

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 306**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05722705 .0**
96 Fecha de presentación: **03.02.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1718767**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.11.2006**

54 Título: **Composiciones para el tratamiento del cáncer de mama y de páncreas**

30 Prioridad:
03.02.2004 US 541527 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.06.2012

73 Titular/es:
**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN
1214 SOUTH UNIVERSITY AVENUE, 2ND FLOOR
ANN ARBOR, MI 48104-2592, US**

72 Inventor/es:
**CLARKE, Michael, F. y
AL-HAJJ, Muhammad**

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 383 306 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

Composiciones para el tratamiento del cáncer de mama y de páncreas

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento del cáncer. La presente invención proporciona composiciones para inhibir la oncogénesis de ciertas clases de células tumorales, incluyendo células de

10

ANTECEDENTES

[0002] El cáncer es una de las causas que provoca la muerte, y el cáncer metastásico es a menudo incurable. Aunque las terapias actuales pueden producir la regresión tumoral, raramente curan tumores habituales tales como el cáncer de mama metastásico. Los tumores sólidos consisten en poblaciones heterogéneas de células cancerosas. Como la leucemia mieloide aguda (*acute myeloid leukemia*, AML)⁷, recientemente se ha demostrado que en la mayoría de los tumores de mama humanos malignos, una pequeña población definida de células tumorales está enriquecida en su capacidad de formar tumores en ratones inmunodeficientes¹. Previamente se demostró que en 8 de cada 9 de los tumores estudiados, la población CD44⁺ CD24^{-/low} Linaje⁻ tenía la capacidad de formar tumores cuando se inyectaba en ratones inmunodeficientes. Tan pocas como 200 de estas células, denominadas células "oncogénicas", formaban sistemáticamente tumores en ratones. Por el contrario, la mayoría de las células tumorales de un tumor consistía en células "no oncogénicas" con fenotipos alternativos. Estas células no conseguían formar tumores en ratones NOD / SCID incluso cuando se inyectaban tantas como 10⁴ (1). En algunos tumores era posible un enriquecimiento adicional de las células tumorales aislando la población ESA⁺ CD44⁺ CD24^{-/low} Linaje⁻ de células tumorales. La capacidad de aislar prospectivamente las células tumorales congénitas permite la investigación de vías biológicas críticas que representan objetivos terapéuticos en estas células. La materia tiene una necesidad de sistemas y procedimientos adicionales para caracterizar, regular, diagnosticar y tratar el cáncer.

15

20

25

30

[0003] El documento WO02 / 1854 desvela un procedimiento y reactivos para la formación de una barrera epitelial y el tratamiento de alteraciones cutáneas malignas y benignas mediante la modulación de la vía Notch.

35

[0004] El documento WO03 / 050502 informaba de que los tumores de mama humanos contenían células tumorales heterogéneas. Usando un modelo de xenoinjerto se demostró que únicamente una pequeña minoría de las células tumorales de mama tenía la capacidad de formar nuevos tumores. Las células oncogénicas podrían distinguirse de las células tumorales no oncogénicas según la expresión de los marcadores de superficie. Se informó de que la activación de Notch promovía la supervivencia de las células oncogénicas, y un anticuerpo bloqueante contra Notch4 provocaba que las células tumorales oncogénicas de mama experimentaran apoptosis.

40

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0005] La Figura 1 muestra la señalización Notch en células tumorales de mama. La Figura 1A muestra que Delta soluble promueve la formación de colonias. Se clasificaron células tumorales oncogénicas de mama ESA⁺ CD44⁺ CD24^{-/low} Linaje T1 y se colocaron en placas recubiertas de colágeno en medio de cultivo tisular solo (control), medio complementado con el fragmento de control Fc¹¹ (Fc), o medio complementado con Delta-Fc (Delta). El cultivo de células con Delta-Fc soluble dio como resultado 5 veces más colonias que cualquiera de las células de control o de las células tratadas sólo con el fragmento de control Fc¹¹. La Figura 1B muestra la inhibición de la señalización Notch por un vector de adenovirus dominante negativo. Se transfectaron de forma estable células MCF-7 con un minigen de luciferasa bajo la regulación del promotor HES-1 que responde a Notch³⁸. Entonces se midió la actividad de la luciferasa en las células de control MCF-7 cultivadas en un medio que contenía Delta-Fc sin virus (control) o 48 horas después de la infección únicamente con un adenovirus GFP (Ad-GFP) o con el vector adenovirico dominante negativo dnMAML1 (Ad-GFP-dnMAML1). El adenovirus Ad-GFP-dnMAML1, pero no el adenovirus Ad-GFP, disminuyó significativamente la actividad de la luciferasa. La Figura 1C muestra ese efecto de la regulación por disminución de la transcripción en el receptor Notch en las células de un tumor primario. Se clasificaron células tumorales ESA⁺ CD44⁺ CD24^{-/low} Linaje¹ (T1) o células tumorales de linaje de diferentes pacientes (T2-T5) en placas de cultivo tisular de 12 pocillos recubiertas con colágeno. Las células se infectaron con el constructo adenovirico dominante negativo o el virus de control GFP según se ha indicado. Se usó una exclusión mediante trypan blue para contar las células viables 48 horas después de la infección. El dnMAML1 disminuye significativamente el número de células viables en T1, T2, T4 y T5, mientras que tiene menos efecto en las células T3. La Figura 2 muestra la señalización Notch4 en células tumorales oncogénicas de mama. La Figura 2A muestra los resultados de un ensayo con un gen indicador de la vía Notch. Se midió la actividad de la luciferasa en extractos obtenidos a partir de células MCF-7 transfectadas de forma estable con un gen indicador HES-1 / luciferasa que había sido incubado con el fragmento de control Fc (Fc), Delta-Fc soluble (+ Delta), Delta-Fc soluble y un anticuerpo policlonal anti-Notch4 (+ N4Ab) o con Delta-Fc soluble, se creó el anticuerpo policlonal anti-Notch4 así como el péptido bloqueante contra el anticuerpo policlonal (+ Block). El anticuerpo anti-Notch4 inhibía la actividad de la luciferasa, y esta inhibición era parcialmente revertida mediante una de incubación del anticuerpo bloqueante con el péptido bloqueante. La Figura 2B muestra la expresión de Notch4 por parte de células tumorales de mama. Se

45

50

55

60

65

analizaron mediante RT-PCR células tumorales y oncogénicas no clasificadas ($CD44^+ CD24^{-/low}$ Linaje⁻) T1 que habían sido pasadas una vez en ratones NOD / SCID para conocer la expresión de Notch4. También se realizó una RT-PCR para confirmar que las células MCF-7 que se usaron expresaban el ARNm de Notch4. La Figura 2C muestra la formación de colonias. Se hicieron crecer 20.000 células tumorales T1 ó T4 durante 14 días en el medio de cultivo tisular indicado que contenía bien Delta-Fc (+ Delta) o bien el fragmento Fc solo (+ Fc). Se realizaron cultivos por triplicado usando el medio indicado complementado con ningún anticuerpo (+ Delta), con el anticuerpo policlonal anti-Notch4 (+ N4Ab) o con el anticuerpo anti-Notch4 más péptido bloqueante (+ N4Ab + Block). La Figura 2D muestra fotografías representativas de colonias que se formaron después de 14 días en cada condición (objetivo 10x), y la tabla indica el número de colonias contadas en cada pocillo. Delta-Fc soluble estimuló la formación de colonias ($p < 0,001$), mientras que el anticuerpo policlonal anti-Notch4 inhibió la formación de colonias en presencia de Delta-Fc ($p < 0,001$). Cuando el anticuerpo se preincubó con el péptido usado para generar el anticuerpo anti-Notch4, el efecto inhibitor del anticuerpo era casi completamente revertido ($p < 0,001$). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. La Figura 2E muestra células oncogénicas $ESA^+ CD44^+ CD24^{-/low}$ Linaje⁻ que fueron aisladas a partir de un tumor T1 de primer o segundo paso. Se inyectaron 200 células en el área de las almohadillas grasas mamarias de ratones en tampón de control o después de haber sido incubadas con un anticuerpo policlonal anti-Notch4. La formación del tumor se controló durante un periodo de cinco meses. Los resultados proceden de 2 experimentos independientes.

La Figura 3 muestra un mecanismo de apoptosis. La Figura 3A muestra la viabilidad de células tumorales tratadas con el anticuerpo anti-Notch4. Se cultivaron células oncogénicas $ESA^+ CD44^+ CD24^{-/low}$ Linaje⁻ del Tumor 1 (T1) o células MCF-7 con el anticuerpo anti-Notch4 durante 48 horas. Las células se recogieron y se tiñeron con PI, y la viabilidad se midió mediante citometría de flujo. La Figura 3B muestra la activación de la caspasa por el anticuerpo anti-Notch4. Se cultivaron células oncogénicas $ESA^+ CD44^+ CD24^{-/low}$ Linaje del Tumor 1 (T1), células H2K⁻ del Tumor 4 (T4) o células del Tumor 5 (T5), o células MCF-7 en medio de control (-) o en medio con el anticuerpo anti-Notch4 (+), y 36 horas después se midió la caspasa activada 3 / 7 mediante citometría de flujo usando un sustrato fluorescente CaspoTagTM. Tras la exposición al anticuerpo anti-Notch4, el porcentaje de células que expresaban la caspasa activada 3 / 7 aumentó notablemente en las células iniciadoras del tumor T1, en las células T5 y en las células MCF-7 en comparación con las células de control. Las células T4 no mostraron el mayor nivel de activación de la caspasa. Las Figuras 3C y 3D muestran el efecto de la inhibición de la transactivación transcripcional de Notch sobre células MCF-7. Se infectaron células naturales MCF-7, células MCF-7 que habían sido transfectadas de forma estable con Bcl-X_L, o un FADD dominante negativo (dnFADD) con el dnMAML1 o con un adenovirus GFP de control. Después de 48 horas, el porcentaje de células viables que habían sido infectadas con el dnMAML1 AD con respecto a las células infectadas con el adenovirus de control se muestra en la Figura 3C. La Figura 3D muestra una microfotografía (objetivo 20x) de cada tipo celular infectado bien con el GFP de control o bien con el adenovirus GFP-dnMAML1, según se indicó. La Figura 3E muestra el nivel de expresión de dnFADD y BCL-X_L en las líneas celulares de MCF-7. Se realizaron inmunotransferencias Western para determinar la expresión de la proteína indicada por las células MCF-7 parentales (MCF-7wt), por las células MCF-7 transfectadas con minigenes que expresaban el FADD dominante negativo (MCF-7dnFADD) o por dos clones diferentes transfectados con BCL-X_L (MCF-7-BCL-X_L-c1 y MCF-7-BCL-X_L-c2). Las células 293T transfectadas con BCL-X_L marcado con FLAG sirven como control positivo de la expresión de BCL-X_L. El dnMAML1 disminuye significativamente el número de células viables en la línea celular parental MCF-7 así como la línea celular MCF-7 / dnFADD, mientras que sólo tienen un mínimo efecto sobre las dos líneas celulares MCF-7 / Bcl-X_L.

La Figura 4 muestra el aislamiento de células tumorales oncogénicas y no oncogénicas. Se usó citometría de flujo para aislar las subpoblaciones del Tumor 1 (a, b, c) o del Tumor 4 (d, e, f) que habían sido ensayadas previamente, para evaluar su oncogenicidad en ratones NOD / SCID¹. Las células se tiñeron con anticuerpos contra ESA, CD44, CD24, marcadores de Linaje, H2K de ratón (para tumores de pasos obtenidos de ratones) y 7AAD. Se eliminaron las células muertas (7AAD⁺), las células de ratón (H2K⁺) y las células normales de todos los análisis. Cada punto representa los patrones de tinción de ESA CD24 de células tumorales vivas del Linaje⁻. Se muestran los nuevos análisis de las poblaciones de células clasificadas como oncogénicas (c, f) y no oncogénicas (b, e). Las células oncogénicas se aislaron según la expresión detectable de CD44 (gates no mostradas). La población de células T4 $ESA-CD24^{-/low}CD44^+$ Linaje⁻ se había reducido, pero estaba presente el potencial oncogénico¹.

La Figura 5 muestra la inhibición por adenovirus de la señalización Notch, mostrando una representación del constructo vírico Ad-GFP-dnMAML1. Se clonó la región codificante de los aminoácidos 1-302 del MAML1 humano en el vector MSCVneoEB secuencia arriba del gen IRES-GFP. El fragmento dnMAML1-IRES-GFP se clonó entonces en el vector lanzadera del adenovirus pACCMV2 en los sitios EcoRI y BamHI.

La Figura 6 muestra un gráfico que muestra el efecto del inhibidor de la γ -secretasa sobre la viabilidad de las células MCF-7 y la activación del receptor Notch. La viabilidad celular se ensayó colocando en placas por triplicado 20.000 células MCF-7 que demuestran expresar Notch en placas de 6 pocillos. 48 horas después, se añadieron cantidades variables del inhibidor de la γ -secretasa a las células. Se contaron las células totales y las negativas en trypan blue (viables) 24 horas después y se determinó el % de viabilidad celular. Se cocultivaron células MCF-7 transfectadas de forma estable con el gen indicador de la luciferasa bajo el control del promotor HES-1 en placas de 6 pocillos con concentraciones variables del inhibidor de la γ -secretasa, como anteriormente. La transactivación o la supresión del promotor HES1 se controló con un ensayo estándar de luciferasa. El inhibidor de la γ -secretasa suprime claramente

la expresión del receptor Notch y disminuye significativamente la viabilidad de las células. Estos resultados demuestran que los inhibidores de la y-secretasa hallan uso en la inhibición del Notch de las células tumorales oncogénicas.

- 5 La Figura 7 muestra un gráfico del porcentaje de células viables para las células tumorales cultivadas tratadas con y sin inhibidores de la y-secretasa.

DEFINICIONES

- 10 **[0006]** Para facilitar una comprensión de la presente invención, a continuación se definen varios términos y frases:

15 **[0007]** Según se usa en este documento, los términos "agente antitumoral", "agente antitumoral convencional" o "fármaco terapéutico antitumoral" se refieren a cualquier agente terapéutico (por ejemplo, compuestos quimioterapéuticos y / o compuestos terapéuticos moleculares), terapias de radiación o intervenciones quirúrgicas, usados en el tratamiento del cáncer (por ejemplo, en mamíferos).

20 **[0008]** Según se usa en este documento, los términos "fármaco" y "agente quimioterapéutico" se refieren a moléculas farmacológicamente activas que se usan para diagnosticar, tratar o prevenir enfermedades o estados patológicos en un sistema fisiológico (por ejemplo, un sujeto, o células, tejidos y órganos *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*). Los fármacos actúan alterando la fisiología de un organismo, tejido, o célula vivos, o de un sistema *in vitro* al cual se ha administrado el fármaco. Se pretende que los términos "fármaco" y "agente quimioterapéutico" engloben compuestos anti-hiperproliferativos y antineoplásicos, así como otros compuestos biológicamente terapéuticos.

25 **[0009]** Según se usa en este documento, el término "profármaco" se refiere a un derivado farmacológicamente inactivo de una molécula "fármaco" parental que requiere una biotransformación (por ejemplo, espontánea o enzimática) en el sistema fisiológico objetivo para liberar o para convertir (por ejemplo, enzimáticamente, mecánicamente, electromagnéticamente, etc.) el "profármaco" en el "fármaco" activo. Los "profármacos" están diseñados para superar los problemas asociados con la estabilidad, la toxicidad, la ausencia de especificidad o la biodisponibilidad limitada. Algunos ejemplos de "profármacos" comprenden la propia molécula de "fármaco" activa y un grupo enmascarante químico (por ejemplo, un grupo que suprime de forma reversible la actividad del "fármaco"). Algunos "profármacos" preferidos son variaciones o derivados de compuestos que tienen grupos escindibles en condiciones metabólicas. Algunos ejemplos de "profármacos" se vuelven farmacéuticamente activos *in vivo* o *in vitro* cuando experimentan una solvolisis en condiciones fisiológicas, o experimentan una degradación enzimática u otra transformación bioquímica (por ejemplo, fosforilación, hidrogenación, deshidrogenación, glucosilación, etc.). Los profármacos ofrecen a menudo las ventajas de solubilidad, compatibilidad tisular o liberación retardada en el organismo del mamífero. (véase, por ejemplo, Bundgard, Design of Profármacos, págs. 7-9, 21-24, Elsevier, Ámsterdam (1985); y Silverman, The Organic Chemistry of Fármaco Design y Fármaco Action, págs. 352-401, Academic Press, San Diego, CA (1992)). Los "profármacos" comunes incluyen derivados de ácidos tales como ésteres preparados mediante reacción de los ácidos parentales con un alcohol adecuado (por ejemplo, un alcohol inferior), amidas preparadas mediante la reacción del compuesto ácido parental con una amina (por ejemplo, según se describió anteriormente), o grupos básicos que reaccionan para formar un derivado acetilado de una base (por ejemplo, una alquilamida inferior).

45 **[0010]** Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones.

50 **[0011]** Según se usa en este documento, el término "administración" se refiere al acto de dar un fármaco, un profármaco, un anticuerpo u otro agente, o un tratamiento terapéutico, a un sistema fisiológico (por ejemplo, un sujeto, o células, tejidos y órganos *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*). Algunos ejemplos de vías de administración en el cuerpo humano pueden ser a través de los ojos (oftálmica), de la boca (oral), de la piel (transdérmica), de la nariz (nasal), de los pulmones (inhalatoria), de la mucosa oral (bucal), del ojo, mediante inyección (por ejemplo, intravenosamente, subcutáneamente, intratumoralmente, intraperitonealmente, etc.) y similares.

55 **[0012]** La "coadministración" se refiere a la administración de más de un agente químico o tratamiento terapéutico (por ejemplo, terapia de radiación) a un sistema fisiológico (por ejemplo, un sujeto, o células, tejidos y órganos *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*). La "coadministración" de los respectivos agentes químicos y tratamientos terapéuticos (por ejemplo, terapia de radiación) puede ser concurrente o en cualquier orden temporal o combinación física.

60 **[0013]** Según se usa en este documento, el término "biodisponibilidad" se refiere a cualquier medida de la capacidad de un agente para ser absorbido en un fluido (por ejemplo, sangre, citoplasma, líquido cefalorraquídeo y similares), tejido, orgánulo o espacio intercelular objetivo biológico tras su administración a un sistema fisiológico (por ejemplo, un sujeto, o células, tejidos y órganos *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*).

65 **[0014]** Según se usa en este documento, el término "biodistribución" se refiere a la ubicación de un agente en

orgánulos, células (por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*), tejidos, órganos u organismos, después de su administración a un sistema fisiológico.

[0015] Una "enfermedad hiperproliferativa", según se usa en este documento, se refiere a cualquier dolencia en la que una población localizada de células en proliferación en un animal no está gobernada por las limitaciones habituales del crecimiento normal. Algunos ejemplos de alteraciones hiperproliferativas incluyen tumores, neoplasmas, linfomas y similares. Se dice que un neoplasma es benigno si no experimenta invasión o metástasis, y maligno si hace alguna de ellas. Una célula o tejido "metastásico" significa que la célula puede invadir y destruir estructuras corporales adyacentes. La hiperplasia es una forma de proliferación celular que implica un incremento en el número de células en un tejido órgano sin una alteración significativa en su estructura o función. La metaplasia es una forma de crecimiento celular controlado en el que un tipo de células completamente diferenciadas sustituye a otro tipo de células diferenciadas. La metaplasia puede producirse en células del tejido epitelial o conectivo. Una metaplasia típica implica un epitelio un tanto desordenadamente metaplásico.

[0016] Según se usa en este documento, el término "enfermedad neoplásica" se refiere a cualquier crecimiento anormal de células o tejidos ya sea benigno (no canceroso) o maligno (canceroso).

[0017] Según se usa en este documento, el término "agente antineoplásico" se refiere a cualquier compuesto que retrasa la proliferación, el crecimiento o la expansión de un neoplasma objetivo (por ejemplo, maligno).

[0018] Según se usa en este documento, el término "regresión" se refiere al retorno de un sujeto, célula, tejido u órgano enfermo a un estado no patológico o menos patológico en comparación con el sujeto, célula, tejido u órgano ejemplar no patógeno basal. Por ejemplo, la regresión de un tumor incluye una reducción de la masa tumoral, así como la completa desaparición de un tumor o tumores.

[0019] Según se usa en este documento, los términos "prevenir" y "prevención" se refieren a una disminución en la aparición de células hiperproliferativas o neoplásicas en un sujeto. La prevención puede ser completa, por ejemplo, la ausencia total de células hiperproliferativas o neoplásicas en un sujeto. La prevención también puede ser parcial, de forma que la aparición de células hiperproliferativas o neoplásicas en un sujeto es menor que la que podría haberse producido sin la presente invención.

[0020] Según se usa en este documento el término, "*in vitro*" se refiere a un entorno artificial y a procesos o reacciones que se producen dentro de un entorno artificial. Los entornos *in vitro* pueden consistir, pero no se limitan a, tubos de ensayo y cultivos celulares. El término "*in vivo*" se refiere al entorno natural (por ejemplo, un animal o una célula) y a los procesos o reacciones que se producen en un entorno natural.

[0021] Según se usa en este documento, el término "cultivo celular" se refiere a cualquier cultivo *in vitro* de células. En este término se incluyen líneas celulares continuas (por ejemplo, con un fenotipo inmortal), cultivos celulares primarios, líneas celulares finitas (por ejemplo, células no transformadas), y cualquier otra población celular mantenida *in vitro*, incluyendo ovocitos y embriones.

[0022] Según se usa en este documento, el término "sujeto" se refiere a organismos que van a ser tratados mediante los procedimientos de la presente invención. Dichos organismos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos y animales veterinarios (perros, gatos, caballos, cerdos, ganado, vacas, cabras y similares). En el contexto de la invención, el término "sujeto" se refiere a un individuo que recibirá o que ha recibido tratamiento.

[0023] El término "diagnosticado", según se usa en este documento, se refiere al reconocimiento de una enfermedad por sus signos y síntomas o por análisis genético, análisis patológico, análisis histológico y similares.

[0024] Según se usa en este documento, el término "compite por la unión" se usa en referencia a una primera molécula con una actividad que se une al mismo objetivo al que lo hace una segunda molécula. La eficacia (por ejemplo, la cinética o la termodinámica) de la unión de la primera molécula puede ser la misma, o mayor, o menor, que la eficacia de la unión al objetivo de la segunda molécula. Por ejemplo, la constante de unión en equilibrio (Kd) de la unión al objetivo puede ser diferente para las dos moléculas.

[0025] Según se usa en este documento, el término "antisentido" se usa en referencia a secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN, fosforotioato ADN) que son complementarios de una secuencia específica de ARN (por ejemplo, ARNm). En esta definición están incluidas moléculas ARN antisentido naturales o sintéticas, incluyendo moléculas que regulan la expresión génica, tales como pequeños ARN transferentes o microARN.

[0026] El término "compuesto de prueba" se refiere a cualquier entidad química, farmacéutica, fármaco y similares que puede usarse para tratar o prevenir una enfermedad, patología, dolencia o alteración de la función corporal, o alterar de otra forma el estado fisiológico o celular de una muestra. Los compuestos de prueba comprenden compuestos terapéuticos tanto conocidos como potenciales. Puede determinarse que un compuesto de prueba es terapéutico usando los procedimientos de cribado desvelados en este documento. Un "compuesto terapéutico conocido" se refiere a un compuesto terapéutico del que se ha demostrado (por ejemplo, mediante

ensayos en animales o experiencia previa con la administración a seres humanos) que es eficaz en dicho tratamiento o prevención. Los "compuestos de prueba" pueden ser agentes antitumorales, particularmente agentes antitumorales que inducen la apoptosis en las células.

5 **[0027]** Según se usa en este documento, el término "purificado" o "purificar" se refiere a la eliminación de componentes no deseados de una muestra. Según se usa en este documento, el término "sustancialmente purificado" se refiere a moléculas (por ejemplo, polinucleótidos, polipéptidos, compuestos químicos) que son eliminadas de su entorno natural, aisladas o separadas, y que están al menos exentas en un 60 %, preferiblemente al menos exentas en un 75 %, y muy preferiblemente al menos exentas en un 90 % de otros componentes con los que pueden estar asociados de forma natural. Por ejemplo, un "polinucleotido aislado" es por lo tanto un polinucleotido sustancialmente purificado.

15 **[0028]** "Secuencia de ácidos nucleicos" y "secuencia de nucleótidos", según se usa en este documento, se refieren a un oligonucleótido o a un polinucleotido, y a fragmentos o porciones de los mismos, y a ADN o a ARN de origen genómico o sintético que puede ser mono o bicatenario, y representa la hebra sentido o antisentido. Según se usa en este documento, los términos "molécula de ácido nucleico codificante", "secuencia de ADN codificante", "ADN codificante", "secuencia de ARN codificante" y "ARN codificante" se refieren al orden o a la secuencia de desoxirribonucleótidos o de ribonucleótidos a lo largo de una hebra de ácido desoxirribonucleico o de ácido ribonucleico. El orden de estos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos determina el orden de los aminoácidos a lo largo de la cadena de polipéptido (proteína) traducida a partir del ARNm. La secuencia de ADN o de ARN codifica por tanto para la secuencia de aminoácidos.

25 **[0029]** El término "gen" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN o ARN) que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido o de un precursor (por ejemplo, proinsulina). El polipéptido puede ser codificado por una secuencia codificante completa o por una porción de la secuencia codificante, siempre que se conserve la actividad deseada o las propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión a ligandos, transducción de señales, etc.) de la secuencia completa del fragmento. El término también engloba la región codificante de un gen estructural, e incluye secuencias localizadas adyacentemente a la región codificante en ambos extremos 5' y 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb o más en cada extremo, de forma que el gen se corresponde con la longitud del ARNm completo. Las secuencias que están localizadas en 5' de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias 5' no traducidas. Las secuencias que están localizadas en 3' o secuencia debajo de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. El término "gen" engloba ambas formas de ADNc y genómico de un gen. Una forma genómica o un clon de un gen contiene la región codificante interrumpida por secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones interpuestas" o "secuencias interpuestas". Los intrones son segmentos de un gen que son transcritos en ARN nuclear (hnARN); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones son eliminados o "cortados" del transcrito nuclear o primario; los intrones están, por tanto, ausentes en el transcrito de ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia o el orden de aminoácidos en el polipéptido naciente.

40 **[0030]** Según se usa en este documento el término "gen exógeno" se refiere a un gen que no está presente de forma natural en un organismo o célula hospedadora, o que es introducido artificialmente en un organismo o célula hospedadora.

45 **[0031]** Según se usa en este documento el término "vector" se refiere a cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc., que es capaz de replicarse cuando se asocia con los elementos de control apropiados, y que puede transferir secuencias genéticas entre células. Por lo tanto, el término incluye vehículos de clonación y de expresión, así como vectores víricos.

50 **[0032]** Según se usa en este documento, el término "expresión génica" se refiere al proceso de convertir la información genética codificada en un gen en ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt o ARNsn) a través de la "transcripción" de un gen (es decir, a través de la acción enzimática de una polimerasa de ARN), y para los genes que codifican proteínas, en una proteína mediante la "traducción" del ARNm. La expresión génica puede ser regulada en muchas etapas del proceso. Una "regulación por incremento" o "activación" se refiere a la regulación que aumenta la producción de los productos de la expresión génica (es decir, ARN o proteína), mientras que la "regulación por disminución" o "represión" se refiere a la regulación que disminuye la producción. Las moléculas (por ejemplo, factores de transcripción) que están implicadas en la regulación por incremento o en la regulación por disminución se denominan a menudo "activadores" y "represores," respectivamente.

60 **[0033]** Según se usa en este documento, el término "proteína de unión al antígeno" se refiere a proteínas que se unen a un antígeno específico. Las "proteínas de unión al antígeno" incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, incluyendo anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla y humanizados, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂ y genotecas de expresión de Fab. Se usan varios procedimientos conocidos en la materia para la producción de anticuerpos policlonales. Para la producción de anticuerpos pueden inmunizarse varios hospedadores animales mediante inyección con el péptido correspondiente contra el epitopo deseado que incluyen, pero no se limitan a, conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc. El péptido puede estar

conjugado con un portador inmunógeno (por ejemplo, toxoide diftérico, albúmina sérica bovina (*bovine serum albumin*, BSA) o hemocianina de lapa californiana (*keyhole limpet hemocyanin*, KLH)). Se usan diversos coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedadora, que incluyen, pero no se limitan a, coadyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles de pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y coadyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (*Bacille Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*.

[0034] Para la preparación de anticuerpos monoclonales puede usarse cualquier técnica que prevea la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Estas incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma desarrollada originalmente por Köhler y Milstein (Köhler y Milstein, *Nature*, 256: 495-497 (1975)), así como la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de linfocito B humano (véase, por ejemplo, Kozbor y col., *Immunol. Today*, 4: 72 (1983)) y la técnica del EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96 (1985)).

[0035] Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena simple (documento U.S. 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos específicos de cadena simple según se desee. Las técnicas conocidas en la materia para la construcción de genotecas de expresión de Fab (Huse y col., *Science*, 246: 1275-1281 (1989)) permiten una rápida y fácil identificación de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

[0036] Los fragmentos de anticuerpos que contienen el idiotipo (región de unión al antígeno) de la molécula de anticuerpo pueden generarse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, pero no se limitan a: el fragmento F(ab')₂, que puede producirse mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab', que pueden generarse reduciendo los puentes de disulfuro de un fragmento F(ab')₂, y los fragmentos Fab, que pueden generarse tratando una molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.

[0037] Los genes que codifican para las proteínas de unión al antígeno pueden aislarse mediante procedimientos conocidos en la materia. En la producción de anticuerpos puede realizarse un cribado para el anticuerpo deseado mediante técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA (*enzyme-linked immunosorbant assay*, ensayo de inmunoadsorción), inmunoensayos en "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (usando oro coloidal, marcajes de enzimas o radioisótopos, por ejemplo), inmunotransferencias Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemoaglutinación, etc.), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de la proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, etc.), etc.

[0038] Según se usa en este documento el término "modular" se refiere a la actividad de un compuesto que afecta (por ejemplo, promueve o retrasa) un aspecto de la función celular incluyendo, pero no limitándose a, el crecimiento celular, la proliferación, la invasión, la angiogénesis, la apoptosis y similares.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0039] La presente invención proporciona un inhibidor de la señalización Notch para su uso en un procedimiento para inhibir las células oncogénicas para tratar el cáncer de páncreas o de mama en un sujeto, en el que el inhibidor es un anticuerpo anti-Notch que inhibe la proliferación de células oncogénicas, y en el que el procedimiento comprende coadministrar el inhibidor y un agente antitumoral al sujeto, en el que el agente antitumoral es un agente quimioterapéutico.

[0040] En este documento también se describen los procedimientos de investigación y de diagnóstico clínico para identificar la presencia de una célula oncogénica en una muestra tumoral. Algunos procedimientos comprenden la detección de uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4,...) marcadores o propiedades características de las células oncogénicas (por ejemplo, uno o más marcadores o propiedades que no son características de una célula no oncogénica). El uno o más marcadores pueden incluir, pero no se limitan a, la expresión de Notch4, la muerte celular tras la exposición a un anticuerpo anti-Notch4, la expresión de Manic Fringe, la expresión alterada de un ligando Delta de Notch relativa a dicha célula no oncogénica, la expresión de Jagged y la muerte celular tras la exposición a un vector adenovírico dominante negativo dnMAML1. Aunque el procedimiento no está limitado por la naturaleza de la célula, la célula puede proceder de un tumor de cáncer de mama.

[0041] La identificación de la célula oncogénica puede usarse en la selección de una pauta de tratamiento de acción para un sujeto. Por ejemplo, la pauta de tratamiento de acción puede comprender la administración de un inhibidor de la vía Notch4 al sujeto.

[0042] En este documento también se describen procedimientos para seleccionar o caracterizar compuestos (por ejemplo, para la investigación básica, el cribado de fármacos, ensayos de fármacos, terapia de monitorización, etc.), que comprenden las etapas de: a) proporcionar una muestra que comprende una célula oncogénica (por ejemplo, célula de mama); b) exponer la muestra a un compuesto de prueba; y c) detectar un cambio en la célula en respuesta al compuesto de prueba. El compuesto de prueba puede comprender un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo que regula una vía de señalización Notch) o un compuesto antineoplásico. Puede coadministrarse un segundo compuesto o compuesto adicional (por ejemplo, un compuesto terapéutico antineoplásico conocido). La etapa de detección puede comprender detectar la muerte celular de dicha célula oncogénica (por ejemplo, la detección de marcadores de apoptosis tales como caspasa, etc.).

[0043] En este documento también se describen procedimientos para identificar sujetos con células oncogénicas y para tratar al sujeto con una pauta de tratamiento de acción apropiada basada en la naturaleza de la célula oncogénica identificada. Por ejemplo, un procedimiento para tratar un sujeto con células oncogénicas (por ejemplo, células de mama), comprende las etapas de: a) identificar la presencia de una célula de mama oncogénica en el sujeto; b) identificar uno o más marcadores o propiedades características de la célula oncogénica para identificar la naturaleza de la célula oncogénica; y c) seleccionar una pauta terapéutica de acción basada en la naturaleza de la célula oncogénica. La pauta de acción puede comprender la administración de un inhibidor de la vía Notch 4 o de otro terapéutico apropiado al sujeto cuando la célula oncogénica se caracteriza por expresar Notch4, o por ejemplo, cuando la célula oncogénica no expresa Notch4, pero cuando las células no oncogénicas adyacentes expresan Notch 4. La pauta de acción puede comprender la extirpación quirúrgica de un tumor del sujeto y la administración de un inhibidor de la vía Notch4 o de otro compuesto terapéutico apropiado al sujeto (por ejemplo, para evitar la oncogénesis y la metástasis causadas por las células oncogénicas remanentes. La pauta de acción puede comprender la coadministración de un inhibidor de la vía Notch4 o de otro compuesto terapéutico apropiado y de un segundo agente antineoplásico al sujeto. Según se describe en este documento, puede usarse un inhibidor de la vía Notch en procedimientos para prevenir o reducir la metástasis, que comprenden la etapa de administrar el inhibidor de la vía Notch a un sujeto sospechoso de tener metástasis (por ejemplo, sospechoso de experimentar metástasis o en riesgo de metástasis). El inhibidor de la vía Notch puede comprender un anticuerpo anti-Notch4. La administración puede realizarse junto con la extirpación de un tumor sólido (por ejemplo, un tumor de mama) del sujeto.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0044] Los tumores sólidos consisten en poblaciones heterogéneas de células tumorales que difieren en su capacidad para formar nuevos tumores. Las células tumorales que tienen la capacidad de formar tumores (es decir, células tumorales oncogénicas) y las células tumorales que carecen de esta capacidad (es decir, células tumorales no oncogénicas) pueden distinguirse basándose en el fenotipo¹. Dado que las células tumorales oncogénicas y las células madre normales comparten la capacidad fundamental de autorreplicarse a través del proceso de autorrenovación, los experimentos realizados durante el desarrollo de la presente invención investigaron las potenciales vías de autorrenovación en las células tumorales oncogénicas, de forma que permitan la caracterización y la identificación de células tumorales oncogénicas, proporcionen sistemas para el cribado de terapéuticos oncológicos y proporcionen objetivos y compuestos terapéuticos dirigidos a esos objetivos.

[0045] Por lo tanto, la presente invención se refiere a composiciones para su uso en procedimientos para tratar el cáncer, y proporciona composiciones para inhibir la oncogénesis de ciertas clases de células tumorales, incluyendo células tumorales de mama.

[0046] También se desvelan procedimientos para identificar células oncogénicas y diagnosticar enfermedades (por ejemplo, enfermedades hiperproliferativas) o acontecimientos biológicos (por ejemplo, metástasis tumorales) asociados con la presencia de células oncogénicas. En particular, la presente desvelación identifica clases de células de cánceres que son oncogénicas y proporciona características detectables de dichas células, de forma que puede determinarse su presencia, por ejemplo, a la hora de elegir si se somete a un sujeto a una intervención médica, de seleccionar una pauta de tratamiento de acción apropiada, de monitorizar el éxito o el progreso de una pauta terapéutica de acción (por ejemplo, en un ensayo farmacológico o en la selección de una terapia individualizada en curso), o en el cribado de nuevos compuestos terapéuticos u objetivos terapéuticos.

[0047] La presente desvelación también identifica objetivos biológicos y reguladores de esos objetivos biológicos que modulan la oncogénesis y la metástasis. Los procedimientos terapéuticos pueden usarse en combinación con otras pautas terapéuticas de acción (por ejemplo, la coadministración de otros agentes antineoplásicos) o con procedimientos diagnósticos (por ejemplo, los pacientes que son susceptibles a los procedimientos terapéuticos de la presente invención son identificados mediante los procedimientos diagnósticos descritos en este documento).

[0048] Se describen sistemas y procedimientos para identificar los genes y las proteínas expresados por células oncogénicas para identificar proteínas cuya función es necesaria para la oncogénesis, proporcionando nuevos objetivos farmacológicos.

[0049] La expresión de proteínas Notch y / o de reguladores de las vías de señalización Notch puede usarse para identificar células oncogénicas. Los reguladores de las proteínas Notch y / o las vías de señalización Notch también hallan uso en la investigación, el cribado de fármacos y en procedimientos terapéuticos. Por ejemplo, los inhibidores de la expresión o de la función Notch (por ejemplo, Notch4) hallan uso en la prevención o en la reducción de la proliferación celular, en el desarrollo o en la progresión de una enfermedad hiperproliferativa y en la metástasis oncológica. Los inhibidores pueden utilizarse tras la extirpación de una masa tumoral sólida para ayudar a reducir la proliferación y la metástasis de las células hiperproliferativas remanentes. Por ejemplo, en este documento se muestra que las células no oncogénicas (por ejemplo, las células que pueden eliminarse en la escisión de una masa tumoral sólida) expresan factores que evitan que las células adyacentes experimenten proliferación. Por lo tanto, una apropiada intervención terapéutica tras la extirpación del tumor proporciona un sustituto de esta función, suprimiendo la proliferación y la metástasis de las células oncogénicas remanentes.

[0050] La presente invención se refiere a composiciones para su uso en el tratamiento del cáncer de mama y del cáncer de páncreas, según se define en las reivindicaciones.

[0051] La vía Notch es importante para el mantenimiento de las células germinativas y de varias células madre normales^{2, 3}, y las mutaciones Notch dan lugar a cáncer de mama en ratones^{4, 5}. La presente invención demuestra que en un subconjunto de cánceres (por ejemplo, cánceres de mama humanos), el agonista Delta de Notch proporciona una señal de supervivencia para las células tumorales de mama oncogénicas, permitiéndoles formar colonias *in vitro*.

[0052] Los inhibidores de la señalización Notch (tales como anticuerpos que bloquean la activación Notch) pueden usarse para inhibir las células oncogénicas. De esta forma, la vía Notch se modifica para destruir o inhibir la proliferación de células oncogénicas. Por ejemplo, un anticuerpo que reconoce Notch 4 bloquea el crecimiento de las células tumorales de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo* (véase, por ejemplo, la Publ. de Pat. de EE.UU. N° 20020119565) y halla uso, por ejemplo, en la prevención de la metástasis tumoral (por ejemplo, tras la extirpación de un tumor sólido). Adicionalmente, según se muestra en la Figura 6 y en la sección de Ejemplos, a continuación, la administración de inhibidores de la y-secretasa halla uso en el tratamiento de células oncogénicas, demostrando que la inhibición de la vía Notch de una forma que no se dirija directamente a Notch 4 halla uso asimismo en los procedimientos desvelados en este documento. Asimismo, según se muestra en la Figura 5, la administración de un adenovirus dominante negativo Mastermindlike-1 (dnMAML1Ad), un inhibidor de la activación transcripcional de Notch, halla uso en el tratamiento de células oncogénicas.

[0053] Por el contrario, se había averiguado previamente que la estimulación de Notch usando Delta soluble (Han y col., Blood 95 (5): 161625 (2000)), un ligando Notch, promovía el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales *in vitro*. Por lo tanto, previamente se había averiguado que la estimulación de la vía Notch promueve el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales.

[0054] Los experimentos realizados durante el desarrollo de la presente invención demostraron que la inhibición de la señalización Notch por un inhibidor Notch dominante o un anticuerpo bloqueante contra Notch 4 inducía la apoptosis a través de la vía de muerte mitocondrial en células tumorales desde 5 de 5 o desde 2 de 3 tumores ensayados, respectivamente. En algunos casos, las células tumorales oncogénicas y no oncogénicas diferían en su expresión de Notches, ligandos Notch y miembros de la familia Fringe de modificadores de Notch. En el tumor en el que la viabilidad de las células tumorales oncogénicas no estaba afectada por el anticuerpo anti-Notch4, se detectó la expresión de Notch4 en células tumorales no oncogénicas, pero no en las células tumorales oncogénicas. Por lo tanto, los experimentos demuestran que en algunos casos de cáncer de mama, la señalización Notch pueden modular el crecimiento del subconjunto oncogénico de células tumorales, y que las células tumorales oncogénicas y no oncogénicas expresan de forma diferente los componentes de esta vía de señalización. Estos resultados demuestran que la identificación prospectiva de células tumorales oncogénicas permite la identificación de factores que pueden afectar a funciones críticas de estas células. Dado que esta subpoblación dirige la angiogénesis, la identificación de objetivos en estas células proporciona terapias oncológicas más eficaces.

[0055] La observación de que los tumores contienen una pequeña población de células oncogénicas con un fenotipo de superficie celular tiene importantes implicaciones para comprender la biología de los tumores sólidos, y también para el desarrollo de terapias oncológicas eficaces³⁶. La incapacidad de los actuales tratamientos oncológicos de curar la enfermedad metastásica puede ser debida a la ineficaz destrucción de las células oncogénicas. Si las células oncogénicas son evitadas por un agente, entonces los tumores pueden entrar en regresión, pero las células oncogénicas remanentes conducirán a la recurrencia del tumor. Centrándonos en la población oncogénica, se pueden identificar proteínas críticas implicadas en funciones biológicas esenciales en la población oncogénica de células tumorales, tales como la autorrenovación y la supervivencia. La importancia de la identificación prospectiva de células oncogénicas para la identificación de potenciales objetivos terapéuticos que podrían tratar más eficazmente el cáncer de mama está ilustrada por T1 y T4, muestras de tumores obtenidas a partir de dos sujetos diferentes. Aunque ambos tumores murieron cuando se inhibió la señalización Notch con el adenovirus dnMAML1 y ambos tumores expresaban Notch 4, sólo murieron las células clonogénicas T1 cuando se expusieron al anticuerpo anti-Notch4. Esto puede explicarse por la observación de que las células oncogénicas T1 expresaban Notch4, pero la expresión de Notch4 no pudo detectarse en las células oncogénicas T4, que

expresaban Notch1 y Notch2. La observación de que los ligandos Notch son expresados a bajos niveles en las células tumorales oncogénicas tiene implicaciones para la biología de tumores. Durante mucho tiempo se ha postulado que las interacciones celulares estroma-cáncer pueden jugar un importante papel en el crecimiento y la metástasis de tumores (revisado en³⁷). Dado que la activación de Notch promueve el crecimiento de células clonogénicas, la expresión de ligandos Notch por células en un tejido en particular puede contribuir a diseminar un tumor en ese sitio en particular.

[0056] La activación del receptor Notch se había indicado previamente en el cáncer de mama, y la señalización Notch juega un papel en la transformación de células transfectadas con un oncogén Ras activado, pero no se conoce su papel en los cánceres de mama humanos *de novo*¹⁷⁻²⁰. Los experimentos realizados durante el desarrollo de la presente invención probaron la eficacia de la activación de Notch en células tumorales de mama humanas aisladas de un paciente, denominadas T1 (Tumor 1), exponiendo las células del cultivo a una forma soluble del ligando Delta de Notch, Delta-Fc. El Delta soluble aumentó en cinco veces el número de colonias formadas por las células tumorales T1 no fraccionadas en cultivo (Fig. 1a). A continuación se probó el efecto de la inhibición de la señalización Notch sobre la capacidad de las células oncogénicas aisladas a partir de T1 para proliferar *in vitro*, infectando las células con un adenovirus dominante negativo Mastermindlike-1²¹⁻²⁴ (dnMAML1Ad, Fig. 5), un inhibidor de la activación transcripcional de Notch (Fig.1b). Dos días después de la infección, el dnMAML1Ad, pero no un vector de adenovirus de control, dio como resultado una disminución del 18 %-45 % en las células tumorales oncogénicas T1 viables o de las células de cáncer de mama clonogénicas de todos los 4 tumores de otros pacientes (denominadas T2-T5) que se ensayaron (Fig. 1c). Estos datos demuestran que la activación de Notch promovía la supervivencia o la proliferación de células tumorales clonogénicas en todos los 5 tumores *de novo* que se ensayaron.

[0057] Se examinó el potencial papel de Notch4 en el cáncer de mama humano. Se detectó la expresión de Notch4 en 4 de los 5 tumores examinados, incluyendo T1 y T4 (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis cuantitativo mediante RT-PCR de la expresión génica

	T1		T4		T2	T3	T5
	T	NT	T	NT			
Notch1	+	+ 2	+	+	+	+	+
Notch2	+	+	+	+	-	+	-
Notch3	-	-	-	-	+	-	-
Notch4	+	+	-	+	+	-	+
Delta1	+	+ 3	+	+ 3	ND	ND	ND
Delta3	-	-	-	-	ND	ND	ND
Delta4	+	+ 3	-	-	ND	ND	ND
Jagged1	+	+	+	+ 3	ND	ND	ND
Lunatic	-	+	-	+	ND	ND	ND
Manic	+	-	+	-	ND	ND	ND
Radical	-	+	-	+	ND	ND	ND

[0058] Se cultivaron células tumorales T1 en presencia de un anticuerpo policlonal contra Notch4 que inhibía la señalización Notch (Fig. 2a). Cuando se expusieron las células tumorales T1, que expresaban Notch4 (Tabla 1, Fig. 2b), a este anticuerpo *in vitro*, se inhibió notablemente la formación de colonias (Fig. 2c, d). Esta inhibición se elimina prácticamente completamente mediante la preincubación del anticuerpo con el péptido Notch4 contra el cual se había generado el anticuerpo, confirmando la especificidad del anticuerpo anti-Notch4 (Fig. 2c, d). Por otro lado, la formación de colonias por parte de las células tumorales T4 no se vio afectada por el anticuerpo anti-Notch 4 (Fig. 2c). Usando una RT-PCR cuantitativa pudo detectarse la expresión de Notch 4 en ambas células tumorales no oncogénicas T1 y T4¹ (Tabla 1). Sin embargo, cuando se probaron las células oncogénicas T1 y T4, se detectó la expresión de Notch4 en las células tumorales oncogénicas T1, mientras que las células oncogénicas T4 expresaban Notch1 y Notch2, pero no Notch4 (Tabla 1). Estos datos proporcionan una explicación para la observación de que las células clonogénicas de ambos tumores murieron cuando se infectaron con el adenovirus dnMAML1 (Fig. 1c), pero sólo las células clonogénicas T1 se vieron afectadas por el anticuerpo anti-Notch4 (Fig. 2c). En experimentos adicionales se ensayó si el anticuerpo anti-Notch4 inhibía la formación de tumores por parte de las células tumorales oncogénicas T1 *in vivo*. Tan pocas como 200 células tumorales oncogénicas T1 eran capaces de formar tumores

consistentemente en ratones NOD / SCID¹. Por lo tanto, se incubaron 200 células tumorales oncogénicas T1 bien con tampón de control o bien con el anticuerpo anti-Notch4, y después se inyectaron a los ratones. 7 de las 9 inyecciones de células no tratadas, y 0 de las 9 inyecciones de células tratadas formaron tumores (Fig. 2e). La formación de tumores por un gran número de células tratadas con anticuerpo estuvo retrasada con respecto a las células de control.

[0059] Los experimentos adicionales estudiaron el mecanismo mediante el cual el anticuerpo anti-Notch4 inhibía la proliferación de las células tumorales de este tumor, así como de las células tumorales aisladas de pacientes adicionales. Se ha demostrado que la estimulación de Notch promueve la proliferación celular en algunas circunstancias, inhibe la proliferación en otras circunstancias y promueve la supervivencia celular en otros casos^{13, 25, 26}. Para distinguir entre estas posibilidades se midió la viabilidad de las células cultivadas con el anticuerpo anti-Notch4. Después de dos días de exposición al anticuerpo, hubo un notable aumento en la muerte celular de las células tumorales clonogénicas T1, pero no de las T4 (Fig. 3a, 3b). Había suficientes células tumorales T1, T4 y T5 como para un análisis adicional para determinar el mecanismo mediante el cual la inhibición de la señalización Notch4 inducía la muerte celular. La exposición de las células tumorales clonogénicas aisladas a partir de T1 al anticuerpo bloqueante anti-Notch4 da lugar a la acumulación de células tumorales T1, con un ADN degradado característico de la apoptosis (Fig. 3a). En comparación con los cultivos de control, hubo un notable aumento en el número de células con la caspasa 3 / 7 activada en las células tumorales clonogénicas T1 y T5, pero no en las células tumorales clonogénicas T4, 36 horas después de la exposición al anticuerpo (Fig. 3b). Estos datos demuestran que en el subconjunto de tumores de mama humanos *de novo*, la activación de la vía Notch proporciona una señal de supervivencia necesaria para la población oncogénica de células.

[0060] La muerte celular programada puede iniciarse a través de una vía mediada por un receptor (extrínseca) o de una vía mitocondrial (intrínseca). Desafortunadamente, actualmente no es técnicamente posible realizar amplios análisis moleculares y bioquímicos de las raras células tumorales oncogénicas. Por lo tanto, se obtuvieron unas líneas celulares de mama que dependen de la señalización Notch para su supervivencia. Las células MCF-7 expresaban Notch4 (Fig. 2b), y tanto el adenovirus dnMAML1 como el anticuerpo anti-Notch4 destruían estas células (Figs. 3a, 3c y 3d). Como este era el caso para las células aisladas directamente a partir de tumores, la inhibición de la señalización Notch dio como resultado una activación de la caspasa en las células MCF-7 (Figura 3b). Para determinar si la muerte celular era por la vía de muerte celular intrínseca o extrínseca, se usaron células MCF-7 que expresaban bien un FADD (dn) dominante negativo o bien Bel-xL, dando como resultado la inhibición de las vías de muerte intrínseca y extrínseca respectivamente (Fig. 3e)^{27, 28}. Bel-XL, pero no dnFADD, protegió a las células MCF-7 de la apoptosis cuando se infectaron con el adenovirus dnMAML1 (Figs. 3c y 3d). Estos resultados demuestran que la señalización Notch protege a las células tumorales de la apoptosis a través de la vía de muerte mitocondrial.

[0061] La señalización Notch es compleja. Hay múltiples ligandos Notches y Notch, así como varias Fringes que modifican estos Notches para modular la señalización. La expresión diferencial de varios miembros de la vía de señalización Notch por células madre y su progenie de células progenitoras en tejidos normales juega un papel crítico en las decisiones sobre el destino de las células^{11, 15, 29}. Dado que la expresión diferencial de Notch4 por parte de células tumorales T4 oncogénicas y no oncogénicas sugirió que también podría producirse una situación similar en tumores, se realizaron experimentos para determinar si los genes de la vía Notch se expresaban diferencialmente en las diferentes poblaciones de células tumorales. Para identificar los componentes de la vía de señalización Notch en células de cáncer de mama aisladas de diferentes pacientes, se usó una RT-PCR cuantitativa para examinar la expresión de Notches, ligandos de Notch y Fringes por parte de las células tumorales de cada uno de los 5 tumores. Se detectó la expresión de uno o más Notches en todos los tumores (Tabla 1). En algunos tejidos normales, bien las células estromales o bien la progenie diferenciada expresaban ligandos Notch que proporcionan una señal paracrina que activa Notch en las células madre^{3, 11, 30}. La señalización Notch está modulada adicionalmente en tejidos normales por la expresión de tres proteínas Fringe, Manic, Lunatic y Radical. Cada una de las Fringe glucosila diferencialmente a un receptor Notch en particular y modula la señalización del receptor^{29, 31, 32}. Por lo tanto, se realizaron experimentos para determinar si las células tumorales oncogénicas y no oncogénicas diferían en su expresión de ligandos Notch y / o de proteínas Fringe. Para conseguir esto se realizó una RT-PCR cuantitativa usando ARN aislado a partir de 2.000 células tumorales oncogénicas y 2.000 células tumorales no oncogénicas¹ aisladas a partir de T1 y T4 (Fig. 4). La expresión de los ligandos Delta1 y Delta4 de Notch era 3 veces superior en las células T1 no oncogénicas en comparación con las células T1 oncogénicas, mientras que la expresión de Jagged¹ era la misma en ambas poblaciones (Tabla 1). De forma similar, las células T4 no oncogénicas expresaban unos niveles 3 veces mayores de los ligandos Notch Delta1 y Jagged1 de lo que lo hacían las células tumorales oncogénicas, mientras que no se detectó expresión de Delta3 y Delta4 en ninguna población (Tabla 1).

[0062] Dado que la mayor parte de un tumor consiste en células tumorales no oncogénicas¹, y estas células expresan mayores niveles de los ligandos Notch de lo que lo hacen las células tumorales oncogénicas, estos datos sugieren que las células tumorales no oncogénicas proporcionan una señal de supervivencia a las células tumorales oncogénicas. Cuando se examinaron mediante una RT-PCR cuantitativa, se detectó la expresión de Manic Fringe por parte de las células oncogénicas, pero no en las células no oncogénicas de ambos tumores examinados (Tabla 1). Por el contrario, se detectó la expresión de Lunatic Fringe y Radical Fringe por parte de las células no oncogénicas, pero no en las células oncogénicas, en ambos tumores (Tabla 1). Estos datos son significativos dado que se había implicado una expresión impuesta por Manic Fringe en la transformación oncogénica³³, y en un análisis

con una micromatriz, la expresión de Manic Fringe era la mayor en las células madre normales³⁴.

[0063] La reciente observación de que el oncogén *Bmi-1* y regula la autorrenovación tanto de las células madre hematopoyéticas normales como de las células leucémicas, conecta firmemente las vías de autorrenovación con el cáncer^{8, 35}. Dado que tanto las células madre normales como un subconjunto de células tumorales en un tumor comparten la capacidad fundamental de autorrenovarse, es probable que las vías de autorrenovación sean compartidas por las células madre normales y las tumorales células oncogénicas. Por lo tanto, la identificación de las vías que regulan la autorrenovación en las células tumorales es crítica para nuestra comprensión de estas enfermedades.

[0064] Los experimentos anteriores proporcionan varios marcadores biológicos distintivos de las células oncogénicas frente a las células no oncogénicas que nos permiten caracterizar la naturaleza de la muestra, marcar objetivos a través de la intervención terapéutica, ayudar a seleccionar y monitorizar la terapia, las aplicaciones de cribado de fármacos y las aplicaciones de investigación.

Agentes terapéuticos

[0065] Una composición farmacéutica que contiene un regulador de la oncogénesis según la presente invención puede administrarse mediante cualquier procedimiento eficaz. La descripción, a continuación, se refiere a un agente terapéutico anti-Notch, que según la presente invención, es un anticuerpo anti-Notch. El anticuerpo anti-Notch puede administrarse mediante cualquier procedimiento eficaz. Por ejemplo, puede administrarse una disolución fisiológicamente apropiada que contiene una concentración eficaz del agente terapéutico anti-Notch por vía tópica, intraocular, parenteral, oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, o mediante cualquier otro medio eficaz. En particular, el agente terapéutico anti-Notch puede inyectarse directamente en un cáncer objetivo o en un tejido tumoral mediante una aguja en una cantidad eficaz para tratar las células tumorales del tejido objetivo. Alternativamente, un cáncer o un tumor presentes en una cavidad corporal pueden recibir una composición fisiológicamente apropiada (por ejemplo, una disolución tal como disolución salina o de tampón de fosfato, una suspensión o una emulsión, que es estéril) que contiene una concentración eficaz de un agente terapéutico anti-Notch mediante una inyección directa con una aguja o mediante un catéter u otro tubo de administración colocado en el órgano hueco afectado por el cáncer o el tumor. Puede usarse cualquier dispositivo de imagen eficaz tal como rayos X, sonograma, o un sistema de visualización de fibra óptica para localizar el tejido objetivo y guiar a la aguja o al tubo del catéter. En otra alternativa, puede administrarse por vía sistémica una disolución fisiológicamente apropiada que contiene una concentración eficaz de un agente terapéutico anti-Notch en la circulación sanguínea para tratar un cáncer o un tumor que no puede ser alcanzado directamente o aislado anatómicamente.

[0066] Todas estas manipulaciones tienen en común la meta de ubicar el agente terapéutico anti-Notch en contacto suficiente con el tumor objetivo para permitir que el agente terapéutico anti-Notch entre en contacto con las células del tumor. En una forma de realización, los tumores sólidos presentes en los revestimientos epiteliales de órganos huecos pueden tratarse mediante la infusión de una suspensión del vector en un órgano hueco relleno de un fluido, o pulverizando o nebulizando en un órgano hueco relleno de aire. Por lo tanto, las células del tumor (tales como las células madre de un tumor sólido) pueden estar presentes en o entre el tejido epitelial del tejido de un órgano accesible al contacto con el agente terapéutico. El experto en la materia de la oncología puede apreciar que el agente terapéutico anti-Notch puede administrarse al tumor sólido mediante la inyección directa en el tumor, de forma que el agente terapéutico anti-Notch entre en contacto y afecte a las células del tumor dentro del tumor.

[0067] También pueden usarse las células oncogénicas identificadas mediante los procedimientos descritos en este documento para crear anticuerpos anti-células tumorales. El procedimiento puede implicar obtener una población enriquecida de células oncogénicas o de células oncogénicas aisladas; tratar la población para evitar la replicación celular (por ejemplo, mediante irradiación); y administrar las células tratadas a un sujeto humano o animal en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria en las células madre del tumor sólido. Como guía para una dosis eficaz de células que se debe inyectar o administrar por vía oral, véanse las Pats. de EE.UU. N^{os} 6.218.166, 6.207.147 y 6.156.305. Otro procedimiento implica obtener una población enriquecida de células madre de un tumor sólido o de células madre de un tumor sólido aislado; mezclar las células madre del tumor en un cultivo *in vitro* con células efectoras inmunes (según los procedimientos inmunológicos conocidos en la materia) procedentes de un sujeto humano o de un animal hospedador en el que se quiere crear el anticuerpo; retirar las células efectoras inmunes del cultivo; y transplantar las células efectoras inmunes en un animal hospedador en una dosis que es eficaz para estimular una respuesta inmunitaria en el animal.

[0068] El agente terapéutico es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-Notch4). Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos y la técnica del EBV-hibridoma (véanse, por ejemplo, Kozbor, D. y col., *J. Immunol. Methods* 81: 31-42 (1985); Cote R J y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 2026-2030 (1983); y Cole S P y col., *Mol. Cell Biol.* 62: 109-120 (1984)).

[0069] Además pueden usarse las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos",

tales como el corte y empalme de genes de anticuerpos de ratón en genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con las apropiadas especificidad de antígeno y actividad biológica (véanse, por ejemplo, Morrison S L y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-6855 (1984); Neuberger M S y col., Nature 312: 604-608 (1984); y Takeda S y col., Nature 314: 452-454 (1985)).

5 **[0070]** Pueden usarse varios inmunoensayos para cribar e identificar anticuerpos con la especificidad deseada. En la materia se conocen bien numerosos protocolos para los ensayos de unión competitiva o inmunoradiométricos que usan anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidades establecidas.

10 **[0071]** El anticuerpo también puede ser un anticuerpo humanizado. El término "anticuerpo humanizado", según se usa en este documento, se refiere a moléculas de anticuerpo en las que la secuencia de aminoácidos de las regiones que no se unen al antígeno se han alterado de forma que el anticuerpo se parece más a un anticuerpo humano pero todavía conserva su capacidad de unión original. Los anticuerpos se humanizan para que sean menos inmunógenos y por lo tanto persistan más cuando se administran terapéuticamente un paciente.

15 **[0072]** Pueden generarse anticuerpos humanos usando la tecnología XENOMOUSE de Abgenix (Fremont, Calif, EE.UU.), que permiten la generación y la selección de candidatos de productos de anticuerpos humanos completos de alta afinidad esencialmente para cualquier enfermedad objetivo apropiada para la terapia con anticuerpos. Véanse las Pats. de EE.UU. N^{os} 6.235.883, 6.207.418, 6.162.963, 6.150.584, 6.130.364, 6.114.598, 20 6.091.001, 6.075.181, 5.998.209, 5.985.615, 5.939.598 y 5.916.771; Yang X y col., Crit Rev Oncol Hemato 38 (1): 17-23 (2001); Chadd H E & Chamow S M. Curr Opin Biotechnol 12 (2): 188-94 (2001); Green L L, Journal of Immunological Methods 231 11-23 (1999); Yang X-D y col., Cancer Research 59 (6): 1236-1243 (1999); y Jakobovits A, Advanced Drug Delivery Reviews 31: 33 – 42 (1998). Los anticuerpos con secuencias proteicas humanas completas se generan usando cepas de ratones modificadas genéticamente en las que se suprime la expresión 25 génica del anticuerpo de ratón y se sustituye funcionalmente por la expresión génica de un anticuerpo humano, dejando intacto el resto del sistema inmunitario del ratón. Además, la generación de anticuerpos dirigidos contra marcadores presentes en las células oncogénicas puede usarse como procedimiento de identificación de objetivos para el desarrollo de fármacos.

30 **[0073]** En la presente invención, los agentes terapéuticos antioncogénicos de la presente invención se coadministran con otras terapias antineoplásicas, según se define en las reivindicaciones. Los agentes quimioterapéuticos hallan uso con la presente invención. Cualquier agente quimioterapéutico que pueda coadministrarse con los agentes de la presente invención, o asociarse con los agentes de la presente invención, es adecuado para su uso en los procedimientos de la presente invención.

35 **[0074]** Consecuentemente, se proporciona un anticuerpo anti-Notch de la presente invención para administrarlo con al menos un antineoplásico quimioterapéutico, y opcionalmente una técnica terapéutica (por ejemplo, intervención quirúrgica, radioterapias).

40 **[0075]** En la presente invención, el anticuerpo anti-Notch es para su uso en combinación con el agente antineoplásico, que es un agente quimioterapéutico según se define en las reivindicaciones. Estos y otros agentes antineoplásicos se describen a continuación. Los agentes antineoplásicos incluyen, pero no se limitan a, agentes que inducen la apoptosis, agentes que inhiben la función de la desaminasa de adenosina, que inhiben la biosíntesis de pirimidina, que inhiben la biosíntesis del anillo de purina, que inhiben las interconversiones de nucleótidos, que 45 inhiben la reductasa de ribonucleótidos, que inhiben la síntesis de monofosfato de timidina (*thymidine monophosphate*, TMP), que inhiben la reducción del dihidrofolato, que inhiben la síntesis del ADN, que forman aductos con el ADN, que dañan el ADN, que inhiben la reparación del ADN, que se intercalan con el ADN, que desaminan asparaginas, que inhiben la síntesis del ARN, que inhiben la síntesis o la estabilidad de las proteínas, que inhiben la síntesis o la función de los microtúbulos, y similares.

50 **[0076]** Algunos ejemplos de agentes antineoplásicos incluyen, pero no se limitan a: 1) alcaloides, incluyendo inhibidores de los microtúbulos (por ejemplo, vincristina, vinblastina y vindesina, etc.), estabilizadores de los microtúbulos (por ejemplo, paclitaxel (TAXOL) y docetaxel, etc.) e inhibidores de la función de la cromatina, incluyendo inhibidores de la topoisomerasa, tales como epipodofilotoxinas (por ejemplo, etopósido (VP-16) y 55 tenipósido (VM-26), etc.), y agentes que se dirigen a la topoisomerasa I (por ejemplo, camptotecina e isirinotecan (CPT-11), etc.); 2) agentes de unión covalente al ADN (agentes alquilantes), incluyendo mostazas nitrogenadas (por ejemplo, mecloretamina, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida y busulfán (MILERAN), etc.), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina, lomustina y semustina, etc.), y otros agentes alquilantes (por ejemplo, dacarbacina, hidroximetilmelamina, tiotepa y mitomicina, etc.); 3) agentes de unión no covalente al ADN (antibióticos antitumorales), incluyendo inhibidores de los ácidos nucleicos (por ejemplo, dactinomomicina (actinomomicina D), etc.), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (daunomicina y cerubidina), doxorubicina (adriamicina) e idarrubicina (idamicina), etc.), antracenedionas (por ejemplo, análogos de antraciclina tales como mitoxantrona, etc.), 60 bleomicinas (BLENOXANE), etc., y plicamicina (mitramicina), etc.; 4) antimetabolitos, incluyendo antifolatos (por ejemplo, metotrexato, FOLEX y MEXATE, etc.), antimetabolitos de purina (por ejemplo, 6-mercaptopurina (6-MP, PURINATOL), 6-tioguanina (6-TG), azatioprina, aciclovir, ganciclovir, clorodesoxiadenosina, 2-clorodesoxiadenosina (CdA) y 2'-desoxicoformicina (pentoestatina), etc.), antagonistas de pirimidina (por ejemplo, fluoropirimidinas (por

- ejemplo, 5-fluorouracilo (ADRUCILO), 5-fluorodesoxiuridina (FdUrd) (floxuridina) etc.) y arabinósidos de citosina (por ejemplo, CITOSAR (ara-C) y fludarabina, etc.); 5) enzimas, incluyendo L-asparraginasa e hidroxiaurea, etc.; 6) hormonas, incluyendo glucocorticoides, antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno, etc.), antiandrógenos no esteroideos (por ejemplo, flutamida, etc.), e inhibidores de la aromatasas (por ejemplo, anastrozol (ARIMIDAX), etc.); 7) compuestos de platino (por ejemplo, cisplatino y carboplatino, etc.); 8) anticuerpos monoclonales conjugados con fármacos antineoplásicos, toxinas y / o radionucleidos, etc.; 9) modificadores de la respuesta biológica (por ejemplo, interferones (por ejemplo, IFN- α , etc.) e interleucinas (por ejemplo, IL-2, etc.), etc.); 10) inmunoterapia pasiva; 11) factores de crecimiento hematopoyéticos; 12) agentes que inducen la diferenciación celular tumoral (por ejemplo, ácido todo-trans-retinoico, etc.); 13) técnicas de terapia génica; 14) técnicas de terapia antisentido; 15) vacunas tumorales; 16) terapias dirigidas contra metástasis tumorales (por ejemplo, batimastat, etc.); 17) inhibidores de la angiogénesis; 18) inhibidores de proteosoma (por ejemplo, VELCADE); 19) inhibidores de la acetilación y / o la metilación (por ejemplo, inhibidores de HDAC); 20) moderadores de NF kappa B; 21) inhibidores de la regulación del ciclo celular (por ejemplo, inhibidores de la CDK); 22) moderadores de la función de la proteína p53; y 23) radiación.
- 15 **[0077]** Cualquier agente oncolítico que se use rutinariamente en un contexto de terapia halla uso en las composiciones y los procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, la *Food and Drug Administration* de Estados Unidos mantiene un formulario de agentes oncolíticos aprobado para su uso en los Estados Unidos. Las agencias homólogas internacionales de la U.S.F.D.A. mantienen formularios similares. La Tabla X proporciona una lista de agentes antineoplásicos ejemplares aprobados para su uso en los Estados Unidos. Los expertos en la materia apreciarán que las "etiquetas de producto" requeridas en todos los quimioterapéuticos aprobados en EE.UU. describen indicaciones, información de dosificación, datos de toxicidad y similares aprobados para los agentes ejemplares.

Aldelesleucina (des-alanil-1, serina-125 interleucina-2 humana)	Proleukin	Chiron Corp., Emeryville, CA
Alemtucumab (IgG1k anticuerpo anti-CD52)	Campath	Millennium y ILEX Partners, LP, Cambridge, MA
Alitretinoína (ácido 9-cis-retinoico)	Panretin	Ligy Pharmaceutical, Inc., San Diego CA
Alopurinol (1,5-dihidro-4H piracolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, sal monosódica)	Zyloprim	GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC
Altretamina (N,N,N',N',N'',N'',-hexametil-1,3,5-triacin-2, 4, 6-triamina)	Hexalen	US Bioscience, West Conshohocken, PA
Amifostina (etanotiol, 2-[(3-aminopropil)amino]-, dihidrogenofosfato (éster))	Ethyol	US Bioscience
Anastrocol (1,3-bencenodiacetonitrilo, a, a, a', a'-tetrametil-5-(1H-1,2,4-triacol-1-ilmetil))	Arimidex	AstraZeneca Pharmaceuticals, LP, Wilmington, DE
Trióxido de arsénico	Trisenox	Cell Therapeutic, Inc., Seattle, WA
Asparraginasas (amidohidrolasa de L-asparragina, de tipo EC-2)	Elspar	Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ
BCG vivo (preparación de utilizada de una cepa atenuada de <i>Micobacterium bovis</i> (Bacilo de Calmette-Gucina [BCG], subcepa Montreal)	TICE BCG	Organon Teknika, Corp., Durham, NC
Cápsulas de bexaroteno (ácido 4-[1-(5,6,7,8-tetrahidro-3,5,5,8,8-pentametil-2-naftalenil) etenil] benzoico)	Targretin	Ligy Pharmaceuticals
Gel de bexaroteno	Targretin	Ligy Pharmaceuticals
Bleomicina (antibióticos glicopeptídicos citotóxicos producidos por <i>Streptomyces verticillus</i> ; bleomicina A2 y bleomicina B2)	Blenoxane	Bristol-Myers Squibb Co., NY, NY
Capecitabina (5'-desoxi-5-fluoro-N-[(pentiloxi)carbonil]-citidina)	Xeloda	Roche
Carboplatino (platino, diamina [1,1-ciclobutanedicarboxilato(2-)-0, 0']-, (SP-4-2))	Paraplatin	Bristol-Myers Squibb
Carmustina (1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea)	BCNU, BiCNU	Bristol-Myers Squibb
Carmustina con un implante de Polifeprosan 20	Gliadel Wafer	Guilford Pharmaceuticals, Inc., Baltimore, MD
Celecoxib (en forma de 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-piracolo-1-il] bencenosulfonamida)	Celebrex	Searle Pharmaceuticals, England
Clorambucilo (ácido 4-[bis(2cloroetil) amino]bencenobutanoico)	Leukeran	GlaxoSmithKline
Cisplatino (PLCl ₂ H ₆ N ₂)	Platinol	Bristol-Myers Squibb
Cladribina (2-cloro-2'-desoxi-b-D-adenosina)	Leustatin, 2-CdA	R. W. Johnson Pharmaceutical

		Research Institute, Raritan, NJ
Ciclofosfamida (2-óxido de 2-[bis(2-cloroetil)amino] tetrahidro-2H-13,2-oxacafosforina monohidratado)	Cytoxan, Neosar	Bristol-Myers Squibb
Citarabina (1-b-D-Arabinofuranosilcitosina, C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅)	Cytosar-U	Pharmacia & Upjohn Company
Citarabina liposómica	DepoCyt	Skye Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA
Dacarbacina (5-(3,3-dimetil-1-triacen)-imidacól-4-carboxamida (DTIC))	DTIC-Dome	Bayer AG, Leverkusen, Germany
Dactinomicina, actinomicina D (actinomicina producida por <i>Streptomyces parvullus</i> , C ₆₂ H ₈₆ N ₁₂ O ₁₆)	Cosmegen	Merck
Darbepoyetina alfa (péptido recombinante)	Aranesp	Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA
daunorubicina liposómica (clorhidrato de (8S-cis)-8-acetil-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi-á-L-lixo-hexopiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,5,11-trihidroxi-1-metoxi-5,12-naftacenediona)	DanuoXome	Nexstar Pharmaceuticals, Inc., Boulder, CO
Daunorubicina HCl, daunomicina (clorhidrato de (1S,3S)-3-acetil-1,2,3,4,6,11-hexahidro-3,5,12-trihidroxi-10-metoxi-6,11-dioxo-1-naftaceniil 3-amino-2,3,6-trideoxi-(alfa)-L-lixo-hexopiranósido)	Cerubidine	Wyeth Ayerst, Madison, NJ
Denileucina diftitox (péptido recombinante)	Ontak	Seragen, Inc., Hopkinton, MA
Dextracoxano ((S)-4,4'-(1-metil-1,2-etanodil)bis-2,6-piperacindiona)	Zinecard	Pharmacia & Upjohn Company
Docetaxel (N-terc-butil éster de (2R,3S)-N-carboxi-3-fenilisoserina, 13-éster con 4-acetato 2-benzoato de 5b-20-epoxi-12a,4,7b,10b,13a-hexahidroxitax-11-en-9-ona, trihidrato)	Taxotere	Aventis Pharmaceuticals, Inc., Bridgewater, NJ
Doxorrubicina HCl (clorhidrato de 8S,10S)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi-a-L-lixo-hexopiranosil)oxi]-8-glicolil-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-1-metoxi-5,12-naftacenediona)	Adriamycin, Rubex	Pharmacia & Upjohn Company
doxorrubicina	Adriamycin PFS Intravenous injection	Pharmacia & Upjohn Company
doxorrubicina liposómica	Doxil	Sequus Pharmaceuticals, Inc., Menlo park, CA
propionato de dromostanolona (propionato de 17b-hidroxi-2a-metil-5a-androstan-3-ona)	Dromostanolone	Eli Lilly & Company, Indianapolis, IN
propionato de dromostanolona	Masterone injection	Syntex, Corp., Palo Alto, CA
disolución B de Elliott	Elliott's B Solution	Orphan Medical, Inc
Epirubicina (clorhidrato de (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi-a-L-arabino-hexopiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenediona)	Ellence	Pharmacia & Upjohn Company
Epoyetina alfa (péptido recombinante)	Epogen	Amgen, Inc
Estramustina (estra-1,3,5 (10)-triene-3,17-diol(17(beta))-, 3-[bis(2-cloroetil)carbamato] 17-(dihidrogenofosfato), sal disódica, monohidratada, o estradiol 3-[bis(2-cloroetil)carbamato] 17-(dihidrogenofosfato), sal disódica, monohidratada)	Emcyt	Pharmacia & Upjohn Company
fosfato de etopósido (4'-desmetilepipodofilotoxina 9-[4,6-O-(R)-etiliden-(beta)-D-glucopiranósido], 4'-(dihidrogenofosfato))	Etopophos	Bristol-Myers Squibb
etopósido, VP-16 (4'-desmetilepipodofilotoxina 9-[4,6-O-(R)-etiliden-(beta)-D-glucopiranósido])	Vepesid	Bristol-Myers Squibb
Exemestano (6-metilenandrosta-1,4-dieno-3,17-diona)	Aromasin	Pharmacia & Upjohn Company
Filgrastim (r-metuG-CSF)	Neupogen	Amgen, Inc
floxuridina (intraarterial) (2'-desoxi-5-	FUDR	Roche

fluorouridina)		
Fludarabina (nucleótido fluorado análogo del agente antivírico vidarabina, 9-b-D-arabinofuranosiladenina (ara-A))	Fludara	Berlex Laboratories, Inc., Cedar Knolls, NJ
Fluorouracilo, 5-FU (5-fluoro-2,4(1H, 3H)-pirimidindiona)	Adrucil	ICN Pharmaceuticals, Inc., Humacao, Puerto Rico
Fulvestrant (7-alfa-[9-(4,4,5,5,5-penta fluoropentilsulfonil)nonil] estra-1,3,5-(10)- trien-3,17-beta-diol)	Faslodex	IPR Pharmaceuticals, Guayama, Puerto Rico
Gemcitabina (2'-deoxi-2', 2'-difluorocitidina monoclóridato (isómero b))	Gemzar	Eli Lilly
Gemtucumab Ocogamicina (anti-CD33 hP67.6)	Mylotarg	Wyeth Ayerst
acetato de goserrelina (sal de acetato de [D-Ser(But)6,Acgli10]LHRH; piro-Glu-His-Trp-Ser-Tir-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Acgl-NH ₂ acetato [C ₅₉ H ₈₄ N ₁₈ O ₁₄ • (C ₂ H ₄ O ₂) _x)	Zoladex Implant	AstraZeneca Pharmaceuticals
Hidroxiurea	Hydrea	Bristol-Myers Squibb
Ibritumomab Tiuxetan (inmunoconjugado resultante de un enlace covalente de tiourea entre el anticuerpo monoclonal Ibritumomab y el conector-quelante tiuxetan [N-[2-bis(carboximetil)amino]-3-(p-isotiocianatofenil)-propil]-[N-[2-bis(carboximetil) amino]-2-(metil) -etil]glicina)	Zevalin	Biogen IDEC, Inc., Cambridge MA
Idarrubicina (5,12-naftacenediona, 9-acetil-7-[(3-amino-2,3,6-trideoxi-(alfa)-L-lixo - hexopiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,9,11-trihidroxihidroclorhirato, (7S- cis))	Idamycin	Pharmacia & Upjohn Company
Ifosfamida (2-óxido de 3-(2-cloroetil)-2-[(2-cloroetil)amino]tetrahidro-2H-1,3,2-oxacafosforina)	IFEX	Bristol-Myers Squibb
Mesilato de Imatinib (metansulfonato de 4-[(4-metil-1-piperacil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil] amino]-fenil]bencamida)	Gleevec	Novartis AG, Basel, Switzerland
Interferón alfa-2a (péptido recombinante)	Roferon-A	Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, NJ
Interferón alfa-2b (péptido recombinante)	Intron A (Lyophilized Betaseron)	Schering AG, Berlin, Germany
Irinotecán HCl (clorhidrato de (4S)-4,11-dietil-4-hidroxi-9-[(4- piperidinopiperidino) carboniloxi]-1H-pirano[3', 4': 6,7] indolico[1,2-b] quinolin-3,14(4H, 12H) diona, trihidratado)	Camptosar	Pharmacia & Upjohn Company
Letrocote (4,4'-(1H-1,2,4-triacol-1-ilmetilen) dibenzonitrilo)	Femara	Novartis
Leucovorin (ácido L-glutámico, N[4[[(2-amino-5-formil-1,4,5,6,7,8 hexahidro4oxo6-pteridinil)metil] amino]benzoil], sal cálcica (1: 1))	Wellcovorin, Leucovorin	Immunex, Corp., Seattle, WA
Levamisol HCl (monoclóridato de (-)-(S)-2,3,5, 6-tetrahidro-6-fenilimidaco [2,1-b] tiacol C ₁₁ R ₁₂ N ₂ S · HCl)	Ergamisol	Janssen Research Foundation, Titusville, NJ
Lomustina (1-(2-cloro-etil)-3-ciclohexil-1-nitrosourea)	CeeNU	Bristol-Myers Squibb
Mecloretamina, mostaza nitrogenada (clorhidrato de 2-cloro-N-(2-cloroetil)-N-metiletanamina)	Mustargen	Merck
acetato de megestrol 17α(acetiloxi)-6-metilpregna- 4,6-dieno-3,20-diona	Megace	Bristol-Myers Squibb
Melfalan, L-PAM (4-[bis(2-cloroetil) amino]-L-fenilalanina)	Alkeran	GlaxoSmithKline
Mercaptopurina, 6-MP (monohidrato de 1,7-dihidro-6 H purina-6-tiona)	Purinethol	GlaxoSmithKline
Mesna (sulfonato sódico de 2-mercaptoetano)	Mesnex	Asta Medica
Metotrexato (ácido N-[4-[[2,4-diamino-6-pteridinil)metil]metilamino] benzoil]-L-glutámico)	Methotrexate	Lederle Laboratories

ES 2 383 306 T3

Metoxsalen (9-metoxi-7H-furo [3,2-g][1]-benzopiran-7-ona)	Uvadex	Therakos, Inc., Way Exton, Pa
Mitomicina C	Mutamycin	Bristol-Myers Squibb
mitomicina C	Mitozytrex	SuperGen, Inc., Dublin, CA
Mitotano (1,1-dicloro-2-(o-clorofenil)-2-(p-clorofenil) etano)	Lysodren	Bristol-Myers Squibb
Mitoxantrona (diclorhidrato de 1,4-dihidroxi-5,8-bis[[2- [(2-hidroxietil)amino]etil] amino]-9,10-antracenodiona)	Novantrone	Immunex Corporation
fenpropionato de nandrolona	Durabolin-50	Organon, Inc., West Orange, NJ
Nofetumomab	Verluma	Boehringer Ingelheim Pharma KG, Germany
Oprelvecina (IL-11)	Neumega	Genetics Institute, Inc., Alexandria, VA
Oxaliplatino (cis-[(1R,2R)-1,2-ciclohexanodiamina-N,N'] [oxalato (2-)-O,O'] platino)	Eloxatin	Sanofi Synthelabo, Inc., NY, NY
Paclitaxel (4,10-diacetato 2-benzoato 13-éster de 5B, 20-epoxi-1,2a, 4,7B, 10B, 13a-hexahidroxitax-11-en-9-ona con (2R, 3 S)- N-benzoil-3-fenilisoserina)	TAXOL	Bristol-Myers Squibb
Pamidronato (ácido fosfónico (3-amino-1-hidroxiopropilidene) bis-, sal disódica, pentahidratada, (APD))	Aredia	Novartis
Pegademasa ((desaminasa de monometoxipolietilenglicol succinimidil) 11 - 17 -adenosina)	Adagen (Pegademase Bovine)	Enzon Pharmaceuticals, Inc., Bridgewater, NJ
Pegaspargasa (L-asparraginas de monometoxipolietilenglicol succinimidilo)	Oncaspar	Enzon
Pegfilgrastim (conjugado covalente de metionil G-CSF humano recombinante (Filgrastim) y monometoxipolietilenglicol)	Neulasta	Amgen, Inc
Pentostatin	Nipent	Parke-Davis Pharmaceutical Co., Rockville, MD
Pipobroman	Vercyte	Abbott Laboratories, Abbott Park, IL
Plicamicina, Mitramicina (antibiótico producido por <i>Streptomyces plicatus</i>)	Mithracin	Pfizer, Inc., NY, NY
Porfimer sódico	Photofrin	QLT Phototherapeutics, Inc., Vancouver, Canada
Procarbacia (monoclorhidrato de N-isopropil-μ-(2-metilhidracin)-p-toluamida)	Matulane	Sigma Tau Pharmaceuticals, Inc., Gaithersburg, MD
Quinacrina (6-cloro-9-(1-metil-4-dietilamina) butilamino-2-metoxiacridina)	Atabrine	Abbott Labs
Rasburicasa (péptido recombinante)	Elitek	Sanofi-Synthelabo, Inc.,
Rituximab (anticuerpo recombinante anti-CD20)	Rituxan	Genentech, Inc., South San Francisco, CA
Sargramostim (péptido recombinante)	Prokine	Immunex Corp
Estreptococina (estreptococina 2 -desoxi - 2 - [[(metilnitrosoamino)carbonil] amino] - a(y b) - D - glucopiranososa y 220 mg de ácido cítrico anhidro)	Zanosar	Pharmacia & Upjohn Company
Talco (Mg ₃ Si ₄ O ₁₀ (OH) ₂)	Sclerosol	Bryan, Corp., Woburn, MA
Tamoxifeno (2-hidroxi-1,2,3-propanoicocarboxilato de (C)2-[4-(1,2-difenil-1-butenil) fenoxi]-N, N-dimetiletanamina (1: 1))	Nolvadex	AstraZeneca Pharmaceuticals
Temocolomida (3,4-dihidro-3-metil-4-oxoimidaco[5,1-d]-as-tetracine-8-carboxamida)	Temodar	Schering
tenipósido, VM-26 (4'-desmetilpipodofilotoxin 9-[4,6-0-(R)-2-teniliden-(beta)-D-glucopiranosido])	Vumon	Bristol-Myers Squibb
Testolactona (ácido 13-hidroxi-3-oxo-13,17-secoandrosta-1,4-dien-17-oico [dgr]-lactona)	Teslac	Bristol-Myers Squibb
Tioguanina, 6-TG (2-amino-1,7-dihidro-6H -	Thioguanine	GlaxoSmithKline

purina-6-tiona)		
Tiotepa (aciridina, 1,1',1"-fosfotioilidinetris-, o sulfuro de Tris (1-aciridinil) fosfina)	Thioplex	Immunex Corporation
Topotecan HCl (monoclorhidrato de (S)-10-[[dimetilamino] metil]-4-etil-4,9-dihidroxi-1H-pirano[3', 4': 6,7] indolizin [1,2-b] quinolin-3,14-(4H,12H)-diona)	Hycamtin	GlaxoSmithKline
Toremifeno (citrato de 2-(p-[(C)-4-cloro-1,2-difenil-1-butenil]-fenoxi)-N,N-dimetiletilamina (1: 1))	Fareston	Roberts Pharmaceutical Corp., Eatontown, NJ
Tositumomab, I 131 Tositumomab (anticuerpo inmunoterapéutico monoclonal recombinante murino IgG2a lambda anti-CD20 (I 131 es un anticuerpo radioinmunoterapéutico))	Bexxar	Corixa Corp., Seattle, WA
Trastucumab (anticuerpo monoclonal recombinante IgG1 kappa anti-HER2)	Herceptin	Genentech, Inc
Tretinoin, ATRA (ácido todo-trans retinoico)	Vesanoid	Roche
Mostaza de uracilo	Cápsulas de mostaza de uracilo	Roberts Labs
Valrubicina, N-trifluoroacetiladriamicin-14-valerato pentanoato de ((25-cis)-2-[1,2,3,4,6,11-hexahidro-2,5,12-trihidroxi-7 metoxi-6,11-dioxo-[[4 2,3,6-trideoxi-3-[(trifluoroacetil)-amino- α -L- <i>lixo</i> -hexopiranosil]oxil]-2-naftacenil]-2-oxoetilo)	Valstar	Anthra --> Medeva
Vinblastina, Leurocistina (C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₀ · H ₂ SO ₄)	Velban	Eli Lilly
Vincristina (C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₀ ·H ₂ SO ₄)	Oncovin	Eli Lilly
Vinorelbina ([R-(R*,R*)-2,3-dihidrobutanedioato de 3',4'-dideshidro-4'-desoxi-C'-norvincalécoblastina (1: 2) (sal)])	Navelbine	GlaxoSmithKline
Coledronato, ácido coledrónico (ácido (1-hidroxi-2-imidacol-1-il-fosfonoetil) fosfónico monohidratado)	Zometa	Novartis

[0078] Los agentes terapéuticos antimicrobianos también pueden usarse como agentes terapéuticos en la presente invención. Puede usarse cualquier agente que pueda destruir, inhibir o atenuar de otro modo la función de los organismos microbianos, así como cualquier agente contemplado que tenga dichas actividades. Algunos agentes antimicrobianos incluyen, pero no se limitan a, antibióticos naturales y sintéticos, anticuerpos, inhibidores de proteínas (por ejemplo, defensinas), ácidos nucleicos antisentido, agentes desorganizadores de la membrana y similares, usados solos o en combinación. De hecho, puede usarse cualquier tipo de antibiótico incluyendo, pero no limitándose a, agentes antibacterianos, agentes antivíricos, agentes antifúngicos y similares.

[0079] En este documento se desvelan compuestos terapéuticos asociados con agentes de marcaje de objetivos que son capaces de dirigirse específicamente a tipos celulares en particular (por ejemplo, células tumorales). Generalmente, el compuesto terapéutico que está asociado con un agente de marcaje, se dirige a las células neoplásicas mediante la interacción del agente de marcaje con una fracción superficial que es interiorizada por la célula a través de una endocitosis mediada por receptor.

[0080] Cualquier fracción que se sabe que está ubicada en la superficie de las células objetivo (por ejemplo, células tumorales) halla uso. Por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra dicha fracción dirige las composiciones a las superficies celulares que contienen la fracción. Alternativamente, la fracción de marcaje puede ser cualquier ligando dirigido a un receptor presente en la superficie celular, o viceversa. De forma similar, también pueden usarse vitaminas para dirigir a los terapéuticos a una célula en particular.

[0081] Según se usa en este documento, el término "moléculas de marcaje" se refiere a fracciones químicas y a porciones de las mismas útiles para dirigir compuestos terapéuticos a células, tejidos y órganos de interés. Se contemplan varios tipos de moléculas de marcaje que incluyen, pero no se limitan a, péptidos de señalización, anticuerpos, ácidos nucleicos, toxinas y similares. Las fracciones de marcaje pueden promover adicionalmente la unión de los compuestos químicos asociados (por ejemplo, moléculas pequeñas) o la entrada de los compuestos en las células, tejidos y órganos objetivo. Preferiblemente, las fracciones de marcaje se eligen según su especificidad, afinidad y eficacia para administrar selectivamente compuestos unidos a sitios marcados en un sujeto, un tejido o una célula, incluyendo ubicaciones y orgánulos subcelulares específicos.

[0082] Varios problemas de eficacia afectan a la administración de todos los fármacos, y a los fármacos altamente citotóxicos (por ejemplo, fármacos antineoplásicos) en particular. Un problema de particular importancia es

asegurarse de que los agentes administrados sólo afectan a las células (por ejemplo, células tumorales), tejidos u órganos objetivo. La administración no específica o no deliberada de agentes altamente citotóxicos a células no objetivo pueden provocar graves problemas de toxicidad.

5 **[0083]** Se han realizado numerosos intentos para diseñar planes de administración selectiva de fármacos para abordar los problemas asociados con la administración no específica de fármacos. (Véase, por ejemplo, K. N. Syrigos y A. A. Epenetos *Anticancer Res.*, 19: 606 – 614 (1999); Y. J. Park y col., *J. Controlled Release*, 78: 67 – 79 (2002); R. V. J. Chari, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 31: 89 – 104 (1998); y D. Putnam y J. Kopecek, *Adv. Polymer Sci.*, 122: 55 – 123 (1995)). Se ha usado la conjugación de fracciones de marcaje tales como anticuerpos y péptidos ligados (por ejemplo, RDG para células endoteliales) de moléculas de fármacos para aliviar algunos problemas de toxicidad colaterales asociados con fármacos en particular. Sin embargo, la conjugación de fármacos con fracciones de marcaje por sí misma no anula completamente los potenciales efectos secundarios sobre las células no objetivo, dado que los fármacos son habitualmente bioactivos en su camino hacia las células objetivo. Los avances en el marcaje de conjugados fracción-profármaco, que son inactivos mientras viajan hacia los tejidos objetivo específicos, han disminuido algunas de estas inquietudes. Una biotransformación, tal como una escisión enzimática, típicamente convierte el profármaco en una molécula biológicamente activa en el sitio objetivo.

20 **[0084]** Consecuentemente, en este documento se desvelan conjugados de profármacos que son inactivos está que alcanzan su sitio objetivo, donde subsiguientemente son convertidos en una molécula farmacológica terapéutica activa. ADEPT y ATTEMPTS son dos sistemas de administración de profármacos ejemplares. (Véase, K. N. Syrigos y A. A. Epenetos, *Anticancer Res.*, 19: 606 – 614 (1999); K. D. Bagshawe, *Brit. J. Cancer*, 56: 531 – 532 (1987); Y. J. Park y col., *J. Controlled Release*, 72: 145 – 156 (2001); y Y. J. Park y col., *J. Controlled Release*, 78: 67 – 79 (2002)).

25 **[0085]** El rápido aclaramiento de algunos tipos de agentes terapéuticos, especialmente los agentes solubles en agua de bajo peso molecular, del torrente sanguíneo del sujeto, proporciona otro obstáculo más para la administración eficaz de moléculas pequeñas. Algunos otros obstáculos proceden del rápido aclaramiento (por ejemplo, la degradación proteolítica) o de la potencial inmunogenicidad de los agentes administrados.

30 **[0086]** En los sistemas naturales, el aclaramiento y otros comportamientos farmacocinéticos de moléculas pequeñas (por ejemplo, fármacos) en un sujeto están regulados por una serie de proteínas de transporte. (Véase, por ejemplo, H. T. Nguyen, *Clin. Chem. Lab. Anim.*, (2ª ed.) págs. 309 – 335 (1999); y G. J. Russell – Jones y D. H. Alpers, *Pharm. Biotechnol.*, 12: 493 – 520 (1999)). Por lo tanto, se considera la farmacocinética de los agentes cuando se ensayan y desarrollan terapéuticos potenciales.

35 **[0087]** La tasa de aclaramiento de un agente en un sujeto es típicamente manejable. Por ejemplo, la fijación (por ejemplo, la unión) del agente a un portador macromolecular normalmente prolonga los tiempos de circulación y de retención. Consecuentemente, las moléculas pequeñas pueden conjugarse con polietilenglicol (PEG) o biopolímeros similares para disminuir (evitar) la degradación de las moléculas y para mejorar su retención en el torrente sanguíneo del sujeto. (Véase, por ejemplo, R. B. Greenwald y col., *Critical Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst.*, 17: 101 – 161 (2000)). La capacidad del PEG para disuadir las interacciones proteína-proteína puede reducir la inmunogenicidad de muchos fármacos.

45 **[0088]** Otro problema que afecta a la administración de algunos agentes terapéuticos, y especialmente a fármacos macromoleculares hidrófilos tales como péptidos y ácidos nucleicos, es que estos agentes tienen dificultad para atravesar las membranas celulares del objetivo. Las moléculas hidrófobas pequeñas (típicamente de menos de 1.000 Daltons) son menos susceptibles de tener dificultades para entrar en las membranas celulares del objetivo. Además, los fármacos citotóxicos de bajo peso molecular a menudo se localizan más eficazmente en tejidos normales en lugar de en los tejidos objetivo, tales como tumores (K. Bosslet y col., *Cancer Res.*, 58: 1195 – 1201 (1998)) debido a la elevada presión intersticial y a las desfavorables propiedades de flujo sanguíneo de los tumores de crecimiento rápido (R. K. Jain, *Int. J. Radiat. Biol.*, 60: 85 – 100 (1991); y R. K. Jain y L.T. Baxter, *Cancer Res.*, 48: 7022 – 7032 (1998)).

55 **[0089]** Pueden usarse los siguientes procedimientos o composiciones para ayudar a la administración de las composiciones terapéuticas, especialmente de agentes citotóxicos: microinyección (véase, por ejemplo, M. Foldvari y M. Mezei, *J. Pharm. Sci.*, 80: 1020 – 1028, (1991)); carga por abrasión (véase, por ejemplo, P. L. McNeil y col., *J. Cell Biol.*, 98: 1556 – 1564 (1984)); electroporación (véase, por ejemplo, R. Chakrabarti y col., *J. Biol. Chem.*, 266: 15494 – 15500 (1991)); liposomas (véase, por ejemplo, M. Foldvari y col., *J. Pharm. Sci.*, 80: 1020 – 1028 (1991); y J.N. Moreira y col., *Biochim Biophys Acta.*, 515: 167 – 176 (2001)); nanoportadores tales como polímeros solubles en agua (por ejemplo, permeación y retención mejoradas, *enhanced permeation y retention* "EPR", véase, por ejemplo, H. Maeda y col., *J. Controlled Release*, 65: 271 – 284 (2000); H. Maeda y col., *supra*; y L. W. Seymour, *Crit. Rev. Therapeu. Drug Carrier Systems*, 9: 135 – 187 (1992)); toxinas bacterianas (véase, por ejemplo, T. I. Prior y col., *Biochemistry*, 31: 3555 – 3559 (1992); y H. Stenmark y col., *J. Cell Biol.*, 113: 1025 – 1032 (1991)); endocitosis y fagocitosis mediadas por receptor, incluyendo el sistema del profármaco activado por el tumor (*tumor-activated prodrug*, TAP) (véase, por ejemplo, R. V. J. Chari, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 31: 89 – 104 (1998); I. Mellman, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12: 575 – 625 (1996); C. P. Leamon y P. S. Low, *J. Biol. Chem.*, 267 (35): 24966 – 24971 (1992); H.

Ishihara y col., Pharm. Res., 7: 542 – 546 (1990); S .K. Basu, Biochem. Pharmacol., 40: 1941 – 1946 (1990); y G. Y. Wu y C. H. Wu, Biochemistry, 27: 887 – 892 (1988)); en la materia se conocen otras composiciones y procedimientos adecuados.

5 **[0090]** Los compuestos y agentes antitumorales pueden administrarse en cualquier portador farmacéutico
 10 estéril biocompatible, incluyendo, pero no limitándose a, disolución salina, disolución salina tamponada, glucosa y
 agua. Las composiciones farmacéuticas desveladas en este documento pueden contener un agente (por ejemplo, un
 anticuerpo). Las composiciones farmacéuticas también pueden contener una mezcla de al menos dos agentes (por
 15 ejemplo, un anticuerpo y uno o más agentes antitumorales convencionales). Las composiciones farmacéuticas
 desveladas pueden contener al menos dos agentes que se administran a un paciente en una o más de las
 siguientes condiciones: con diferentes periodicidades, con diferentes duraciones, a diferentes concentraciones,
 mediante diferentes vías de administración, etc. El compuesto terapéutico puede administrarse antes que el agente
 antitumoral, por ejemplo, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12 ó 18 horas, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 días, 1, 2, 3 ó 4 semanas antes de la
 20 administración del agente antitumoral. El compuesto terapéutico puede administrarse después del agente
 antitumoral, por ejemplo 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12 ó 18 horas, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 días, 1, 2, 3 ó 4 semanas después de la
 administración del agente antitumoral. El compuesto terapéutico y el agente activo tumoral pueden administrarse
 conjuntamente pero con pautas diferentes, por ejemplo, el compuesto terapéutico se administra diariamente
 mientras que el agente antitumoral se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada
 tres semanas o una vez cada cuatro semanas. El compuesto terapéutico puede administrarse una vez a la semana
 25 mientras que el agente antitumoral se administra diariamente, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una
 vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas.

[0091] Dependiendo de la dolencia que se vaya a tratar, las formas de realización preferidas de las presentes
 30 composiciones farmacéuticas se formulan y se administran sistémicamente o localmente. Las técnicas para la
 formulación y la administración pueden encontrarse en la última edición de "Remington's Pharmaceutical Sciences"
 (Mack Publishing Co, Easton Pa.). Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, la
 administración oral o transmucosa, así como la administración por vía parenteral (por ejemplo, administración
 35 intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal o intranasal).

[0092] En este documento se desvela la administración de compuestos terapéuticos y uno o más agentes
 40 antitumorales convencionales, según procedimientos de administración y técnicas de preparación farmacéuticas
 aceptables. Por ejemplo, los compuestos terapéuticos y los agentes antitumorales adecuados pueden administrarse
 a un sujeto por vía intravenosa en un portador farmacéuticamente aceptable tal como disolución salina fisiológica.
 Se contemplan procedimientos estándar para la administración intracelular de agentes farmacéuticos (por ejemplo,
 45 administración a través de liposomas). Dichos procedimientos son bien conocidos por los expertos habituales en la
 materia.

[0093] En algunas formas de realización, las formulaciones de la presente invención son útiles para su
 50 administración por vía parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intramedular e
 intraperitoneal). También puede conseguirse la coadministración terapéutica de algunos agentes antitumorales
 contemplados (por ejemplo, polipéptidos terapéuticos) usando reactivos y técnicas de terapia génica.

[0094] El anticuerpo anti-Notch se administra a un sujeto en combinación con uno o más agentes
 55 antitumorales convencionales según se describe en este documento. En las formas de realización preferidas de la
 presente invención, los portadores farmacéuticamente aceptables son biológicamente inertes. En las formas de
 realización preferidas, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se formulan usando portadores
 farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la materia en dosis adecuadas para su administración por vía oral.
 Dichos portadores permiten que las composiciones farmacéuticas sean formuladas como comprimidos, píldoras,
 60 cápsulas, grageas, lípidos, geles, jarabes, suspensiones, disoluciones y similar, para su respectiva ingestión oral o
 nasal por un sujeto.

[0095] Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse combinando los compuestos activos
 con excipientes sólidos, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla en gránulos, después
 65 de añadir sustancias auxiliares adecuadas, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Algunos
 excipientes adecuados son rellenos de carbohidratos o de proteína tales como azúcares, incluyendo lactosa,
 sacarosa, manitol o sorbitol; almidones de maíz, de trigo, de arroz, de patata, etc.; celulosa tal como metil celulosa,
 hidroxilpropilmetil celulosa o carboximetil celulosa sódica; gomas incluyendo arábica y de tragacanto; y proteínas
 tales como gelatina y colágeno. Si se desea pueden añadirse agentes dispersantes o disgregantes, tales como
 polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido alginico o una sal del mismo tal como alginato sódico.

[0096] Para su inyección, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse en disoluciones
 70 acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de
 Ringer o disolución salina tamponada fisiológicamente. Para su administración tisular o celular se usan penetrantes
 apropiados según la barrera en particular que vaya a atravesar. Dichos penetrantes son conocidos por los expertos
 en la materia.

- 5 **[0097]** Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el propósito pretendido. La determinación de una cantidad eficaz de un agente es competencia de los expertos en la materia farmacológica, especialmente a la vista de la desvelación proporcionada en este documento.
- 10 **[0098]** Además de los principios activos, las composiciones farmacéuticas preferidas pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y sustancias auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en formas farmacéuticamente útiles.
- 15 **[0099]** Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden elaborarse usando cualquier técnica aceptable para preparar composiciones farmacéuticas que incluyen, pero no se limitan a, medios y procesos convencionales de mezcla, disolución, granulado, elaboración de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, liofilización y similares.
- 20 **[0100]** Las formulaciones ingeribles de las presentes composiciones pueden incluir adicionalmente cualquier material aprobado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos para su inclusión en alimentos y sustancias que son generalmente reconocidas como seguras (*generally recognized as safe*, GRAS), tales como aditivos alimentarios, saborizantes, colorantes, vitaminas, minerales y fitonutrientes. El término fitonutrientes, según se usa en este documento, se refiere a compuestos orgánicos aislados a partir de plantas que tienen un efecto biológico, e incluye, pero no se limita a, compuestos de las siguientes clases: isoflavonoides, proantocianidinas oligómeras, indol-3-carbinol, sulforafona, ligandos fibrosos, fitoesteroles vegetales, ácido ferúlico, antocianósidos, triterpenos, ácidos grasos omega 3 / 6, poliacetileno, quinonas, terpenos, catequinas, galatos y quercitina.
- 25 **[0101]** Se proporcionan núcleos de grageas con recubrimientos adecuados tales como disoluciones de azúcar concentradas, que también pueden contener, arábigo, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y / o dióxido de titanio, disoluciones de laqueado y disolventes orgánicos adecuados o mezclas disolventes. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para la identificación del producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo (es decir, la dosis).
- 30 **[0102]** Las preparaciones farmacéuticas contempladas para su administración por vía oral incluyen cápsulas *push-fit* hechas de gelatina, así como cápsulas blandas cerradas de gelatina y un recubrimiento tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas *push-fit* pueden contener los principios activos mezclados con agentes de relleno o ligantes tales como lactosa o almidones, lubricantes tales como talco o estearato magnésico, y opcionalmente, estabilizantes. En algunas cápsulas blandas, los compuestos activos están disueltos o suspendidos en un líquido disolvente adecuado, tal como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicol líquido, con o sin estabilizantes.
- 35 **[0103]** Las formulaciones farmacéuticas para su administración por vía parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos. Las suspensiones acuosas para inyección contienen opcionalmente sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextrano. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones oleosas para inyección apropiadas. En este aspecto, los vehículos o disolventes lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Opcionalmente, las suspensiones contienen estabilizantes adecuados o agentes que incrementan la solubilidad de los compuestos, permitiendo así la preparación de disoluciones altamente concentradas.
- 40 **[0104]** Los regímenes de dosificación y administración son confeccionados por el profesional clínico u otros expertos en la materia farmacológica, basándose en consideraciones farmacológicas y terapéuticas bien conocidas que incluyen, pero no se limitan a, el nivel deseado de efecto terapéutico y el nivel práctico de efecto terapéutico obtenible. Generalmente, es recomendable seguir los bien conocidos principios farmacológicos para la administración de agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, generalmente es recomendable no modificar las dosis en más de un 50 % de una vez ni más de cada 3 – 4 semividas del agente). Para las composiciones que tienen pocas o ninguna consideración de toxicidad relacionada con la dosis, y en las que se desea una eficacia máxima (por ejemplo, la destrucción de las células tumorales), no son infrecuentes la dosis que exceden la dosis media requerida. Esta metodología de dosificación se denomina a menudo estrategia de la "dosis máxima".
- 45 **[0105]** Otras consideraciones adicionales sobre la dosificación se refieren al cálculo de los niveles de objetivo adecuados para el agente que se va a administrar, la acumulación del agente y la potencial toxicidad, la estimulación de resistencia, la ausencia de eficacia y la descripción del intervalo del índice terapéutico del agente.
- 50 **[0106]** Pueden usarse procedimientos rutinarios para valorar la administración del agente. Una estrategia común para la administración es establecer un nivel objetivo razonable para el agente en el sujeto. Los niveles de agente pueden medirse en el plasma del sujeto. Los niveles de dosificación en las secuencias apropiadas se diseñan entonces para el deseado nivel de objetivo en estado estacionario para el agente. Los niveles reales, o promedios, del agente en el sujeto se monitorizan (por ejemplo, cada hora, cada día, cada semana, etc.), de forma que pueden ajustarse los niveles de dosificación o las frecuencias para mantener los niveles objetivo. Por supuesto, la farmacocinética y la farmacodinamia (por ejemplo, biodisponibilidad, aclaramiento, bioacumulación,
- 55 **[0106]** Pueden usarse procedimientos rutinarios para valorar la administración del agente. Una estrategia común para la administración es establecer un nivel objetivo razonable para el agente en el sujeto. Los niveles de agente pueden medirse en el plasma del sujeto. Los niveles de dosificación en las secuencias apropiadas se diseñan entonces para el deseado nivel de objetivo en estado estacionario para el agente. Los niveles reales, o promedios, del agente en el sujeto se monitorizan (por ejemplo, cada hora, cada día, cada semana, etc.), de forma que pueden ajustarse los niveles de dosificación o las frecuencias para mantener los niveles objetivo. Por supuesto, la farmacocinética y la farmacodinamia (por ejemplo, biodisponibilidad, aclaramiento, bioacumulación,
- 60 **[0106]** Pueden usarse procedimientos rutinarios para valorar la administración del agente. Una estrategia común para la administración es establecer un nivel objetivo razonable para el agente en el sujeto. Los niveles de agente pueden medirse en el plasma del sujeto. Los niveles de dosificación en las secuencias apropiadas se diseñan entonces para el deseado nivel de objetivo en estado estacionario para el agente. Los niveles reales, o promedios, del agente en el sujeto se monitorizan (por ejemplo, cada hora, cada día, cada semana, etc.), de forma que pueden ajustarse los niveles de dosificación o las frecuencias para mantener los niveles objetivo. Por supuesto, la farmacocinética y la farmacodinamia (por ejemplo, biodisponibilidad, aclaramiento, bioacumulación,
- 65 **[0106]** Pueden usarse procedimientos rutinarios para valorar la administración del agente. Una estrategia común para la administración es establecer un nivel objetivo razonable para el agente en el sujeto. Los niveles de agente pueden medirse en el plasma del sujeto. Los niveles de dosificación en las secuencias apropiadas se diseñan entonces para el deseado nivel de objetivo en estado estacionario para el agente. Los niveles reales, o promedios, del agente en el sujeto se monitorizan (por ejemplo, cada hora, cada día, cada semana, etc.), de forma que pueden ajustarse los niveles de dosificación o las frecuencias para mantener los niveles objetivo. Por supuesto, la farmacocinética y la farmacodinamia (por ejemplo, biodisponibilidad, aclaramiento, bioacumulación,

biodistribución, interacciones medicamentosas, etc.) del agente o agentes en particular que se van a administrar pueden afectar potencialmente a los niveles objetivo considerados razonables, y afectar por lo tanto a los niveles o frecuencias de dosificación.

5 **[0107]** Los procedimientos de dosificación para el nivel objetivo se basan típicamente en establecer un objetivo terapéutico razonable definido en términos de un intervalo deseable (un intervalo terapéutico) para el agente en el sujeto. En general, el límite inferior del intervalo terapéutico es aproximadamente igual a la concentración del agente que proporciona aproximadamente el 50 % del efecto terapéutico máximo posible. El límite superior del intervalo terapéutico se establece habitualmente por la toxicidad del agente, y no por su eficacia. El límite superior del intervalo terapéutico para un agente en particular puede ser la concentración a la cual menos de aproximadamente el 5 o el 10 % de los sujetos muestra efectos secundarios tóxicos. En algunas formas de realización, el límite superior del intervalo terapéutico es aproximadamente dos veces, o menos, del límite inferior. Los expertos en la materia comprenderán que estas consideraciones de dosificación son altamente variables, y hasta cierto punto, individualistas (por ejemplo, basadas en predisposiciones genéticas, consideraciones inmunológicas, tolerancias, resistencias y similares). Por lo tanto, los niveles de dosificación objetivo eficaces para un agente en un sujeto en particular pueden ser de 1, ... 5, ... 10, ... 15, ... 20, ... 50, ... 75, ... 100, ... 200, ... X %, mayores que los óptimos en otro sujeto. Por el contrario, algunos sujetos pueden padecer los suficientes efectos secundarios y toxicidad relacionados con problemas de salud a unos niveles de dosificación o frecuencias mucho menores (1, ... 5, ... 10, ... 15, ... 20, ... 50, ... 75, ... 100, ... 200, ... X %) que aquellos que típicamente producen niveles terapéuticos óptimos en algunos o en una mayoría de sujetos. En ausencia de información más específica, los niveles de administración objetivo se establecen a menudo en el centro del intervalo terapéutico.

25 **[0108]** En este documento se desvelan procedimientos de dosificación intermitente, dado que generalmente son indeseables unas fluctuaciones notables en la concentración del agente entre las dosis. En situaciones en las que la absorción y la distribución del agente están equilibradas y son espontáneas, las fluctuaciones en la concentración vienen dictadas por la semivida de eliminación del agente.

30 **[0109]** En las situaciones en las que las composiciones administradas son relativamente no tóxicas, pueden usarse los procedimientos de dosis máxima, porque son bien tolerados incluso a concentraciones del agente varias veces las necesarias para asegurar la eficacia terapéutica. En estos casos, los intervalos de dosificación se alargan, de forma que la concentración del agente en el sistema del sujeto permanezca en el intervalo de eficacia terapéutica durante periodos de tiempo relativamente largos antes de ser eliminado del sujeto, y se requieren administraciones adicionales para llevar el nivel del agente de nuevo al intervalo terapéutico eficaz. Por lo tanto, los intervalos de dosificación pueden ser más largos que la semivida de eliminación del agente.

35 **[0110]** En otras situaciones, cuando las composiciones tienen intervalos terapéuticos relativamente estrechos, puede ser importante calcular las concentraciones máxima y mínima que se producirán a un(os) intervalo(s) de dosificación en particular. La concentración mínima en el estado estacionario de los agentes administrados puede determinarse usando ecuaciones, corregidas opcionalmente según la biodisponibilidad de los agentes, que son bien conocidas por los expertos en la materia farmacológica.

40 **[0111]** Cuando los agentes siguen cinéticas multiexponenciales, y los agentes se administran por vía oral, la estimación de la concentración máxima en estado estacionario implica la manipulación de varias constantes exponenciales relativas a la distribución y la absorción del agente.

45 **[0112]** En este documento también se describen procedimientos para administrar dosis de carga de un agente, o agentes, a un sujeto. Según se usa en este documento, una "dosis de carga" es una o una serie de dosis que cuando se dan en el inicio de un tratamiento, proporcionan rápidamente la concentración objetivo del agente terapéutico. Las dosis de carga pueden administrarse a un sujeto en una necesidad inmediata del nivel objetivo de un agente en relación con el tiempo requerido para alcanzar el nivel objetivo de estado estacionario del agente proporcionado usando una tasa de administración constante. Deberían sopesarse varias consideraciones negativas frente a la exigencia del estado del sujeto y su necesidad de una dosis de carga antes de su administración. Estas consideraciones incluyen, pero no se limitan a: 1) las dosis de carga se administran a menudo en un bolo grande que puede someter bruscamente al paciente a una concentración tóxica del agente; 2) los agentes con semividas largas permanecerán a unos niveles superiores al nivel objetivo en comparación con los agentes administrados con unas pautas de tasas constantes menores. Las dosis de carga son a menudo grandes, rápidas y se administran por vía parenteral, por lo que potencialmente pueden producirse efectos secundarios en el lugar de administración antes de que el agente pueda obtener el equilibrio en el plasma del sujeto.

60 **[0113]** El profesional clínico puede diseñar racionalmente un régimen de dosificación individualizado basado en principios y ecuaciones farmacológicas conocidas. En general, el profesional clínico diseña un régimen de dosificación individualizado basado en el conocimiento de varias propiedades farmacológicas y farmacocinéticas del agente, incluyendo, pero no limitándose a, F (fracción de biodisponibilidad de la dosis), C_p (concentración plasmática), CL (aclaramiento / tasa de aclaramiento), V_{ss} (volumen de disolución del fármaco en el estado estacionario), C_{ss} (concentración en el estado estacionario) y t_{1/2} (semivida del fármaco), así como de la información sobre la tasa de absorción y distribución del agente. Los expertos en la materia pueden acudir a

cualquiera de los diversos textos farmacológicos bien conocidos (por ejemplo, Goodman y Gilman, *Pharmaceutical Basis of Therapeutics*, 10ª ed., Hardman y col., eds., 2001) para una explicación adicional de estas variables y para las ecuaciones completas que ilustran el cálculo de los regímenes de dosificación individualizados. Los expertos en la materia también serán capaces de anticipar potenciales fluctuaciones en estas variables en sujetos individuales. Por ejemplo, la desviación estándar en los valores observados para F , CL y es típicamente de aproximadamente el 20 %, el 50 % y el 30 %, respectivamente. El efecto práctico de ampliar potencialmente parámetros variables en sujetos individuales es que el 95 % del tiempo la C_{ss} conseguida en un sujeto está entre el 35 % y el 270 % de la del nivel objetivo. Para fármacos con bajos índices terapéuticos, este es un intervalo indeseablemente amplio. Los expertos en la materia apreciarán, sin embargo, que una vez que se mide la C_p (concentración plasmática) del agente, es posible estimar los valores de F , CL y V_{ss} directamente. Esto permite que el profesional clínico ajuste fina y eficazmente un régimen de dosificación particular de un sujeto.

[0114] Pueden usarse técnicas de monitorización continua de fármacos terapéuticos para ajustar adicionalmente los procedimientos y regímenes de dosificación de un individuo. Por ejemplo, pueden usarse los datos de la C_{ss} para afinar adicionalmente los CL / F estimados y subsiguientemente ajustar la dosis de mantenimiento del individuo, para conseguir los niveles objetivo deseados del agente usando principios y ecuaciones farmacológicas conocidas. La monitorización terapéutica del fármaco puede realizarse prácticamente en cualquier momento durante la pauta de dosificación. La monitorización puede llevarse a cabo en múltiples puntos temporales durante la dosificación, y especialmente cuando se administran dosis intermitentes. Por ejemplo, la monitorización del fármaco puede realizarse al mismo tiempo, en fracciones de un segundo, segundos, minutos, horas, días, semanas, meses, etc., de la administración del agente, independientemente de la metodología de dosificación empleada (por ejemplo, dosis intermitente, dosis de carga, dosis de mantenimiento, dosis aleatorias o cualquier otro procedimiento de dosificación). Sin embargo, los expertos en la materia apreciarán que cuando la toma de muestras se realiza justo después de la administración del agente, los cambios en los efectos y la dinámica del agente pueden no ser fácilmente observables porque los cambios en la concentración plasmática del agente puede estar retardados (por ejemplo, debido a una baja tasa de distribución o a otros factores farmacodinámicos). Consecuentemente, las muestras del sujeto obtenidas poco después de la administración del agente pueden tener un valor limitado o disminuido.

[0115] El objetivo principal de recoger muestras biológicas del sujeto durante el nivel predicho objetivo de estado estacionario de administración es modificar el régimen de dosificación del individuo basándose el subsiguiente cálculo de las estimaciones revisadas de la proporción CL / F del agente. Sin embargo, los expertos en la materia apreciarán que las concentraciones tempranas del fármaco tras la absorción no reflejan típicamente el aclaramiento del agente. Las concentraciones tempranas del fármaco tras la absorción están dictadas principalmente por la tasa de absorción del agente, el volumen central de distribución del agente, más que el de estado estacionario, el volumen de distribución del agente y la tasa de distribución. Cada una de estas características farmacocinéticas tienen un valor limitado cuando se calcula el mantenimiento terapéutico a largo plazo de regímenes de dosificación.

[0116] Consecuentemente, cuando el objetivo es el mantenimiento terapéutico a largo plazo de regímenes de dosificación, se obtienen muestras biológicas del sujeto, células o tejidos de interés bastante después de que se haya administrado la dosis previa, e incluso más preferiblemente poco antes de que se administra la siguiente dosis planificada.

[0117] Cuando el agente terapéutico es prácticamente completamente eliminado por el sujeto en los intervalos entre las dosis, entonces las muestras biológicas del sujeto pueden recogerse en diversos puntos temporales siguientes a la administración previa, y muy preferiblemente poco después de que se administre la dosis.

[0118] Cuando el bajo aclaramiento del agente es problemático, y es probable que aparezcan problemas de toxicidad debido a su acumulación, las concentraciones del agente pueden medirse inmediatamente antes de la administración de la subsiguiente dosis. En estas situaciones, se prefiere la determinación de las concentraciones máxima y mínima del agente.

[0119] Cuando se administra una dosis de mantenimiento constante, el estado estacionario puede alcanzarse únicamente después de que pasen cuatro semividas del agente. Las muestras recogidas demasiado pronto después del comienzo de la dosis no reflejan de forma precisa el aclaramiento del agente. Sin embargo, para agentes potencialmente muy tóxicos, puede haberse producido ya una toxicidad sin daños significativos antes de que pase la cuarta semivida del agente. Por lo tanto, en algunos casos, cuando es importante mantener un control sobre las concentraciones del agente, se toma una primera muestra después de dos semividas, asumiendo que no se ha administrado una dosis de carga. Si la concentración del agente supera el 90 % de la concentración final esperada media en el estado estacionario, la tasa de dosificación se divide a la mitad y se obtiene otra muestra después de dos semividas adicionales. La dosis se divide de nuevo a la mitad si esta muestra vuelve a superar el nivel objetivo. Si la primera concentración no supera los límites tolerables, las subsiguientes administraciones se realizan a la tasa de dosificación inicial. Si la concentración es menor de la esperada, es probable que el estado estacionario se alcance en aproximadamente dos semividas, y en este punto puede ajustarse la tasa de dosificación según se describe en este documento.

[0120] En las dosis intermitentes, un problema adicional relativo a la cronología de recolección de la información sobre concentración es que si la muestra se obtuvo inmediatamente antes de la siguiente dosis programada, la concentración estará en un valor mínimo, no en la media; sin embargo, según se discute en este documento, puede calcularse la concentración media estimada usando ecuaciones conocidas en la materia farmacológica.

[0121] Cuando se administran agentes terapéuticos con cinéticas de primer orden, las concentraciones media, mínima y máxima en el estado estacionario se alcanzan linealmente con la dosis y la tasa de dosificación. Por lo tanto, en estos casos, se usa la proporción entre las concentraciones medidas y las deseadas del agente para ajustar la dosificación.

[0122] Los programas informáticos son útiles para diseñar los regímenes de dosificación. Típicamente, estos programas tienen en cuenta las concentraciones medidas del fármaco y diversos factores (por ejemplo, medidos o predichos) relacionados con los sujetos individuales.

[0123] Pueden adquirirse muestras biológicas incluyendo, pero no limitándose a, polinucleótidos, polipéptidos, lípidos, carbohidratos, glucolípidos, especies iónicas, metabolitos, moléculas inorgánicas, macromoléculas y precursores macromoleculares, así como fracciones celulares, sangre (por ejemplo, componentes sanguíneos celulares y solubles o insolubles que incluyen, pero no se limitan a, plasma, suero, metabolitos, factores, enzimas, hormonas y moléculas orgánicas o inorgánicas), exudados, secreciones, esputo, excrementos, biopsias celulares y tisulares, fluidos del SNC (líquido cefalorraquídeo), secreciones de glándulas lagrimales, salivares y otras, fluidos seminales, etc., y combinaciones de estos y cualquier otro material biológico subcelular, celular, tisular, organismal, sistémico u organísmico. Las muestras biológicas tomadas a partir de un sujeto pueden analizarse para buscar cambios químicos o bioquímicos (por ejemplo, cambios en la expresión génica) u otros efectos resultantes de la administración del agente terapéutico. Otras consideraciones adicionales sobre muestras biológicas y toma de muestras se describen a continuación.

[0124] Los efectos biológicos y farmacológicos de las composiciones terapéuticas pueden determinarse usando procedimientos rutinarios de laboratorio sobre las muestras recogidas que incluyen, pero no se limitan a, microscopía (por ejemplo, de luz, de fluorescencia (fluorescencia confocal, inmunofluorescencia), de contraste de fases, de interferencia diferencial-contraste, de campo oscuro o electrónica (de transmisión, de barrido, crio), RMN, autorradiografía), técnicas de clasificación celular (por ejemplo, activada por fluorescencia), técnicas cromatográficas (por ejemplo, de filtración en gel, de intercambio iónico, hidrófoba, de afinidad, HPLC), técnicas electroforéticas (por ejemplo, SDS-PAGE, 2D, 3D, isoelectroenfoque), ultracentrifugación, tecnologías inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas (por ejemplo, ELISA, inmunotransferencia Western, inmunotransferencia), tecnologías de ácidos nucleicos, incluyendo recombinantes (por ejemplo, PCR (inversa, reversa, anidada), inmunotransferencia Northern, inmunotransferencia Southern, inmunotransferencia Southwestern, hibridación *in situ*, FISH, translación de mellas, huella genética con ADNasa, cartografiado hipersensible con ADNasa, secuenciación de Maxam-Gilbert, secuenciación de Sanger, análisis por desplazamiento en gel (desplazamiento de movilidad), análisis de la nucleasa S 1, ensayo de protección de la ARNasa, ensayos CAT, técnicas transgénicas, técnicas de inactivación génica y sistemas de genes indicadores), análisis de aminoácidos (por ejemplo, degradación de Edman), observaciones morfológicas, patológicas o genotípicas, y otras observaciones con y sin la ayuda de instrumentación.

[0125] Se les puede preguntar directa o indirectamente a los sujetos por su estado de salud y cualquier cambio atribuible a la administración de las composiciones terapéuticas (por ejemplo, fármacos, moléculas pequeñas y otros agentes y técnicas terapéuticas) y a los procedimientos.

[0126] Varias consideraciones y farmacocinéticas interpaciente e intrapaciente afectan al diseño de los regímenes de dosificación y de administración de los pacientes individuales. Para cualquier fármaco dado, puede haber amplias variaciones en sus propiedades farmacocinéticas en un sujeto en particular, y hasta la mitad o más de la variación total en la respuesta final. La importancia de estos factores variables depende en parte del agente y de su vía habitual de eliminación. Por ejemplo, los agentes que se eliminan principalmente por los riñones y se excretan sin modificar por el sistema urinario, tienden a mostrar menos variabilidad interpaciente en sujetos con una función renal similar que los agentes que son inactivados metabólicamente. Los agentes que son muy metabolizados, y los agentes que tienen un alto aclaramiento metabólico y grandes tasas de eliminación de primer paso muestran grandes diferencias en la biodisponibilidad interpaciente. Los agentes con menores tasas de biotransformación tienen típicamente una mayor variación en las tasas de eliminación entre sujetos individuales. Las diferencias en los genotipos de los sujetos también juegan un importante papel en la determinación de las diferentes tasas metabólicas. Las variaciones patológicas y fisiológicas en las funciones de los órganos de los sujetos individuales (por ejemplo, enfermedades renales o hepáticas) son los principales factores que pueden afectar a la tasa de disposición de un agente. Las enfermedades de riñón o de hígado a menudo afectan a la disposición del fármaco, y por lo tanto incrementan la variabilidad del fármaco interpaciente. Otros factores (por ejemplo, la edad) también pueden afectar a la respuesta de las células y de los tejidos objetivo (por ejemplo, el cerebro) ante una composición o un procedimiento en particular, y pueden alterar el intervalo esperado del nivel terapéutico objetivo para el agente.

[0127] Cuando son necesarias muestras invasivas del paciente (por ejemplo, de sangre, suero, plasma, tejidos, etc.) para determinar la concentración del (los) agente(s) terapéutico(s) en un sujeto, el diseño de los procedimientos de recogida debería emprenderse después de considerar varios criterios que incluyen, pero no se limitan a: 1) si existe una relación entre la concentración del agente y cualquier efecto terapéutico deseado o efecto tóxico evitable; 2) si estos son una variabilidad sustancial interpaciente, pero una pequeña variación intrapaciente en la disposición del agente; 3) si de otro modo es difícil o poco práctico monitorizar los efectos del agente; y 4) si la concentración terapéutica del agente está próxima a la concentración tóxica. Las medidas de concentración pueden complementarse con medidas adicionales de efectos farmacocinéticos, fármacodinámicos o farmacológicos.

[0128] En algunos casos existen considerables variaciones en la respuesta interpaciente tras ajustar la concentración del agente al nivel objetivo. Para algunos agentes, esta variabilidad farmacodinámica supone gran parte de la variación total en la respuesta del sujeto. La relación entre la concentración de un agente y la magnitud de la respuesta observada puede ser compleja, incluso cuando las respuestas se miden en sistemas simplificados *in vitro*, aunque típicamente se observa una curva sigmoidea de concentración-efecto. A menudo existe una relación característica sencilla entre la concentración del agente (por ejemplo, en el plasma del sujeto) y el efecto medido. La curva de concentración-efecto puede ser cóncava hacia arriba o cóncava hacia abajo. Las representaciones de los datos pueden ser lineales, sigmoideas o en forma de U invertida. Además, las curvas de relación concentración-efecto resultantes pueden estar distorsionadas si la respuesta que se mide es una combinación de varios efectos. Las curvas combinadas de concentración-efecto pueden resolverse en curvas de componentes más simples usando cálculos y técnicas disponibles para los expertos en la materia.

[0129] Puede considerarse que las relaciones simplificadas de concentración-efecto, independientemente de su forma exacta, tienen cuatro variables características: potencia, pendiente, eficacia máxima y variación individual. Los expertos en la materia apreciarán que la potencia de un agente se mide por la intersección de la curva de concentración-efecto con el eje de concentración. Aunque la potencia se expresa a menudo como la dosis de un agente necesaria para producir el efecto deseado, se expresa más apropiadamente como la relación entre la concentración del agente en el sujeto (por ejemplo, en plasma) que más se aproxima a la situación deseada en un sistema *in vitro* para evitar complicadas variables farmacocinéticas. Aunque la potencia afecta a la dosificación del agente, el conocimiento de la potencia de un agente por sí mismo es relativamente poco importante en el uso clínico siempre que pueda administrarse convenientemente al sujeto una dosis suficiente para obtener el nivel objetivo. Generalmente se acepta que los agentes más potentes no son necesariamente terapéuticamente superiores a los agentes menos potentes. Una excepción a este principio, sin embargo, está en el campo de los agentes transdérmicos.

[0130] El efecto máximo que un agente puede inducir en un sujeto se denomina eficacia máxima o clínica. La eficacia máxima de un agente se determina típicamente por las propiedades del agente y su sistema receptor-efector, y está reflejada en la meseta de la curva de concentración-efecto. En el uso clínico, sin embargo, la dosis de un agente puede estar limitada por efectos indeseables (por ejemplo, toxicidad), y la verdadera eficacia máxima del agente puede no conseguirse de forma práctica sin perjudicar al sujeto.

[0131] La pendiente y la forma de la curva concentración-efecto refleja el mecanismo de acción del agente, incluyendo la forma de la curva que, al menos en parte, describe la unión al receptor del agente. La elevación de la curva concentración-efecto indica el intervalo de dosificación clínicamente útil del agente. Los expertos en la materia apreciarán que los intervalos de dosificación mencionados en este documento son aproximaciones basadas en sólidos principios farmacológicos, y que las respuestas reales variarán entre los diferentes individuos a una misma concentración dada de un agente, y variarán incluso en los individuos en particular con el tiempo. Se sabe bien que las curvas de concentración-efecto se basan, bien en una respuesta media, o bien se personalizan para reflejar una respuesta real en un individuo en particular en un momento en particular.

[0132] La concentración de un agente que produce un efecto específico en un sujeto en particular se denomina concentración individual eficaz. Las concentraciones individuales eficaces muestran habitualmente una distribución lognormal, dando como resultado una curva de variación normal a partir de la representación de los logaritmos de la concentración frente a la frecuencia con la que se consigue el efecto deseado. Una distribución de frecuencias acumulativas de los individuos que consiguen el efecto deseado en función de la concentración de un agente se denomina curva de concentración porcentual o curva cuántica de concentración-efecto. La forma de esta curva es típicamente sigmoidea. La pendiente de la curva de concentración porcentual es más bien una expresión de la variabilidad farmacodinámica en la población que una expresión del intervalo de concentración entre un umbral y un efecto máximo en el paciente individual.

[0133] Los expertos en la materia apreciarán que la dosis eficaz media (ED₅₀) es la dosis de un agente suficiente para producir el efecto deseado en el 50 % de la población.

[0134] En estudios farmacológicos preclínicos, la dosis (MTD) se determina en animales experimentales. La proporción entre la MTD y la End.50 es una indicación del índice terapéutico del agente, y es una medida de la selectividad del agente para producir sus efectos deseados. En estudios clínicos se compara la dosis, preferiblemente la concentración, de un agente, suficiente para producir efectos tóxicos con la concentración

necesaria para que los efectos terapéuticos en la población proporcionen un índice terapéutico clínico. Sin embargo, debido a las variaciones farmacodinámicas individuales en la población, la concentración o la dosis necesaria de un agente para producir el efecto terapéutico en la mayoría de los sujetos ocasionalmente se superpone con la concentración que produce toxicidad en algunos sujetos, a pesar de que el agente tiene un gran índice terapéutico. Los expertos en la materia apreciarán que pocos agentes terapéuticos producen un único efecto, por lo tanto, dependiendo del efecto que se vaya a medir, el índice terapéutico del agente puede variar.

[0135] En este documento se describen metodologías para individualizar los niveles y regímenes de dosificación. Se diseñan regímenes de tratamiento óptimos para 15 sujetos en particular después de considerar varios factores biológicos y farmacológicos que incluyen, pero no se limitan a, potenciales fuentes de variación en la respuesta del sujeto ante el (los) agente(s) administrado(s), diagnósticos específicos (por ejemplo, gravedad y estadio de la enfermedad, presencia de enfermedades concomitantes, etc.), si se están tomando otros medicamentos de prescripción o sin prescripción, los objetivos de eficacia predefinidos, los límites de toxicidad aceptables, los análisis de coste beneficio del tratamiento frente a ningún tratamiento o el tratamiento con otros diversos agentes disponibles, la probabilidad de cumplimiento por parte del sujeto, los posibles errores de medicación, la tasa y el grado de absorción del agente, el tamaño corporal del sujeto y las composiciones, la distribución del agente, el perfil farmacocinético del agente (por ejemplo, variables fisiológicas, variables patológicas, factores y predisposiciones genéticas, interacciones medicamentosas, potenciales resistencias al fármaco, tasa de aclaramiento predicha), potenciales interacciones fármaco-receptor, estado funcional y efectos placebo.

[0136] El profesional clínico puede elegir un marcador apropiado para medir la eficacia final del (los) agente(s) administrado(s) al sujeto. Los marcadores apropiados de la eficacia de un agente incluyen una disminución (o un aumento) en algún estado biológico medible, condición o nivel químico (por ejemplo, carga de toxinas, título vírico, carga de anticuerpos, temperatura, inflamación, recuentos de células sanguíneas, anticuerpos, morfología del tumor y similares). Hay disponible un gran número de procedimientos y pruebas diagnósticas para recopilar información sobre diversos marcadores que incluyen, pero no se limitan a, ensayos de cultivos celulares (por ejemplo, ensayos de invasión en agar blando y similares), exámenes radiográficos (por ejemplo, rayos X de tórax), escáneres de tomografía informatizada, tomografía computerizada o tomografía axial computerizada (*computerized axial tomography*, CAT), escáneres de tomografía de emisión de positrones (*positron emission tomography*, PET), imágenes de resonancia magnética (*magnetic resonance imaging*, MRI o NMRI), mamografías, ultrasonografías (transvaginal, transcolorrectal), mamografía de centelleo (por ejemplo, tecnecio 99m sestamibi, tecnecio-99m tetrofosmin), aspiración (por ejemplo, endometrial), palpación, pruebas de PAP (por ejemplo, frotis), sigmoidoscopias (por ejemplo, con fibra óptica flexible), pruebas de sangre fecal oculta (por ejemplo, FOBT basado en Guaiac), exámenes rectales digitales, colonoscopias, colonoscopias virtuales (también conocidas como colonografías), enemas baritados, análisis de heces (véase, por ejemplo, K. W. Kinzler y B. Vogelstein, *Cell*, 87 (2): 159-70 (1996); S. M. Dong y col., *J. Natl. Cancer Inst.*, 93 (11): 858-865 (2001); G. Traverso y col., *N. Engl. J. Med.*, 346 (5): 311-20 (2002); G. Traverso y col., *Lancet*, 359 (9304): 403 (2002); y D. A. Ahlquist y col., *Gastroenterology*, 119 (5): 1219-1227, (2000)), cribado del antígeno específico prostático en suero (*prostate-specific antigen*, PSA), endoscopias, escáneres de galio, biopsias de médula ósea y de tejidos (por ejemplo, biopsia con aguja gruesa, biopsia con aguja percutánea, toracotomía, endometrial, etc.) y exámenes histológicos, observaciones clínicas directas y / o indirectas (por ejemplo, encuestas, consultas o cuestionarios a pacientes), toma de muestras citológicas y recogida de tejidos, fluidos y marcadores biológicos en las mismas (por ejemplo, sangre, orina (por ejemplo, cribado de hematuria, exámenes citológicos urinarios), esputo (por ejemplo, citología de esputo), heces, fluidos del SNC (por ejemplo, LPs, punciones lumbares), productos sanguíneos, incluyendo proteínas y péptidos (por ejemplo, proteínas de la familia Bcl-2), marcadores tumorales (por ejemplo, CA 15-3 (cáncer de mama), CEA, cánceres de mama y de páncreas), producto del gen p53, producto del gen MIC2), metabolitos (por ejemplo, ácido vanililmandélico (*vanillylmandelic acid*, VMA) y ácido homovanílico (*homovanillic acid*, HVA)), antígenos (por ejemplo, alfafetoproteína sérica (*serum alpha-fetoprotein*, AFP)), sales, minerales, vitaminas, factores solubles, factores insolubles, ácidos nucleicos y similares).

[0137] La toxicidad y la eficacia terapéutica de los agentes puede determinarse usando procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar la MTD y la DE₅₀. Se prefieren los agentes que muestran grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivos celulares o de modelos animales pueden usarse para formular intervalos de dosificación, por ejemplo, en mamíferos (por ejemplo, seres humanos, *Equus caballus*, *Felis catus* y *Canis familiaris*, etc.). Las concentraciones de dosificación preferibles están próximas al valor calculado u observado de la DE₅₀ para un agente. Las concentraciones de dosificación más preferibles están próximas al valor de la DE₅₀ de un agente y provocan poca o ninguna toxicidad. Cualquier dosificación dada puede variar dentro de, exceder o ser inferior a, el índice terapéutico de cualquier agente en particular, dependiendo de la formulación, la sensibilidad del paciente y la vía de administración.

DATOS EXPERIMENTALES

Procedimientos

[0138] **Creación y análisis de tumor.** Se crearon tumores de cáncer de mama humanos en ratones hembras

de 8 semanas de edad NOD-SCID según se refirió previamente¹,

[0139] Cultivo celular. Se colocaron en placas células de cáncer de mama primario de paso 1 o de paso 2 por triplicado en discos de 12 pocillos recubiertos con colágeno en medio HAM-F12 complementado con suero bovino fetal (1 %), insulina (5 µg / ml), hidrocortisona (1 µg / ml), EGF (10 µg / ml), toxina colérica (0,1 µg / ml), transferrina y selenio (GIBCO BRL, diluciones recomendadas), pen / strep y fungizona (GibcoBRL). El medio de cultivo se reemplazó una vez cada dos días.

[0140] Citometría de flujo. Para preparar las células para los análisis citométricos de flujo, se elaboraron suspensiones de células individuales de tumores de cáncer de mama humano pasados una vez o dos en ratones¹ troceando los tumores y digiriéndolos con 200 u / ml de colagenasa 3 (Worthington) en medio NI199 (Gibco / BRL, Rockville, MD) durante 2-4 horas a 37 °C con agitación constante. Los anticuerpos incluían anti-CD44, anti-CD24, anti-ESA-FITC (Biomedica, CA), anti-H2K y anti-Notch4 humano de cabra (Santa Cruz Products, Santa Cruz, CA). Salvo que se mencione, los anticuerpos se adquirieron en Pharmingen (San Diego, CA). Los anticuerpos se conjugaron directamente con varios fluorocromos dependiendo del experimento. En todos los experimentos, las células de ratón se eliminaron descartando las células H2K⁺ (MHC de clase I) durante la citometría de flujo. Las células muertas se eliminaron usando el pigmento de viabilidad 7-AAD. La citometría de flujo se realizó con un FACSVantage (Becton Dickinson, San José, CA).

[0141] Ensayo de Notch indicador. El constructo indicador HES-1-luciferasa se creó usando el elemento de respuesta de Notch HES-1³⁸. Se amplificó el fragmento del gen murino de HES-1 entre -194 y + 160 mediante PCR y se subclonó en un vector básico pGL2 (Promega) entre los sitios KpnI y Bgl II. Las células MCF-7 se cotransfectaron con el constructo HES-1-luc y pSV2Neo y se seleccionaron en medio que contenía geneticina. Las células MCF-7 transfectadas se cocultivaron en placas de 12 pocillos en presencia y ausencia del anticuerpo policlonal Notch4 (Santa Cruz; concentración final de 20 µg / ml), Delta-Fc soluble (13) o el péptido bloqueante del anticuerpo Notch4 (concentración final de 4 mg / 100 ml, Santa Cruz Products). Los ensayos de luciferasa se realizaron según se describió³⁸. Las proteínas de control Delta-Fc o Fc se concentraron a partir del sobrenadante de 293 células que habían sido modificadas genéticamente para secretarlas¹¹, las proteínas de control Delta-Fc o Fc se añadieron a los cultivos celulares de cáncer de mama junto con un anticuerpo de reticulación anti-Fc (Jackson Immunoresearch)¹¹.

[0142] Ensayos de apoptosis. Se clasificaron 10.000-20.000 células oncogénicas T1 (ESA⁺ CD44⁺ CD24^{-/low} Linaje) o células tumorales de Linaje de T5, T7 y T8 mediante citometría de flujo y se hicieron crecer en placas de cultivo tisular recubiertas con colágeno. Entonces se añadió el anticuerpo policlonal anti-Notch4 (Santa Cruz, CA) al medio (concentración final de 20 mg / ml) mientras se añadía PBS a las placas de control. Para bloquear el anticuerpo anti-Notch4, el anticuerpo anti-Notch4 se preincubó con el péptido bloqueante (Santa Cruz, CA) en hielo durante 30 minutos, tras lo cual se añadió al medio. Después de 48 horas, las células se tripsinizaron y se recogieron. Se suspendieron 10⁵ células en HBSS al 2 % de suero bovino inactivado por calor, y después se ensayaron para comprobar la apoptosis usando FAM-DEVD-FMK, un sustrato peptídico marcado con carboxifluoresceína específico de las caspasas 3 y 7 (CaspasTagTM Caspase Activity Kit, Intergen Company, NY) para detectar las caspasas activas en las células vivas. Las células positivas en caspasa se distinguieron de las negativas usando un citómetro de flujo FACSVantage (Becton Dickinson, CA). Se realizó una tinción PI por ciclo celular y apoptosis según se describió³⁹.

Adenovirus recombinante

[0143] El vector adenovírico delecionado en E3 designado como Ad-GFP-dnMAML1 se construyó como sigue: se generó la región codificante de los aminoácidos 1-302 del MAML1 humano a partir de células de mama normales mediante PCR con un cebador directo con un sitio EcoRI y un codón de inicio ATG, y el cebador inverso con un sitio HpaI. El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector MSCVneoEB secuencia arriba del gen IRES-GFP. Entonces el dnMAML1-IRES-GFP se clonó en el vector lanzadera de adenovirus pACCMV2 en los sitios EcoRI y BamHI. Entonces se generó el adenovirus recombinante en el núcleo vírico de la Universidad de Michigan. Las células se cultivaron en placas de 12 pocillos y se llevaron a cabo episodios de infección por triplicado. Las infecciones víricas se llevaron a cabo añadiendo partículas víricas a varias concentraciones al medio de cultivo sin FBS. Inicialmente se determinó la concentración vírica óptima para cada línea celular o célula primaria usando AD-GFP para conseguir un equilibrio óptimo de alta expresión génica y bajo título vírico, para minimizar la citotoxicidad. Después de 4 horas de incubación, el medio de infección se complementó con la cantidad apropiada de FBS para cada tipo celular. Se calculó la eficacia de transmutación (24 horas después de la infección) dividiendo el número de células positivas en GFP por el número total de células de tres campos microscópicos individuales con un aumento de 40X, o mediante Cellquest cuando se usó FACS para examinar la GFP.

Análisis mediante PCR

[0144] El análisis de la expresión génica de las Fringes, Notches y sus ligandos se realizó mediante una RT-PCR cuantitativa. Los cebadores para las reacciones de PCR para los genes examinados se adquirieron en Applied Biosystems. Se aislaron 2.000 células oncogénicas y no oncogénicas mediante citometría de flujo por triplicado para cada población y cada gen ensayado, usando los marcadores descritos anteriormente. El aislamiento del ARN se

realizó usando Trizol siguiendo el protocolo de GIBCO BRL. La generación del ADNc se realizó usando un cebador de anclaje OligodT, y las reacciones de PCR se prepararon usando el sistema Taqman Assay-on-demand (Applied Biosystems). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM® 7900HT (AB), que es un sistema de PCR en tiempo real de alto rendimiento que detecta y cuantifica secuencias de ácidos nucleicos. El análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR mostró un único producto de la PCR (datos no mostrados). El análisis estadístico de la expresión génica diferencial se realizó usando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ⁴⁰.

Análisis Western:

[0145] Se ensayaron cantidades iguales de los lisados celulares de las células MCF-7 transfectadas con pcDNA3(MCF-7-V), de las células MCF-7 transfectadas con un FADD dominante negativo (MCF-7 / dnFADD)²⁷, y 2 clones de las células MCF-7 transfectadas con Bel-X_L (MCF-7 / BCL-X_L, clones 1 y 2)²⁸ para comprobar la expresión de las proteínas esperadas. Se transfectaron transitoriamente 293 células T con pcDNA3-FLAG-BCL-X_L. La expresión de la proteína FLAG-BCL-X_L se había verificado usando el anticuerpo anti-FLAG. Para detectar la proteína dnFADD marcada con AUI se usó Ab anti-AUI monoclonal de ratón (1 / 1.000) (Covance, Berkeley-CA). Los niveles de BCL-X_L se detectaron usando el anticuerpo policlonal de conejo anti-BCL-X s / l (S-18) (dilución a 1 / 500) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz-CA).

[0146] Para los Tumores Primarios 1 Tumor 4 (designados como T1 y T4), se clasificaron muestras de 2.000 células de la población oncogénica ESA⁺ CD44⁺ CD24^{low} Linaje⁻ (designada como T), o 2.000 células de la población no oncogénica (designada como NT) de cada uno de los tumores según se describió previamente¹. Para los tumores Primarios 2, 3 y 5 (designados como T2, T3 y T5), se clasificaron 2.000 células H2K⁺ de cada tumor según se describió previamente. Esto representa una población mixta de células tumorales oncogénicas y no oncogénicas. Cada gen se analizó usando 3 muestras de células clasificadas independientemente. (+) indica que se detectó la expresión de un gen. (-) indica que no se detectó expresión génica. (ND) indica que no se realizó el ensayo. Se indica el análisis de cada uno de 4 receptores Notch, así como los ligandos Notch de las familias Delta y Jagged. También se analizaron las Fringes (Lunatic, Manic y Radical).

Regulación de la proliferación de células madre tumorales a través de la regulación de la vía de señalización Notch

[0147] Esta sección describe compuestos y procedimientos para regular la proliferación celular marcando como objetivo la vía de señalización Notch sin marcar directamente Notch 4.

[0148] *Inhibidor de la γ -secretasa.* Se ensayó la viabilidad celular colocando en placas por triplicado 20.000 células MCF-7 de las que se ha demostrado que expresan Notch en placas de 6 pocillos. 48 horas después se añadieron a las células 1,19 μ g / ml de inhibidor de la γ -secretasa. Se contaron las células totales y las negativas con trypan blue (viables) 12, 24 y 48 horas después, y se determinó el % de células viables en comparación con los pocillos de control.

[0149] Los experimentos realizados durante el desarrollo de la presente invención estaban diseñados para comprobar el efecto del bloqueo de la señalización Notch sobre la supervivencia y la proliferación de células MCF-7. Las células se cocultivaron con un inhibidor de γ -secretasa, que inhibe la escisión final del receptor Notch, evitando la liberación del dominio Notch intracelular (IC), bloqueando esencialmente la señalización Notch (Karlstrom y col., J. Biol. Chem., 277: 6763 (2002)). Entonces se ensayó la viabilidad celular tras la exposición al inhibidor. Se determinó el porcentaje de células viables 2, 24 y 48 horas tras la exposición. Hubo una disminución significativa en la viabilidad después de 24 horas, y la mayoría de las células estaban muertas después de 48 horas. Para determinar la especificidad del inhibidor de la γ -secretasa sobre la vía de señalización Notch, se usaron células MCF-7 transfectadas de forma estable con el gen indicador de luciferasa bajo el control del promotor HES-1. La transactivación o la supresión del promotor HES-1, un elemento secuencia abajo de la señalización Notch, pudo entonces monitorizarse con un ensayo estándar de luciferasa. Las células se cocultivaron con el inhibidor de la γ -secretasa y se monitorizaron los cambios en la actividad de la luciferasa. El inhibidor disminuyó claramente la actividad de la luciferasa 12 horas después de la exposición, mientras que la viabilidad celular aún era alta, lo que indicaba que suprimía específicamente la expresión del receptor Notch.

[0150] Para determinar el mecanismo mediante el cual la inhibición de la señalización Notch inducía la muerte celular en las células MCF-7, se determinó la activación de la caspasa en las células tras la exposición al inhibidor de la γ -secretasa. Veinticuatro horas después de la exposición se ensayó la acumulación del ADN degradado en las células, lo que es una característica de la apoptosis. En comparación con los cultivos de células MCF-7 de control, hubo un aumento sustancial en el número de células con la caspasa 3 / 7 activada en aquellas expuestas al inhibidor de la γ -secretasa. Estos datos muestran que en la línea celular MCF-7, una vía de señalización Notch bloqueada induce la apoptosis a través de la activación de la caspasa 3 / 7.

[0151] Se realizaron experimentos para comprobar el efecto de la inhibición de la señalización Notch sobre la

capacidad de las células de cáncer de mama procedentes de cinco pacientes diferentes con tumores de mama para proliferar *in vitro*. Se cultivaron las células de los pacientes. Se examinó el papel de la señalización Notch exponiendo estos 5 cultivos celulares diferentes al inhibidor de la γ -secretasa. Las células se colocaron en un medio de cultivo celular previamente establecido sobre placas recubiertas con colágeno y se dejaron crecer. Entonces se añadió el inhibidor a los cultivos y se realizó un ensayo de viabilidad 48 horas después. El inhibidor de la γ -secretasa tuvo un efecto drástico sobre la viabilidad de estas células, según se muestra en la Figura 7. Estos datos demuestran que la activación de Notch promovía la supervivencia o la proliferación de las células de cáncer de mama en todos estos 5 tumores *de novo*.

La inhibición de la señalización Notch *in vivo* inhibe la formación de tumores por parte de las células tumorales oncogénicas

[0152] Se realizaron experimentos adicionales para determinar si el bloqueo de la señalización Notch inhibía la formación de tumores por parte de células de cáncer de mama *in vivo*. Previamente se había averiguado que sólo una minoría de las células tumorales de un tumor de cáncer de mama, denominadas células tumorales oncogénicas, forman tumores en un modelo de xenoinjerto de ratón, mientras que la mayoría de las células tumorales carecen de esta capacidad (Al-Hajj y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 100: 3983 (2003)). Tan pocas como 1.000 células tumorales oncogénicas del tumor de mama del paciente 1 (TP1) y 10.000 células tumorales oncogénicas del tumor de mama del paciente 4 (TP4) son capaces de formar nuevos tumores en ratones NOD / SCID (Al-Hajj y col., *supra*). Por lo tanto, se incuban las células tumorales oncogénicas TP1 y TP4, bien con un adenovirus de control o bien con el adenovirus dnMAML1, durante 3 horas. Se inyectaron ratones NOD / SCID con 10.000 ó 1.000 células tumorales oncogénicas TP1 de cada grupo. Aunque en el momento de la inyección a los ratones la gran mayoría de las células tumorales infectadas con el adenovirus de control o con dnMAML1 todavía eran viables, 0 de las 10 inyecciones de las células infectadas con el adenovirus dnMAML1 células infectadas TP1 formaron tumores, mientras que todas las inyecciones de células infectadas con el adenovirus de control lo hicieron. De forma similar, todas las 5 inyecciones de 10.000 células TP4 infectadas con el adenovirus de control formaron tumores, mientras que ninguna de las inyecciones de 10.000 células infectadas con el adenovirus dnMAML-1 lo hicieron. Estos datos demuestran que la señalización Notch es importante para la supervivencia de las células tumorales y para la formación de nuevos tumores *in vivo*, y el bloqueo de esta vía da lugar a la pérdida de la capacidad de estas células para formar tumores.

[0153]

REFERENCIAS

1. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernández, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 100, 3983 – 8 (2003).
2. Austin, J. & Kimble, J. *glp-1* is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. Cell 51, 589 – 99 (1987).
3. Berry, L., Westlund, B. & Schedl, T. Germ-line tumor formation caused by activation of *glp-1*, a *Caenorhabditis elegans* member of the Notch family of receptors. Development 124, 925 – 936 (1997).
4. Gallahan, D., Kozak, C. & Callahan, R. A new common integration region (*int-3*) for mouse mammary tumor virus on mouse chromosome 17. J Virol 61, 218 – 20 (1987).
5. Gallahan, D. & Callahan, R. The mouse mammary tumor associated gene *INT3* is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). Oncogene 14, 1883 – 1890 (1997).
6. Lippman, M. E. High-dose chemotherapy plus autologous bone marrow transplantation for metastatic breast cancer. N Engl J Med 342, 1119 – 20 (2000).
7. Lapidot, T. y col. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature 17, 645 – 648 (1994).
8. Park, I. K. y col. *Bmi-1* is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. Nature 423, 302 – 5 (2003).
9. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 414, 105 – 11 (2001).
10. Reya, T. y col. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature 423, 409 – 14 (2003).
11. Morrison, S. y col. Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. Cell 101, 499 – 510 (2000).
12. Varnum-Finney, B. y coll. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch 1 signaling. Nat Med 6, 1278 – 81 (2000).
13. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. & Lake, R. J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science 284, 770 – 776 (1999).
14. Allman, D., Aster, J. C. & Pear, W. S. Notch signaling in hematopoiesis and early lymphocyte development. Immunol Rev 187, 75 – 86 (2002).
15. Henrique, D. y col. Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. Curr Biol 7, 661 – 70 (1997).
16. Christensen, S., Kodoyianni, V., Bosenberg, M., Friedman, L. & Kimble, J. *tag-1*, a gene required for *lin-12* and *glp-1* signaling in *Caenorhabditis elegans*, is homologous to human CBF1 and *Drosophila* Su(H). Development 122, 1373 – 83 (1996).

17. Weizen, S. y col. Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nature Medicine* 8, 979 – 986 (2002).
18. Callahan, R. & Raafat, A. Notch signaling in mammary gland tumorigenesis. *J Mammary. Gland. Biol. Neoplasia*. 6, 23 – 36 (2001).
- 5 19. Brennan, K. & Brown, A. M. Is there a role for Notch signalling in human breast cancer? *Breast Cancer Res* 5, 69 – 75 (2003).
20. Imatani, A. & Callahan, R. Identification of a novel NOTCH-4 / INT-3 RNA species encoding an activated gene product in certain human tumor cell lines. *Oncogene* 19, 223 – 231 (2000).
21. Nam, Y., Weng, A. P., Aster, J. C. & Blacklow, S. C. Structural requirements for assembly of the CSL. intracellular Notch1. Mastermind-like 1 transcriptional activation complex. *J Biol Chem* 278, 21232 – 9 (2003).
- 10 22. Petcherski, A. G. & Kimble, J. Mastermind is a putative activator for Notch. *Curr Biol* 10, R471 – 3 (2000).
23. Wu, L., Sun, T., Kobayashi, K., Gao, P. & Griffin, J. D. Identification of a family of mastermind-like transcriptional coactivators for mammalian notch receptors. *Mol Cell Biol* 22, 7688 – 700 (2002).
24. Jeffries, S., Robbins, D. J. & Capobianco, A. J. Characterization of a high-molecular-weight Notch complex in the nucleus of Notch(ic)-transformed RKE cells and in a human T-cell leukemia cell line. *Mol Cell Biol* 22, 3927 – 41 (2002).
- 15 25. Jehn, B. M., Bielke, W., Pear, W. S. & Osborne, B. A. Cutting edge: protective effects of notch-1 on TCR-induced apoptosis. *J Immunol*. 162, 635 – 638 (1999).
26. Deftos, M. L., He, Y. W., Ojala, E. W. & Bevan, M. J. Correlating notch signaling with thymocyte maturation. *Immunity*, 9, 777 – 786 (1998).
- 20 27. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505 – 12 (1995).
28. Jaattela, M., Benedict, M., Tewari, M., Shayman, J. A. & Dixit, V. M. Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells. *Oncogene* 10, 2297 – 305 (1995).
- 25 29. Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H. & Cohen, S. Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* 406, 411 – 415 (2000).
30. Jones, P. y col. Stromal expression of Jagged 1 promotes colony formation by fetal hematopoietic progenitor cells. *Blood* 92, 1505 – 11 (1998).
31. Shimizu, K. y col. Manic fringe and lunatic fringe modify different sites of the Notch2 extracellular region, resulting in different signaling modulation. *J Biol. Chem.* 276, 25753 – 25758 (2001).
- 30 32. Hicks, C. y col. Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nat. Cell Biol.* 2, 515 – 520 (2000).
33. May, W. A. y col. EWS / FLI1-induced manic fringe renders NIH 3T3 cells tumorigenic. *Nat Genet* 17, 495 – 7 (1997).
- 35 34. Akashi, K. y col. Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis. *Blood* 101, 383 – 9 (2003).
35. Lessard, J. & Sauvageau, G. Bmi-1 Determines the Proliferative Activity of Normal and Leukemic Stem Cells. *Nature* (2003).
36. Dick, J. E. Breast cancer stem cells revealed. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 100, 3547 – 9 (2003).
- 40 37. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57 – 70 (2000).
38. Korinek, V. y col. Two members of the Tcf family implicated in Wnt / beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol* 18, 1248 – 56 (1998).
39. Clarke, M. F. y col. A recombinant bcl-x s adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 92, 11024 – 11028 (1995).
- 45 40. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402 – 8 (2001).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un inhibidor de la señalización Notch para su uso en un procedimiento para inhibir las células oncogénicas para tratar el cáncer de páncreas o el cáncer de mama en un sujeto, en el que el inhibidor es un anticuerpo anti-Notch que inhibe la proliferación de células oncogénicas, y en el que el procedimiento comprende coadministrar el inhibidor y un agente antitumoral al sujeto, en el que el agente antitumoral es un agente quimioterapéutico.
- 10 2. Un inhibidor para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o humano.
3. Un inhibidor para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el cáncer es cáncer de mama.
4. Un inhibidor para su uso según la reivindicación 3, en el que el agente antitumoral es un antimetabolito.
- 15 5. Un inhibidor para su uso según la reivindicación 4, en el que el antimetabolito es un antagonista de la pirimidina.
6. Un inhibidor para su uso según la reivindicación 5, en el que el antagonista de la pirimidina es gemcitabina.
- 20 7. Un inhibidor para su uso según la reivindicación 3, en el que el agente antitumoral es un alcaloide.
8. Un inhibidor para su uso según la reivindicación 7, en el que el alcaloide es un estabilizador de los microtúbulos.
9. Un inhibidor para su uso según la reivindicación 8, en el que el estabilizador de los microtúbulos es paclitaxel.
- 25 10. Uso de un inhibidor de la señalización Notch, en el que el inhibidor es un anticuerpo anti-Notch que inhibe la proliferación de células oncogénicas, para la elaboración de un medicamento para inhibir células oncogénicas para tratar el cáncer de páncreas o el cáncer de mama en un sujeto, en el que el tratamiento comprende coadministrar el inhibidor y un agente antitumoral al sujeto, en el que el agente antitumoral es un agente quimioterapéutico.
- 30 11. Uso de
- (i) un inhibidor de la señalización Notch, en el que el inhibidor es un anticuerpo anti-Notch que inhibe la proliferación de células oncogénicas,
- 35 y
- (ii) un agente antitumoral, en el que el agente antitumoral es un agente quimioterapéutico,
- 40 para la elaboración de un medicamento para inhibir las células oncogénicas para tratar el cáncer de páncreas o el cáncer de mama en un sujeto, en el que el tratamiento comprende coadministrar el inhibidor y el agente antitumoral al sujeto.
12. Uso según la reivindicación 10 u 11 en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o humano.
- 45 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, , en el que el cáncer es cáncer de mama.
14. Uso según la reivindicación 13, en el que el agente antitumoral es un antimetabolito.
- 50 15. Uso según la reivindicación 14, en el que el antimetabolito es un antagonista de la pirimidina.
16. Uso según la reivindicación 15, en el que el antagonista de la pirimidina es gemcitabina.
17. Uso según la reivindicación 13, en el que el agente antitumoral es un alcaloide.
- 55 18. Uso según la reivindicación 17, en el que el alcaloide es un estabilizador de los microtúbulos.
19. Uso según la reivindicación 18, en el que el estabilizador de los microtúbulos es paclitaxel.

FIGURA 1

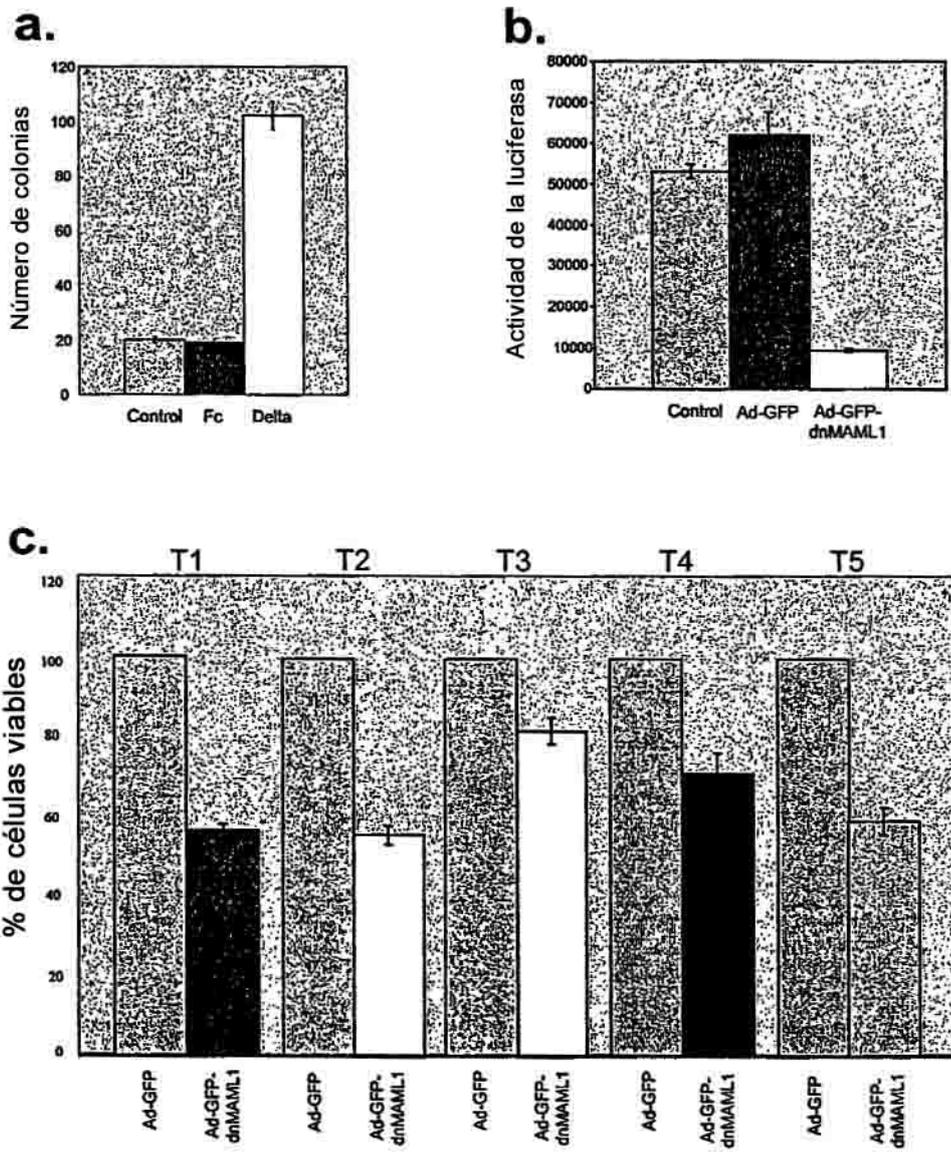


FIGURA 2

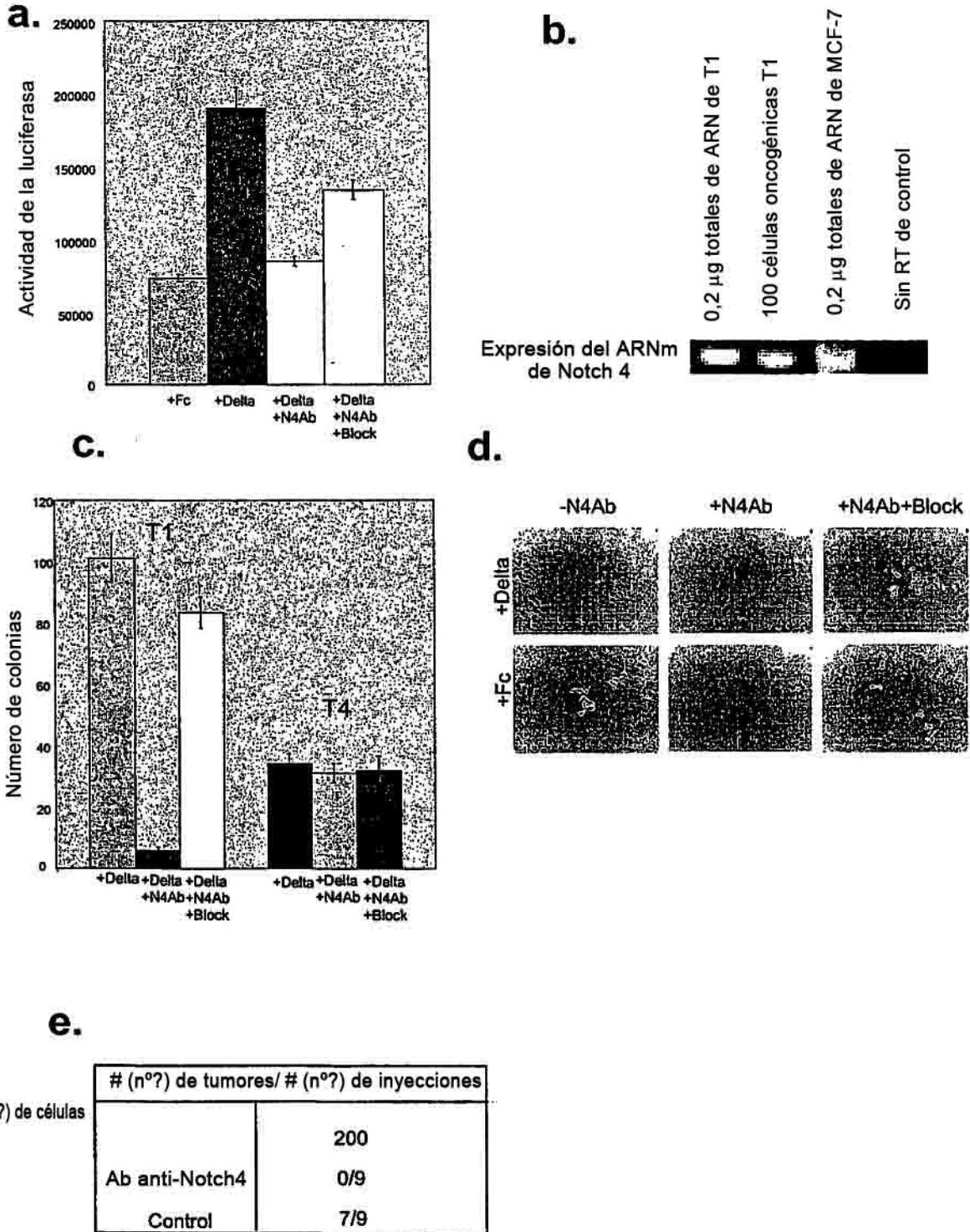


FIGURA 3

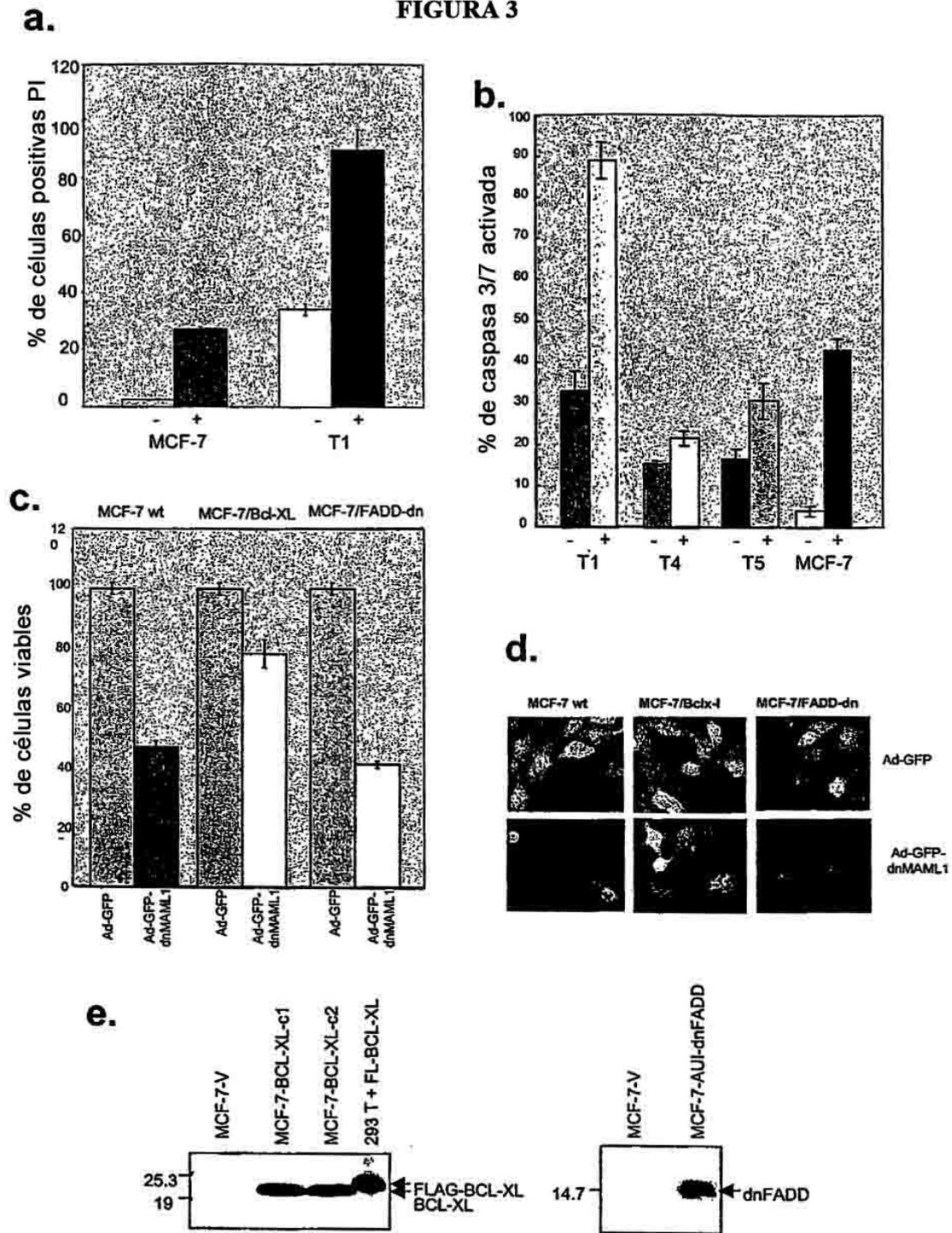


FIGURA 4

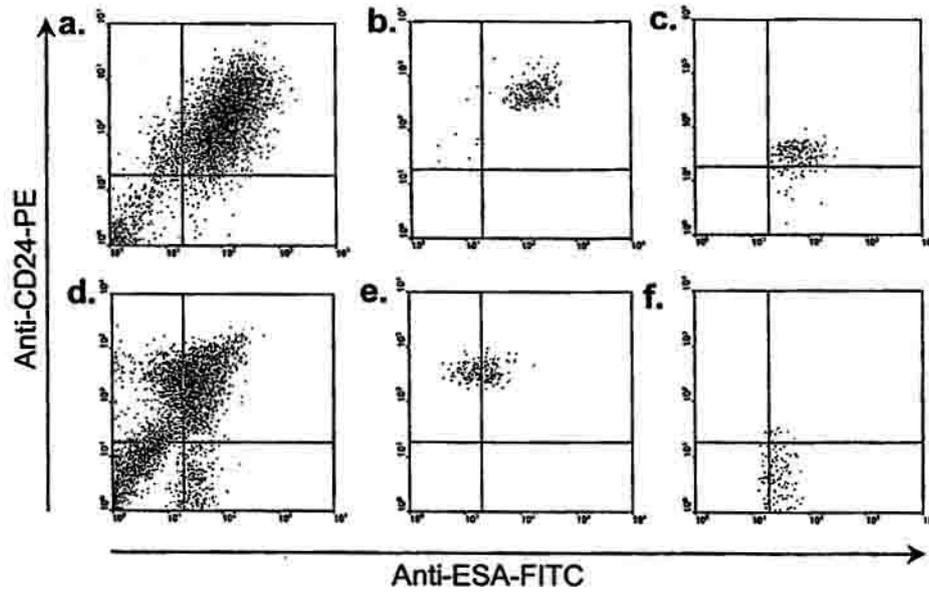


FIGURA 5

Adenovirus de tipo 5 parcialmente sustituido en E3

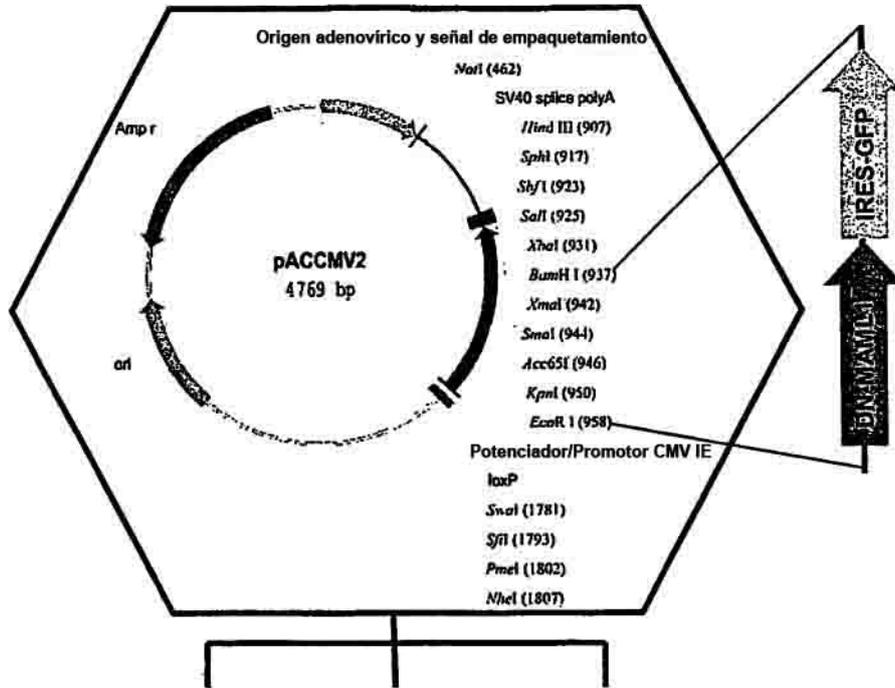


FIGURA 6

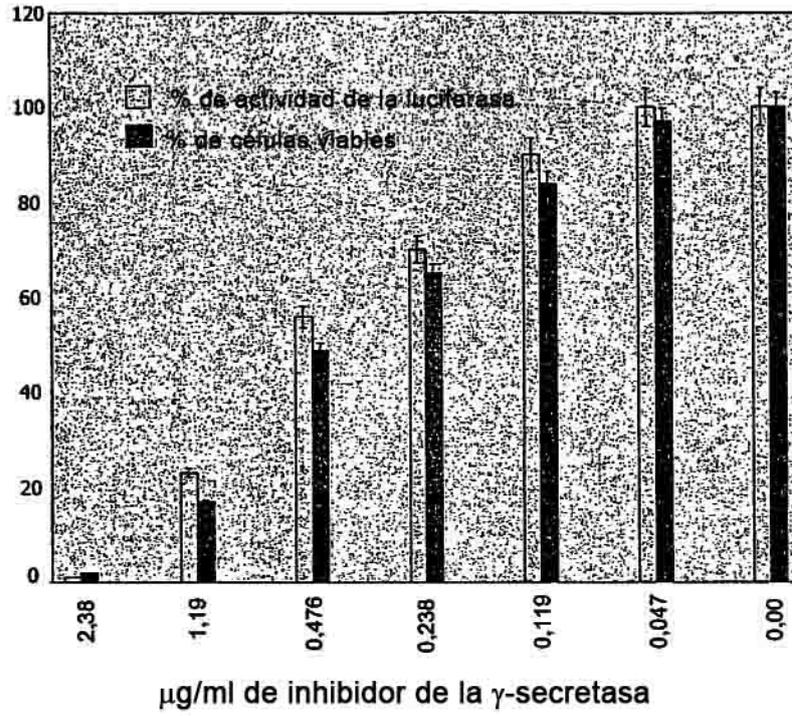


FIGURA 7

