wagner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 3410-3414 (1990).

[0133] Para una revisión de los protocolos de marcaje génico y de terapia génica conocidos actualmente, véase Anderson y col., Science, 256: 808-813 (1992). Véase también el documento WO 93/25673 y las referencias citadas en dicho documento. La terapia génica adecuada y los

25 procedimientos para obtener partículas retrovirales y proteínas estructurales pueden encontrarse en, p. ej., la patente de EE.UU. N° 5.681.746.

[0134] En determinadas realizaciones en las que el antagonista de c-Myb es un ácido nucleico complementario (p. ej., un ODN), pueden encontrarse consejos sobre dosis y administración *in vivo* de

30 ácidos nucleicos complementarios en Khan y col. (2004) J. Drug Targeting 12:393-404.

III. EJEMPLOS

A. Muestras

35 **[0135]** Se seleccionaron para análisis nueve tumores gástricos congelados frescos, cada uno de una muestra de un paciente diferente. Cinco de los nueve tumores eran tumores estromales gastrointestinales (GISTS) y cuatro de los nueve eran adenocarcinomas gástricos. Cada muestra tumoral tenía un contenido de células neoplásicas mayor del 75%, según la estimación de un

40 patólogo. Se extrajeron de cada tumor tanto el ARN como el ADN que se purificaron mediante procedimientos convencionales.

B. Análisis del número de copias de ADN

45 **[0136]** Se usó el juego de matrices para mapeo humano 500 K GeneChip® (Affimetrix, Santa Clara, CA) para medir los cambios en el número de copias de ADN en los tumores gástricos. El juego de matrices para mapeo humano 500K Gene Chip® consta de dos matrices (la matriz "Sty I" de 250 K y la matriz "Nsp I" de 250 K), conteniendo cada una sondas específicas para aproximadamente 250.000 PSN, para un total de aproximadamente 500.000 PSN. Los PSN se distribuyen a lo largo del

50 genoma permitiendo, de este modo, un análisis genómico del número de copias de ADN. Cada matriz del juego de matrices incluye más de 6,5 millones de caracteres, compuesto cada carácter de más de un 1 millón de copias de un oligonucleótido de 25 pb de secuencia definida.

[0137] Para cada muestra tumoral, el ADN se amplificó, marcó y digirió con Sty I o Nsp I según

55 los protocolos convencionales de Affymetrix y la preparación resultante se hibridó con ambas matrices del juego de matrices para mapeo humano 500K Gene Chip®.

[0138] La hibridación con las micromatrices se detectó según los protocolos convencionales de Affymetrix y se generaron valores de intensidad para cada carácter. Los valores de intensidad se

60 normalizaron con respecto a un juego de referencia de ADN genómico normal. A continuación, los caracteres se mapearon en el genoma humano. Así, los valores de intensidad normalizados reflejaban el número de copias de ADN en un locus genómico en particular.

[0139] En la figura 1 se muestran los resultados del análisis del número de copias en una

65 región del cromosoma 6. Las muestras se enumeran por el tipo de tumor (GIST o adenocarcinoma

("Adeno") y por su designación numérica (p. ej., "X31131") a la izquierda de la gráfica. La gráfica muestra los valores de intensidad normalizado del análisis del número de copias de ADN para cada tumor, con cada carácter representada como una línea vertical. Para cada tumor, las líneas verticales se dibujan a lo largo del eje horizontal, lo que representa una región del cromosoma 6 de aproximadamente 130.000.000 a 140.000.000 nucleótidos. La altura de cada línea vertical refleja el valor de intensidad normalizado, que es una característica del número de copias de ADN en ese punto del cromosoma. Se observó un pico de intensidad de señal entre 135.000.000 y 136.000.000 nucleótidos en dos de los cuatro adenocarcinomas X 10253 y X 10227. Los valores de intensidad normalizados para X 10253 y X 10227 aumentaron en al menos aproximadamente 5-10 veces en esta región.

c. Análisis de expresión

[0140] La matriz de genoma humano U133A 2.0 GeneChip® y la matriz de genoma humano U133 Plus 2.0 GeneChip® (Affymetrix, Santa Clara, CA) se usaron para medir la expresión de ARNm en X 102053 y X 10227. Las muestras de ARN purificado se transcribieron de forma inversa, amplificaron, marcaron y, por otro lado, trataron según los protocolos convencionales de Affymetrix y se hibridaron con una u otra de las matrices. La hibridación con las matrices se detectó según los protocolos convencionales de Affymetrix y se generaron para cada carácter valores de intensidad. El valor de intensidad para cada carácter se normalizó con respecto a la mediana de intensidad de dicho carácter a lo largo de todas las muestras del tumor. A continuación, los caracteres se mapearon en las regiones codificadoras correspondientes en el genoma. Por tanto, los valores de intensidad normalizados reflejaban los niveles de expresión de ARNm de cada carácter y cada carácter se correlacionaba con una posición en particular en el genoma.

[0141] En la Figura 2 se muestra los resultados del análisis del número de copia (tomado de la Figura 1) y el análisis de la expresión de ARNm para X 10253 y X 10227. Para el análisis de expresión, se muestran los valores de intensidad normalizados correspondientes a los niveles de expresión de ARNm como líneas verticales a lo largo de los ejes horizontales que representan la región indicada del cromosoma 6. La altura de cada línea vertical refleja el nivel de expresión del ARNm relativo para cada carácter. Las regiones codificadoras de genes conocidos porque mapean en la región indicada del cromosoma 6 se muestran debajo del número de copias y de los ejes de expresión. Por tanto, en la Figura 2 se muestran el número de copias y los niveles relativos de expresión del ARNm correspondientes a regiones codificadoras que se encuentran dentro de la región indicada del cromosoma 6.

[0142] El gen c-Myb se encuentra completamente dentro de la región de aumento del número de copias entre 135.000.000 y 136.000.000 nucleótidos en X 10253 y X 10227. El aumento en el número de copias de ADN del gen c-Myb se correlaciona con una notable sobreexpresión (al menos aproximadamente una sobreexpresión de 5-10 veces) del transcrito de c-Myb.

[0143] El alto nivel de amplificación del gen c-Myb sugiere que un aumento en el número de copias de este gen produce sobreexpresión del protooncogen codificado promoviendo, de este modo, el crecimiento y proliferación de células tumorales gástricas. La sobreexpresión observada del ARNm de c-Myb concuerda con esta conclusión.

[0144] Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplos con el fin de la claridad en la comprensión, las descripciones y ejemplos no se interpretarán como limitantes del alcance de la invención.

Listado de secuencias

[0145]
 <110> Genentech, Inc.
 55 Chant, John
 Guerrero, Anthony S.
 Haverty, Peter
 Honchell, Cynthia
 Jung, Kenneth
 60 Wu, Thomas
 <120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL CÁNCER
 <130> P2386R1 WO
 <140> PTUS0773811
 65 <141> 18-07-2007

ES 2 361 950 T3

<150>US 60/807,794
 <151> 19-07-2006
 <160> 1
 <210> 1
 5 <211> 640
 <212> PROT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 1

```

Met Ala Arg Arg Pro Arg His Ser Ile Tyr Ser Ser Asp Glu Asp
  1                               10 15

Asp Glu Asp Phe Glu Met Cys Asp His Asp Tyr Asp Gly Leu Leu
                               20 25 30

Pro Lys Ser Gly Lys Arg His Leu Gly Lys Thr Arg Trp Thr Arg
                               35 40 45

Glu Glu Asp Glu Lys Leu Lys Lys Leu Val Glu Gln Asn Gly Thr
                               50 55 60

Asp Asp Trp Lys Val Ile Ala Asn Tyr Leu Pro Asn Arg Thr Asp
                               65 70 75

Val Gln Cys Gln His Arg Trp Gln Lys Val Leu Asn Pro Glu Leu
                               80 85 90

Ile Lys Gly Pro Trp Thr Lys Glu Glu Asp Gln Arg Val Ile Glu
                               95 100 105

Leu Val Gln Lys Tyr Gly Pro Lys Arg Trp Ser Val Ile Ala Lys
                               110 115 120

His Leu Lys Gly Arg Ile Gly Lys Gln Cys Arg Glu Arg Trp His
                               125 130 135
    
```

ES 2 361 950 T3

Asn	His	Leu	Asn	Pro	Glu	Val	Lys	Lys	Thr	Ser	Trp	Thr	Glu	Glu
			140						145					150
Glu	Asp	Arg	Ile	Ile	Tyr	Gln	Ala	His	Lys	Arg	Leu	Gly	Asn	Arg
			155						160					165
Trp	Ala	Glu	Ile	Ala	Lys	Leu	Leu	Pro	Gly	Arg	Thr	Asp	Asn	Ala
			170						175					180
Ile	Lys	Asn	His	Trp	Asn	Ser	Thr	Met	Arg	Arg	Lys	Val	Glu	Gln
			185						190					195
Glu	Gly	Tyr	Leu	Gln	Glu	Ser	Ser	Lys	Ala	Ser	Gln	Pro	Ala	Val
			200						205					210
Ala	Thr	Ser	Phe	Gln	Lys	Asn	Ser	His	Leu	Met	Gly	Phe	Ala	Gln
			215						220					225
Ala	Pro	Pro	Thr	Ala	Gln	Leu	Pro	Ala	Thr	Gly	Gln	Pro	Thr	Val
			230						235					240
Asn	Asn	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	His	Ile	Ser	Glu	Ala	Gln	Asn	Val
			245						250					255
Ser	Ser	His	Val	Pro	Tyr	Pro	Val	Ala	Leu	His	Val	Asn	Ile	Val
			260						265					270
Asn	Val	Pro	Gln	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ile	Gln	Arg	His	Tyr	Asn
			275						280					285
Asp	Glu	Asp	Pro	Glu	Lys	Glu	Lys	Arg	Ile	Lys	Glu	Leu	Glu	Leu
			290						295					300
Leu	Leu	Met	Ser	Thr	Glu	Asn	Glu	Leu	Lys	Gly	Gln	Gln	Val	Leu
			305						310					315
Pro	Thr	Gln	Asn	His	Thr	Cys	Ser	Tyr	Pro	Gly	Trp	His	Ser	Thr
			320						325					330
Thr	Ile	Ala	Asp	His	Thr	Arg	Pro	His	Gly	Asp	Ser	Ala	Pro	Val
			335						340					345
Ser	Cys	Leu	Gly	Glu	His	His	Ser	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Ala	Asp
			350						355					360
Pro	Gly	Ser	Leu	Pro	Glu	Glu	Ser	Ala	Ser	Pro	Ala	Arg	Cys	Met
			365						370					375
Ile	Val	His	Gln	Gly	Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Val	Lys	Asn	Leu	Leu
			380						385					390
Glu	Phe	Ala	Glu	Thr	Leu	Gln	Phe	Ile	Asp	Ser	Phe	Leu	Asn	Thr
			395						400					405
Ser	Ser	Asn	His	Glu	Asn	Ser	Asp	Leu	Glu	Met	Pro	Ser	Leu	Thr
			410						415					420

ES 2 361 950 T3

Ser Thr Pro Leu Ile Gly His Lys Leu Thr Val Thr Thr Pro Phe
 425 430 435

His Arg Asp Gln Thr Val Lys Thr Gln Lys Glu Asn Thr Val Phe
 440 445 450

Arg Thr Pro Ala Ile Lys Arg Ser Ile Leu Glu Ser Ser Pro Arg
 455 460 465

Thr Pro Thr Pro Phe Lys His Ala Leu Ala Ala Gln Glu Ile Lys
 470 475 480

Tyr Gly Pro Leu Lys Met Leu Pro Gln Thr Pro Ser His Leu Val
 485 490 495

Glu Asp Leu Gln Asp Val Ile Lys Gln Glu Ser Asp Glu Ser Gly
 500 505 510

Ile Val Ala Glu Phe Gln Glu Asn Gly Pro Pro Leu Leu Lys Lys
 515 520 525

Ile Lys Gln Glu Val Glu Ser Pro Thr Asp Lys Ser Gly Asn Phe
 530 535 540

Phe Cys Ser His His Trp Glu Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gln Leu
 545 550 555

Phe Thr Gln Thr Ser Pro Val Ala Asp Ala Pro Asn Ile Leu Thr
 560 565 570

Ser Ser Val Leu Met Ala Pro Ala Ser Glu Asp Glu Asp Asn Val
 575 580 585

Leu Lys Ala Phe Thr Val Pro Lys Asn Arg Ser Leu Ala Ser Pro
 590 595 600

Leu Gln Pro Cys Ser Ser Thr Trp Glu Pro Ala Ser Cys Gly Lys
 605 610 615

Met Glu Glu Gln Met Thr Ser Ser Ser Gln Ala Arg Lys Tyr Val
 620 625 630

Asn Ala Phe Ser Ala Arg Thr Leu Val Met
 635 640

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diagnosticar la presencia de un cáncer gástrico en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la detección de si el gen c-Myb está amplificado en una muestra gástrica de ensayo del mamífero en relación con una muestra control, donde la amplificación del gen c-Myb indica la presencia de cáncer gástrico en el mamífero.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que detectar si el gen c-Myb está amplificado comprende detectar si el número de copias del gen c-Myb está aumentado en al menos 5 veces.
3. Un procedimiento para diagnosticar la presencia de un cáncer gástrico en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la detección de la expresión del gen c-Myb en una muestra gástrica de ensayo de un mamífero donde un nivel más alto de expresión del gen c-Myb en la muestra gástrica de ensayo en relación con una muestra control indica la presencia de cáncer gástrico en el mamífero.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la detección de la expresión del gen c-Myb comprende determinar el nivel de transcripción del ARNm del gen c-Myb.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que un nivel más alto de expresión del gen c-Myb comprende un aumento de al menos 5 veces en la transcripción del ARNm del gen c-Myb en la muestra gástrica de ensayo en relación con la muestra control.
6. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la detección de la expresión del gen c-Myb comprende determinar el nivel de c-Myb.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la detección de la expresión del gen c-Myb comprende poner en contacto la muestra gástrica de prueba con un anticuerpo anti-c-Myb y determinar el nivel de expresión de c-Myb en la muestra gástrica de prueba detectando la unión del anticuerpo anti-c-Myb a c-Myb.
8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que un nivel más alto de expresión del gen c-Myb comprende un aumento de al menos 5 veces en los niveles de c-Myb.
9. Un antagonista de c-Myb para su uso en un procedimiento para tratar un cáncer gástrico asociado con la amplificación o sobreexpresión del gen c-Myb, comprendiendo el procedimiento administrar al individuo que tiene el cáncer gástrico una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende el antagonista de c-Myb, donde el antagonista de c-Myb se selecciona entre: un ácido nucleico antisentido que se une al ácido nucleico que codifica c-Myb; un ácido nucleico que se une al dominio de unión a ADN de c-Myb; un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une a c-Myb y un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a c-Myb.
10. El antagonista de c-Myb para su uso según la reivindicación 9, en el que el antagonista de c-Myb es un ácido nucleico complementario de 10-30 nucleótidos de longitud que se une y reduce la expresión de un ácido nucleico que codifica para c-Myb.
11. El antagonista de c-Myb para su uso según la reivindicación 10, en el que el ácido nucleico antisentido es un oligodesoxinucleótido.
12. El antagonista de c-Myb para su uso según la reivindicación 9, en el que el antagonista de c-Myb es un ácido nucleico que se une a dominio de unión a ADN de c-Myb.
13. El antagonista de c-Myb para su uso según la reivindicación 9, en el que el antagonista de c-Myb es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
14. El antagonista de c-Myb para su uso según la reivindicación 13, en el que el fragmento de anticuerpo que se une a c-Myb es un scFV.
15. Un procedimiento para determinar si un individuo que tiene cáncer gástrico responderá a un agente terapéutico dirigido a c-Myb o al gen c-Myb, comprendiendo el procedimiento la determinación de si el gen c-Myb está amplificado en el cáncer gástrico, donde la amplificación del gen c-Myb indica que el individuo responderá al agente terapéutico.
16. El procedimiento de la reivindicación 15, el agente terapéutico se selecciona entre un

ácido nucleico complementario, un ácido nucleico que se une al dominio de unión a ADN de c-Myb, una molécula orgánica pequeña que se une a c-Myb y un ácido nucleico que codifica un anticuerpo que se une a c-Myb.

5

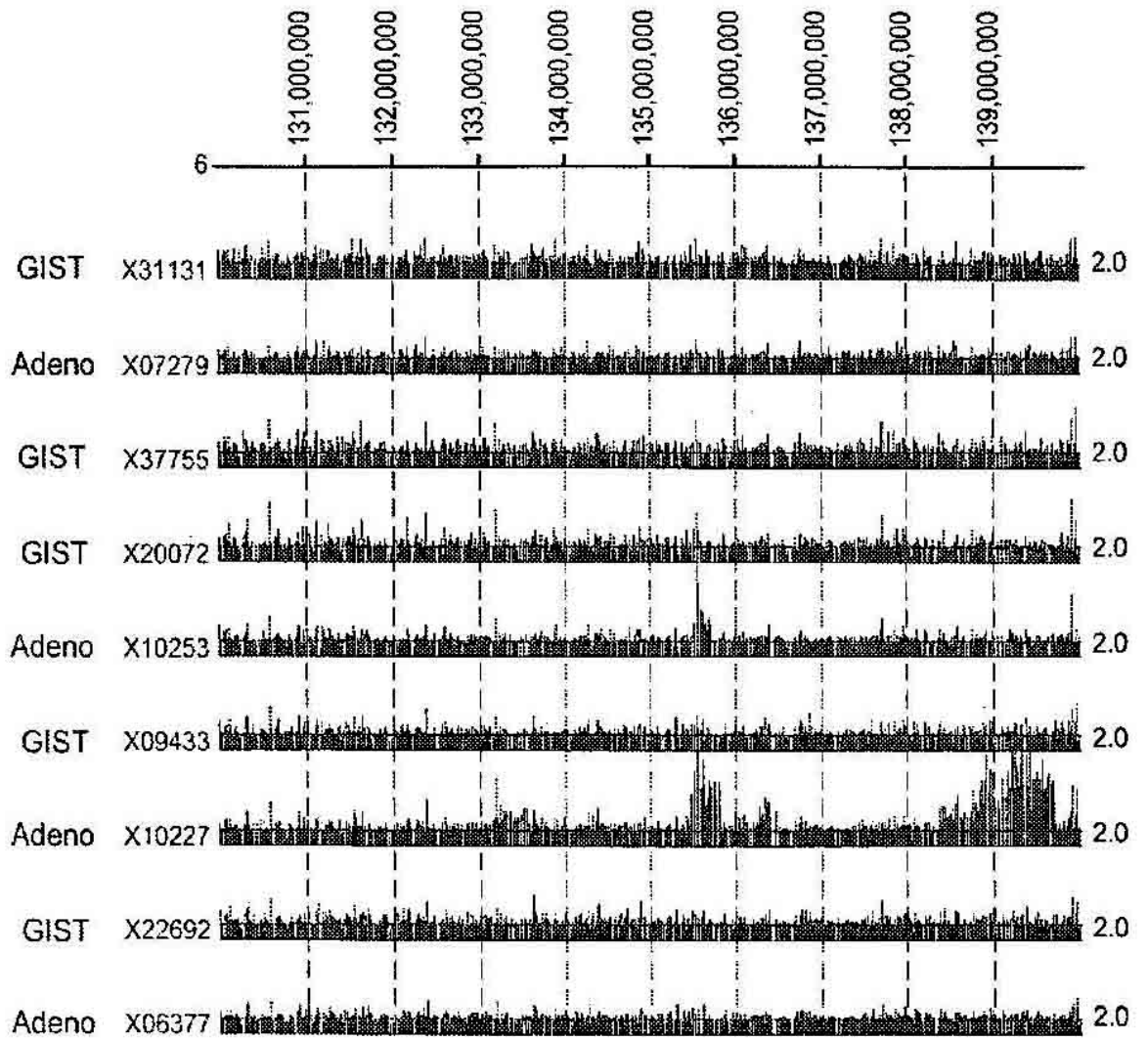


FIG. 1

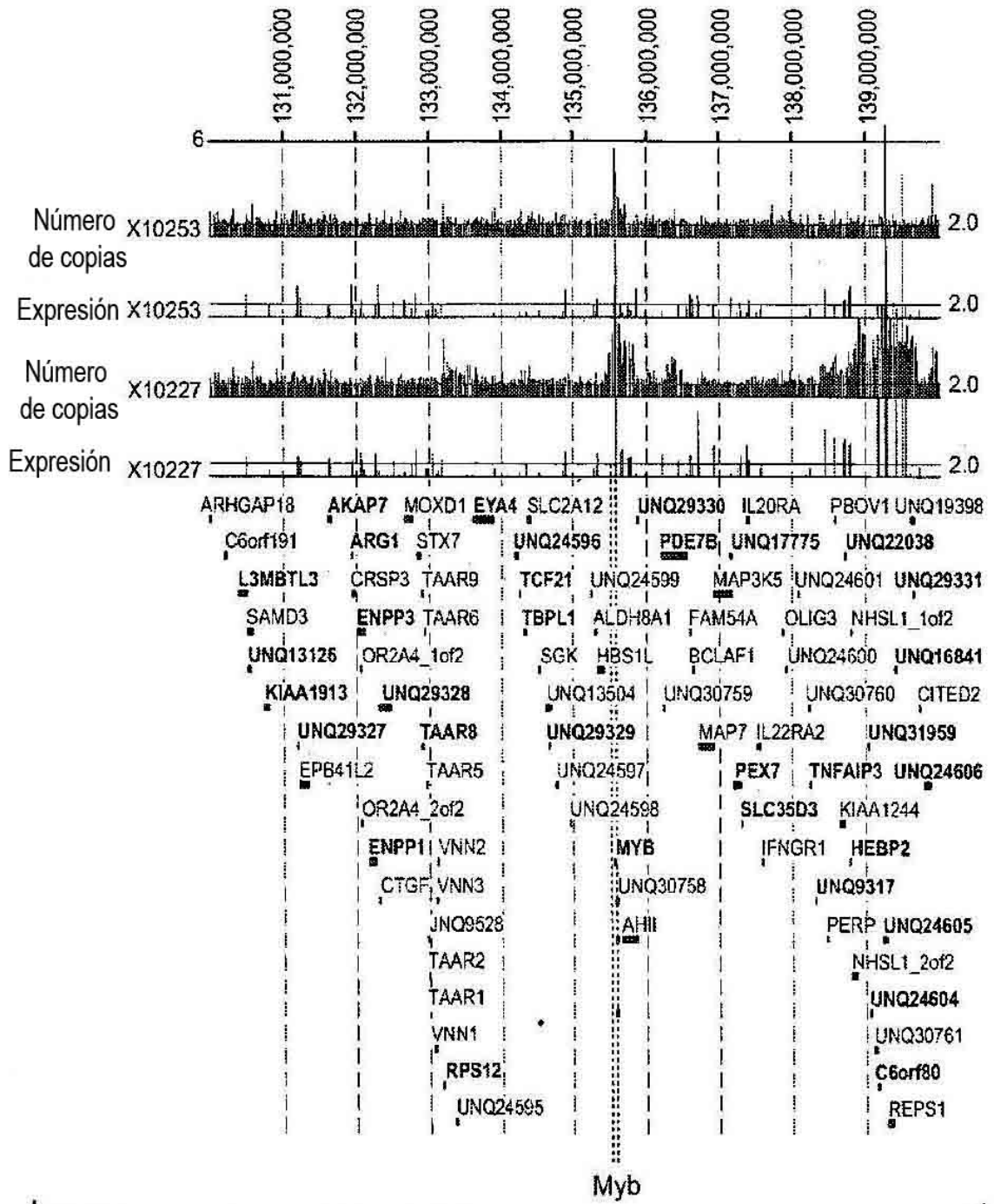


FIG. 2