

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 041**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2005 E 05789195 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 1786466**

54 Título: **Combinación de un agente quimioterapéutico y un antagonista de un producto génico para tratar tumores**

30 Prioridad:

18.06.2004 US 580745 P

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

12.11.2013

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

POLAKIS, PAUL

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 429 041 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

Combinación de un agente quimioterapéutico y un antagonista de un producto génico para tratar tumores

5 **Antecedentes de la Invención**Campo de la Invención

10 **[0001]** La presente invención se refiere al tratamiento de un tumor. En particular, la invención se refiere a un procedimiento mejorado para el tratamiento de un tumor, incluyendo cáncer, que combina la administración de CPT-II y un antagonista de un producto génico, cuya expresión se regula por aumento por CPT-II como se define en las reivindicaciones. La invención se refiere adicionalmente a procedimientos y medios para el diagnóstico y clasificación de tumores, y para el pronóstico del resultado del tratamiento del tumor, y la respuesta del paciente a una modalidad de tratamiento particular.

15 Descripción de la Técnica Relacionada

20 **[0002]** El cáncer colorrectal es una causa principal de mortalidad por cáncer en los países occidentales que representa más de 50.000 muertes al año solo en los Estados Unidos (Greenlee y col. Cancer statistics, 2001, CA Cancer J Clin. 51: 15-36). Aproximadamente el 50% de los pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal se tratan con éxito por resección quirúrgica del tumor principal. Los pacientes restantes ya sea diagnosticados con o, con posterioridad a la cirugía, progresan a una enfermedad avanzada, donde la tasa de supervivencia a 5 años cae estrepitosamente debido a la invasión y metástasis de la lesión primaria (Adjei, A.A. (1999), Br. J. Clin. Pharmacol. 48: 265-277). Estos pacientes son candidatos para terapia sistémica, que se administra después de la cirugía en una configuración adyuvante o como terapia paliativa para aquellos no aptos para cirugía. Durante las últimas cuatro décadas, 5-fluorouracilo (5-FU) ha servido como terapia de primera línea para el tratamiento del cáncer colorrectal. 5-FU se utiliza con frecuencia en combinación con fármacos tales como leucovorina, que potencian la inhibición de la timidilato sintasa por tratamiento con 5-FU (Poon y col. (1991) J. Clin. Oncol. 9, 1967-1972). Sin embargo, la inhibición de la timidilato sintasa sola está alcanzando probablemente un límite con respecto a la eficacia en el cáncer colorrectal (Ragnhammer y col. (2001) Acta Oncol 40, 282-308). Más recientemente, el iminotecan (CPT-11) se mostró beneficioso para los pacientes a los que les funcionaron las terapias basadas en 5-FU y posteriormente se probó en terapia de combinación con 5-FU (Saltz y col. (2000) N. Engl. J. Med. 343, 905-914). Ahora se recomienda 5-FU/leucovorina más CPT-11 como terapia de primera línea en el cáncer colorrectal avanzado.

35 **[0003]** El grupo más común de cánceres entre las mujeres en los Estados Unidos es el cáncer de mama, que es una enfermedad compleja, que incluye varios subtipos distintos, que difieren en su patología y responden de forma diferente al tratamiento convencional. Varios grupos han realizado estudios de la expresión génica para clasificar diversos tipos de cáncer de mama o predecir los resultados clínicos (véase, por ejemplo, Golub y col. (1999) Science, 286: 531-537, Bhattacharjae y col. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 13790-13795; Chen-Hsiang y col. (2001), Bioinformatics 17 (Supl. 1): S316-S322; Ramaswamy y col. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 15149-15154 (2001); Martin y col. (2000) Cancer Res. 60: 2232-2238; West y col., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 11462-11467; Sorlie y col., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 10869-10874; Yan y col., Cancer Res. 61: 8375-8380 (2001); Van De Vijver y col. (2002), New England Journal of Medicine 347: 1999-2009; Ahr y col, (2002) Lancet 359: 131-2; van't Veer y col. (2002) Nature 415: 530-6; Dowsett y Ellis (2003) Am. J. Clin. Oncol. 25: S34-9). Se ha informado que el tratamiento con 5-FU activa transcripcionalmente ciertos genes en líneas celulares de cáncer de mama y líneas celulares del cáncer colorrectal resistentes a 5-FU (Maxwell y col. (2003) Cancer Res. 63: 4602-4606).

50 **Resumen de la Invención**

[0004] La presente invención se basa, al menos en parte, en el reconocimiento de que las diferencias en la expresión génica entre células sanas y cancerosas después de la exposición a los productos quimioterapéuticos de atención estándar pueden aprovecharse para proporcionar nuevas terapias de combinación de cáncer. Por ejemplo, un antígeno de la superficie celular inducido de forma preferible en las células cancerosas tras la administración del fármaco puede servir como una diana para un antagonista, tal como, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico o una molécula pequeña, usado en combinación con este fármaco. Además, el contar con la comprensión de los programas genéticos adoptados por las células cancerosas tratadas con el fármaco puede proporcionar nuevos marcadores para la eficacia y el pronóstico, así como más una comprensión adicional de los mecanismos de acción de los fármacos.

60 **[0005]** En un aspecto, la invención se refiere a sustancias y combinaciones de sustancias para su uso en un procedimiento que comprende administrar a un sujeto diagnosticado con un tumor una cantidad eficaz de CPT-II, y un antagonista de un producto génico codificado por un gen como se define en las reivindicaciones, cuya expresión

se ha determinado que se regula por aumento selectivamente en dicho tumor con respecto a las células normales correspondientes por CPT-II

5 **[0006]** En otro aspecto, la invención se refiere sustancias y combinaciones de sustancias para su uso en un procedimiento para inhibir la proliferación de células tumorales que comprende:

(a) confirmar la presencia de al menos un gen se regula por aumento selectivamente en dichas células tumorales con respecto a las células normales por CPT-II como se define en las reivindicaciones; y

10 (b) tratar dichas células tumorales con CPT-II y un antagonista de al menos uno de los genes regulados por aumento selectivamente.

15 **[0007]** En otro aspecto más, la invención se refiere a una composición terapéutica que comprende una cantidad eficaz de CPT-II y un antagonista de un producto génico codificado por un gen como se define en las reivindicaciones, cuya expresión se regula por aumento en las células tumorales con respecto a las células normales correspondientes por CPT-II.

20 **[0008]** En un aspecto todavía adicional, la invención se refiere a un procedimiento de pronóstico, que comprende: (a) determinar el nivel de expresión de uno o más genes como se define en las reivindicaciones, o sus productos de expresión, antes o y después del tratamiento con CPT-II con respecto a las células normales correspondientes, en un sujeto diagnosticado con un tumor; e

(b) identificar el sujeto como susceptible de responder convenientemente a un tratamiento de combinación con CPT-II y un antagonista de un gen, cuya expresión se ha inducido selectivamente por CPT-II.

25 **[0009]** En todos los aspectos, el tumor es preferiblemente cáncer, tal como, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma o cáncer de cerebro. En general, un agente quimioterapéutico puede ser cualquier molécula usada actualmente o desarrollada en el futuro para el tratamiento de un tumor, por ejemplo, un cáncer. Los
30 agentes quimioterapéuticos incluyen agentes de alquilación; sulfonatos de alquilo; aziridinas; etileniminas; metilamelaminas; mostazas de nitrógeno; nitrosureas; anti-metabolitos; análogos de ácido fólico; análogos de purina; análogos de pirimidina, andrógenos; anti-adrenales; reforzadores de ácido fólico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pento-estatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-
35 etilhidrazida; procarbazona; PSK™; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C;
40 mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; camptotecina-11 (CPT-11); inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; agentes anti-hormonales; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos.

45 **[0010]** En todos los aspectos de la invención reivindicada, el agente quimioterapéutico es CPT-11.

[0011] En todos los aspectos, los antagonistas incluyen, por ejemplo, anticuerpos, péptidos, moléculas orgánicas pequeñas no peptídicas, moléculas antisentido y señuelos oligonucleotídicos, siendo preferidos los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) y las moléculas orgánicas pequeñas no peptídicas. El anticuerpo puede humanizarse (incluyendo anticuerpos quiméricos), o ser humano, por ejemplo. El antagonista puede unirse a, o de
50 otro modo interactuar con el producto génico.

Breve Descripción de los Dibujos

55 **[0012]**

Tabla I. Transcritos inducidos en xenoinjertos tumorales Colo205 expuestos a CPT-11. Cada uno de tres ratones con tumores se trataron con CPT-11 o control de solución salina y se realizó un análisis de micromatrices de oligonucleótidos en las 6 preparaciones de ARN. Se calculó el cambio para los transcritos en cada muestra tratada con CPT-11 con respecto a cada control y el cambio (Cambio Med.) para las nueve comparaciones posibles se
60 presenta junto con el porcentaje (% de ACEPTACIÓN) de comparaciones que producen un cambio positivo.

Tabla II. Transcritos inducidos en el intestino de ratones expuestos a CPT-11. Cada uno de tres ratones con tumores

se trataron con CPT-11 o control de solución salina y se realizó un análisis de micromatrices de oligonucleótidos en las 6 preparaciones de ARN. Se calculó el cambio para los transcritos en cada muestra de CPT-11 con respecto a cada control y el cambio medio (Cambio Med.) para las nueve comparaciones posibles se presenta junto con el porcentaje (% de ACEPTACIÓN) de comparaciones que producen un cambio positivo.

5
10
15
20
25

Figura 1. Transcritos de ARNm que codifican las proteínas de la superficie celular inducidas por CPT-11 (Tabla I). A. Análisis PCR en tiempo real de ARN del tumores de xenoinjerto desarrollados en ratones administrados con CPT-11 o solución salina. Se midió la cantidad relativa de los seis transcritos en tres tumores de cada grupo y se representó como el cambio con respecto a S1, establecido arbitrariamente en uno. Los umbrales de ciclo (Ct) se normalizaron para GAPDH (barras blancas) y Actina (barras negras). B. Transcurso del tiempo de la inducción de ARNm LY6D/E48 tras la adición de CPT-11 10 mM durante 48 horas. El cambio es relativo al control del vehículo. El transcrito no se detectó (ND) en las células celulares PC3 y 293.

Figura 2. Análisis por PCR en tiempo real de transcritos de ARNm identificados por un análisis de micromatrices. Los niveles de expresión relativa de algunos de los genes inducidos por CPT-11 (Tabla I) se compararon en un análisis paralelo usando ARN extraído de los tumores Colo205 y DLD-1. Los valores de umbral de ciclo se normalizaron para tanto GAPDH (barras blancas) como Actina (barras negras) y el aumento de veces es relativo a S1, que se ajustó a un valor de uno.

Figura 3. Expresión de transcritos intestinales de ratón homólogos a los inducidos en xenoinjertos tumorales humanos. Las intensidades de señal se presentan a través de desviaciones típicas obtenidas mediante un análisis de matriz de oligonucleótidos del ARN extraído de tres xenoinjertos tumorales humanos independientes de ratones tratados con CPT-11 (barras negras) o control de solución salina (barras blancas). Los transcritos indicados son los que experimentan la inducción más alta y más coherente en la matriz humana (panel superior) determinada por un algoritmo de cambio (Tabla I) y que también se representan por un homólogo en la matriz de ratón (inferior).

Figura 4. Inducción de la expresión génica E48/Ly-6D en células Colo205 por CPT-11 *in vitro*. Se incubaron células Colo205 cultivadas con las concentraciones indicadas de CPT-11 durante 2 días y después se sometieron a tinción inmunofluorescente (A) o clasificación de células activadas por fluorescencia (B) usando anticuerpos monoclonales específicos de E48/Ly-6D. La tinción inmunofluorescente para E48/Ly-6D se realizó con el anticuerpo 15A5 (verde) y las células contrateñidas con DAPI (azul) para localizar los núcleos. La clasificación de células activadas por fluorescencia se realizó con dos anticuerpos monoclonales independientes para E48/Ly-6D (15A5 y 17H7), un anticuerpo de control reactivo a un epítipo no presente en E48 (GD) y con sólo un anticuerpo secundario (2°).

Figura 5. Efecto de CPT-11 y anti-LY6D/E48-vc-MMAE en el crecimiento tumoral *in vivo*. Los ratones se inocularon con células de cáncer colorrectal humanas colo205. Tras la aparición de tumorales palpables, a los animales se les administró tres dosis de 80 mg/kg de CPT-11 sola o en combinación con 3 mg/kg de anti-LY6D/E48-vc-MMAE o anti-IL8-vc-MMAE, como control negativo, de acuerdo con la programación indicada.

Figura 6. Actividad antitumoral de CPT-11 combinada con el inmunoc conjugado anti-LY6D/E48. A. A ratones sin pelo con xenoinjertos tumorales humanos Colo205 se les administró tres dosis de CPT-11 a 80 mg/kg (flechas abiertas) más cuatro dosis a 3 mg/kg de anti-LY6D/E48-vc-MMAE o anti-IL8-vc-MMAE de inmunoc conjugado de control (flechas cerradas). Un tercer grupo recibió CPT-11 más vehículo MA b (PBS). B. Los inmunoc conjugados y el PBS de control se administraron en ausencia de CPT-11.

Figura 7. Tinción de H&E de xenoinjertos tumorales humanos Colo205. Los xenoinjertos tumorales se fijaron en formalina/etanol y se tiñeron secciones con hematoxilina y Eosina. Se presentan ejemplos de tumores de ratones a los que se les administró CT-11 (derecha) o solución salina (izquierda).

Figura 8. Gráfica de dispersión de datos de la expresión génica para intestino normal. Datos de matrices de oligonucleótidos obtenidos con ARN extraído del intestino normal de ratones con tumores tratados con solución salina (eje Y) o CPT-11 (eje X) presentados como un gráfico bidimensional. Las intensidades de señal para todas las sondas en el conjunto de chips de ratón Mu74Av2 se representan en una escala \log_{10} . La mayor parte de las sondas caen en la diagonal, lo que no indica diferencia en el tratamiento con CPT-11.

Descripción Detallada de la Realización Preferida

A. Definiciones

60 **[0013]** A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un técnico en la técnica al que pertenece la invención. Singleton y col., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2ª ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4ª ed., John Wiley & Sons

(Nueva York, NY 1992), proporcionan a un experto en la técnica una guía general para muchos de los términos usados en la presente solicitud.

5 **[0014]** Para los fines de la presente invención, se definen los siguientes términos a continuación:

[0015] El término "micromatriz" se refiere a una disposición ordenada de elementos hibridables en una matriz, preferiblemente sondas polinucleóticas sobre un sustrato.

10 **[0016]** El término "polinucleótido", cuando se usa en singular o en plural, generalmente se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. De este modo, por ejemplo, los polinucleótidos, como se definen en el presente documento, incluyen, sin limitación, ADN mono- y bi-catenario, ADN que incluye regiones mono- y bi-catenarias, ARN mono- y bi-catenario, y ARN que incluye regiones mono- y bi-catenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser monocatenario o, más típicamente, bicatenario o incluyen regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, el término "polinucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Las cadenas en dichas regiones pueden ser de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir la totalidad de una o más de las moléculas, pero más típicamente incluyen sólo una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región de triple-hélice a menudo es un oligonucleótido. El término "polinucleótido" específicamente incluye los ADNc. El término incluye ADN (incluyendo ADNc) y ARN que contienen una o más bases modificadas. De este modo, los ADN o los ARN con estructuras modificadas para conseguir estabilidad o por otras razones son "polinucleótidos", como se usa este término en el presente documento. Además, se incluyen dentro del término "polinucleótidos", como se define en el presente documento, ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiadas. En general, el término "polinucleótido" incluye todas las formas modificadas química, 15 20 25 25 enzimática y/o metabólicamente de polinucleótidos no modificados, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo células sencillas y complejas.

30 **[0017]** El término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido relativamente corto que incluye, sin limitación, desoxirribonucleótidos monocatenarios, ribonucleótidos mono- o bicatenarios, híbridos de ARN:ADN y ADN bicatenarios. Los oligonucleótidos, tales como los oligonucleótidos sonda de ADN monocatenarios a menudo se sintetizan por procedimientos químicos, por ejemplo, usando sintetizadores de oligonucleótidos automáticos que están disponibles en el mercado. Sin embargo, pueden hacerse oligonucleótidos mediante una diversidad de procedimientos distintos, incluyendo técnicas mediadas por ADN recombinante *in vitro* y por la expresión de ADN en células y organismos.

35 **[0018]** Las expresiones "gen expresado diferencialmente", "expresión génica diferencial" y sus sinónimos, que se usan indistintamente, se refieren a un gen cuya expresión se activa a un nivel superior o inferior en sujeto que padece una enfermedad, específicamente cáncer, tal como cáncer de mama, en relación a su expresión en un sujeto normal o de control. Las expresiones también incluyen genes cuya expresión es de mayor o menor nivel en diferentes fases de la misma enfermedad. Los términos también incluyen genes cuya expresión es superior o inferior en pacientes que son significativamente sensibles o resistentes a ciertos fármacos terapéuticos. También se entiende que un gen expresado diferencialmente puede estar activado o inhibido a nivel del ácido nucleico o a nivel de la proteína, o puede ser objeto de corte y empalme alternativo para dar como resultado un producto de polipéptido diferente. Dichas diferencias pueden demostrarse por un cambio en los niveles de ARNm, expresión en la superficie, secreción u otras divisiones de un polipéptido, por ejemplo. La expresión génica diferencial puede incluir una comparación de la expresión entre dos o más genes o sus productos génicos, o una comparación de las proporciones de la expresión entre dos o más genes o sus productos génicos, o incluso una comparación de dos productos procesados de manera diferente del mismo gen, que difieren entre sujetos normales y sujetos que padecen una enfermedad, específicamente cáncer, o entre diferentes fases de la misma enfermedad. La expresión diferencial incluye tanto diferencias cuantitativas como diferencias cualitativas en el patrón de expresión temporal o celular en un gen o sus productos de expresión entre, por ejemplo, células normales o enfermas, o entre células que han experimentado diferentes acontecimientos de enfermedad o fases de enfermedad, o células que son significativamente sensibles o resistentes a ciertos fármacos terapéuticos. Para el fin de esta invención, se considera que está presente la "expresión génica diferencial" cuando hay al menos aproximadamente dos veces, 40 45 50 55 preferiblemente al menos aproximadamente cuatro veces, más preferiblemente al menos aproximadamente seis veces, más preferiblemente al menos aproximadamente diez veces de diferencia entre la expresión de un gen determinado en sujetos normales y enfermos, o en los diversas fases del desarrollo de la enfermedad en un sujeto enfermo, o en paciente que son diferencialmente sensibles a CPT-II.

60 **[0019]** La expresión "regulado por aumento selectivamente" se usa en el presente documento para referirse a un gen que se induce por al menos dos veces en un tumor mediante un tratamiento dado, mientras que no se detecta una inducción significativa en el tejido normal correspondiente en el mismo sujeto tratado.

[0020] El término "tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo el crecimiento celular neoplásico y proliferación, tanto maligna como benigna, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos.

[0021] Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen el estado fisiológico en mamíferos que está caracterizado típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma y cáncer cerebral.

[0022] La patología del cáncer incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, el crecimiento celular anormal o incontrolable, metástasis, la interferencia con el funcionamiento normal de las células vecinas, liberación de citocinas u otros productos de secreción en niveles anormales, la supresión o el agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, neoplasia, premalignidad, malignidad, invasión de tejidos u órganos circundantes o distantes, tales como ganglios linfáticos, etc.

[0023] El término "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como al tratamiento profiláctico o medidas preventivas, en el que el objetivo es prevenir o ralentizar (reducir) la afección patológica o trastorno diana. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno, así como los propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se desea prevenir el trastorno. En el tratamiento de tumores (por ejemplo, cáncer), un agente terapéutico puede disminuir directamente la patología de las células tumorales, o hacer que las células tumorales sean más susceptibles al tratamiento por otros agentes terapéuticos, por ejemplo, radiación y/o quimioterapia.

[0024] En general, un "agente quimioterapéutico" es un compuesto útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo, tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosfaoramida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucilo, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas, tales como carmustina, clorzotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptoizocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzadores de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina;

[0025] bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentoestatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK.R™; razoxano; sizofirano; espiro-germanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo paclitaxel (TAXOL™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE™, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatina y carboplatina; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; camptotecina-11 (CPT-11); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre los tumores, tales como anti-estrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y anti-andrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leu-prolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

[0026] En general, un "agente inhibidor del crecimiento" se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de un tumor, tal como un cáncer, célula, *in vitro* o *in vivo*. De esta manera, el agente inhibidor del crecimiento es uno que reduce significativamente el porcentaje de células tumorales en la fase S. Los ejemplos de

agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar diferente del de la fase S), tal como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueantes clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), TAXOL™, y los inhibidores topo II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 afectan también la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes de alquilación del ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbacina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluoroacilo, y ara-C. Se puede encontrar información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami y col. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente en la p. 13.

[0027] "Terapia neoadyuvante" es la terapia adyuvante o complementaria administrada antes de la terapia primaria (principal). La terapia neoadyuvante incluye, por ejemplo, quimioterapia, radioterapia y terapia hormonal. Por tanto, puede administrarse quimioterapia antes de la cirugía para contraer el tumor, de modo que la cirugía pueda ser más eficaz o, en el caso de tumores anteriormente inoperables, posible.

[0028] La expresión "carga frontal", cuando se refiere a la administración del fármaco, se usa para describir una dosis inicialmente alta seguida por la misma o dosis menores a intervalos. La o las dosis iniciales mayores significan aumentar más rápidamente la concentración de fármaco en el suero del animal o paciente humano hasta una concentración en suero diana eficaz. El suministro de una carga frontal incluye administrar dosis iniciales y dosis de mantenimiento mediante infusión o administración de bolos, por vía intravenosa o por vía subcutánea, por ejemplo.

[0029] "Anticuerpos" (Ab) e inmunoglobulinas" (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión por un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que carecen de especificidad por el antígeno. Polipéptidos del último tipo se producen, por ejemplo, a bajos niveles por el sistema linfático y a niveles crecientes por los mielomas.

[0030] "Anticuerpos naturales" e "inmunoglobulinas naturales" son normalmente glucoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas (L) y de dos cadenas pesadas idénticas (H). Cada cadena ligera se une a una cadena pesada mediante un enlace covalente disulfuro, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes disulfuro intracadena regularmente separados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de numerosos dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y la pesada.

[0031] El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en la secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y en la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye igualmente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se denominan la región marco (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprende cuatro regiones FR, adoptando en gran medida una configuración de beta lámina conectada por las tres CDR, que forman bucles que conectan, y que en algunos casos forman parte de la estructura de la β -lámina. Las CDR de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y col., NIH Publ. N° 91-3242, Vol. I, páginas 647-669 [1991]). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo con el antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

[0032] La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina da como resultado un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y sigue siendo capaz de reticularse con el antígeno.

[0033] "Fv" es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una ligera en estrecha asociación, no covalente. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada región variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L . Colectivamente, las seis CDR confieren

especificidad de unión entre antígeno y anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable individual (o la mitad de un Fv que comprende únicamente las tres CDR específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y de unirse al antígeno, aunque con una afinidad más baja que la del sitio de unión completo.

5 **[0034]** El fragmento Fab contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas procedentes de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento de Fab' en la que el(los) resto(s) de cisteína de los dominios constantes soportan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagras entre ellos. Se conocen también otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

15 **[0035]** Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) procedentes de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

20 **[0036]** Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ , μ , respectivamente. Se conocen bien las estructuras y las configuraciones tridimensionales de las subunidades de las diferentes clases de inmunoglobulinas.

25 **[0037]** El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos siempre que muestren la actividad biológica deseada.

30 **[0038]** Los fragmentos de anticuerpos comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata y col., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

35 **[0039]** La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. Adicionalmente a su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se sintetizan mediante cultivo del hibridoma, sin contaminación por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se ha obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se interpreta como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar según la presente invención se pueden preparar mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., Nature, 256: 495 [1975], o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" se pueden aislar también a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando por ejemplo las técnicas descritas en Clackson y col., Nature, 352: 624-628 [1991] y en Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

45 **[0040]** Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) en los cuales una porción de la cadena pesada y/o de la ligera es idéntica u homologa a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivadas de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de las(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivadas de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 [1984]).

60 **[0041]** Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) son inmunoglobulinas

quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen la mínima secuencia derivada de una inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de complementariedad

5
 [0042] (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como de ratón, rata o conejo que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos ejemplos, los restos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o en las secuencias de la región marco. Estas modificaciones se realizan para refinar y maximizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a las de una inmunoglobulina humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véanse Jones y col., Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann y col., Nature 332: 323-329 [1988]; y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo PRIMATIZED™ en el que la región de unión a antígeno del anticuerpo se obtiene de un anticuerpo producido por la inmunización de monos macacos con el antígeno de interés.

20
 [0043] Los fragmentos de anticuerpos de una "Fv de única cadena", o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L, que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

25
 [0044] El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Usando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y en Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).

30
 [0045] Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnóstico o terapéutico del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95% en peso del anticuerpo según se determinó mediante el procedimiento de Lowry, y más preferible más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de corte giratorio, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. Los anticuerpos aislados incluyen el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes debido a que al menos un anticuerpo del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, se preparará el anticuerpo aislado mediante al menos una etapa de purificación.

35
 [0046] "Tratamiento" se refiere tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellas que necesitan tratamiento incluyen las que ya tienen el trastorno, así como aquellas en las que el trastorno se va a evitar.

40
 [0047] "Mamífero", para los fines del tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, primates superiores, roedores, animales domésticos y de granja, y de zoo, deportivos, o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

45
 [0048] El término "antagonista", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que tiene la capacidad de inhibir una función biológica de un polipéptido diana. Por consiguiente, el término "antagonista" se define en el contexto de la función biológica del polipéptido diana. Aunque los antagonistas preferidos en el presente documento interactúan con (por ejemplo, se unen a) la diana, las moléculas que inhiben una actividad biológica del polipéptido diana interactuando con otros miembros de la ruta de transducción de señal de la cual el polipéptido diana es un miembro, también se incluyen específicamente dentro de esta definición. Una actividad biológica preferida inhibida por un antagonista se asocia con el desarrollo, el crecimiento o la expansión de un tumor. Los antagonistas, como se define en el presente documento, sin limitación, incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, péptidos, moléculas pequeñas no peptídicas, moléculas antisentido y señuelos oligonucleotídicos.

B. Descripción Detallada

5 [0049] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas de recombinación), microbiología, biología celular y bioquímica, que están dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican a fondo en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición (Sambrook y col., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology", 4ª edición (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel y col., eds., 1987); y "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis y col., eds., 1994).

Procedimientos de Determinación del Perfil de la Expresión Génica

15 [0050] La presente invención aprovecha el resultado del análisis de la expresión génica, realizado sobre muestras tumorales antes y después del tratamiento con CPT-II, y sobre muestras normales correspondientes.

20 [0051] Los procedimientos de determinación del perfil de la expresión génica incluyen procedimientos basados en análisis de hibridación de polinucleótidos, procedimientos basados en secuenciación de polinucleótidos, y procedimientos basados en proteómica. Los procedimientos usados más comúnmente conocidos en la técnica para la cuantificación de la expresión de ARNm en una muestra incluyen transferencia de Northern e hibridación *in situ* (Parker & Barnes, Methods in Molecular Biology 106: 247-283 (1999)); RNase protection assays (Hod, Biotechniques 13: 852-854 (1992)); y procedimientos basados en PCR, tales como reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) (Weis y col., Trends in Genetics 8: 263-264 (1992)). Como alternativa, pueden emplearse anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los procedimientos representativos para el análisis de la expresión génica basado en secuenciación incluyen análisis seriados de la expresión génica (SAGE), y análisis de la expresión génica por secuenciación masivamente paralela (MPSS).

30 [0052] A menudo la expresión génica diferencial se estudia usando técnicas de micromatrices. Por lo tanto, el perfil de expresión de los genes en las células tumorales antes y después del tratamiento con un agente quimioterapéutico puede medirse usando tecnología de micromatrices. En este procedimiento, las secuencias polinucleotídicas de interés (incluyendo ADNc y oligonucleótidos) se ponen en placas, o se despliegan, sobre un sustrato de microchip. Después, las secuencias desplegadas se hibridan con sondas de ADN específico de células o tejidos de interés. La fuente de ARNm puede, por ejemplo, ser ARN total aislado de tumores humanos o líneas celulares tumorales, y los tejidos o líneas celulares normales correspondientes.

35 [0053] Las micromatrices pueden adoptar diferentes formatos. Por lo tanto, por ejemplo, el ADNc (típicamente de aproximadamente 500-5.000 bases de largo) puede inmovilizarse sobre una superficie sólida, tal como vidrio, usando aplicación puntual por robot y se expone a un conjunto de dianas por separado o en una mezcla. Este procedimiento, "tradicionalmente" denominado micromatriz de ADN, se describe, por ejemplo, en R. Ekins y F.W. Chu (1999) Trends in Biotechnology, 17: 217-218.

45 [0054] En otro formato, una matriz de oligonucleótidos (típicamente aproximadamente 20-80-mer de oligos) o sondas de ácido nucleico peptídico (PNA) se sintetiza *in situ* (en chip) o mediante síntesis convencionales seguido de inmovilización en chip. La matriz se expone a ADN de muestra marcada, hibridada, y se determina la identidad/abundancia de secuencias complementarias. Este formato, generalmente denominado como micromatriz de oligonucleótidos, está disponible en Affymetrix, que vende sus productos fabricados fotolitográficamente bajo el nombre comercial GeneChip®.

50 [0055] Otro procedimiento de determinación del perfil de la expresión génica usado comúnmente es el análisis PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR). Puesto que el ARN no puede servir como una plantilla para PCR, la primera etapa en la determinación del perfil de la expresión génica por RT-PCR es la transcripción inversa del modelo de ARN en ADNc seguida de su amplificación exponencial en una reacción por PCR. Las dos transcriptasas inversas más usadas comúnmente son la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT) y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). La etapa de la transcripción inversa se ceba típicamente usando cebadores específicos, hexámeros aleatorios o cebadores oligo-dT, dependiendo de las circunstancias y el objetivo de la determinación del perfil de expresión.

60 [0056] Aunque la etapa por PCR puede usar una diversidad de polimerasas de ADN dependientes de ADN termoestables, típicamente emplea la polimerasa de ADN Taq, que tiene una actividad 5'-3' nucleasa pero carece de una actividad correctora de endonucleasa 3'-5'. Por lo tanto, la PCR TaqMan® típicamente utiliza la actividad 5'-nucleasa de Taq o polimerasa Tth para hidrolizar una sonda de hibridación unida a su amplicón diana, pero puede

usarse cualquier enzima con actividad 5' nucleasa equivalente. Se usan dos cebadores oligonucleotídicos para generar un amplicón típico de una reacción PCR. Un tercer oligonucleótido, o sonda, está diseñado para detectar una secuencia nucleotídica situada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no se extiende por la enzima de ADN polimerasa Taq, y se marca con un tinte fluorescente indicador y un tinte fluorescente interruptor. Cualquier emisión inducida por láser del tinte indicador se interrumpe por el tinte interruptor cuando los dos tintes se sitúan cerca entre sí según están sobre la sonda. Durante la reacción de amplificación, la enzima de ADN polimerasa Taq escinde la sonda de una forma dependiente del modelo. Los fragmentos de la sonda resultante se disocian en solución, y la señal del colorante indicador liberado queda libre del efecto interruptor del segundo fluoróforo. Una molécula del colorante indicador se libera para cada nueva molécula sintetizada, y la detección del colorante indicador no interrumpido proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

[0057] El análisis RT-PCR TaqMan® puede realizarse usando un equipo disponible en el mercado, tal como, por ejemplo, ABI PRISM 7700TM Sequence Detection System™ (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), o Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). Los datos de ensayo de 5'-nucleasa se expresan inicialmente como Ct, o el ciclo de umbral. Como se ha analizado anteriormente, los valores de fluorescencia se registran durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado en ese momento en la reacción de amplificación. El punto en el que la señal fluorescente se registra en primer lugar como estadísticamente significativo es el ciclo de umbral (Ct). Para minimizar errores y el efecto de la variación muestra a muestra, el análisis por RT-PCR se realiza normalmente usando un estándar interno. El estándar interno ideal se expresa a un nivel relativamente constante entre diferentes tejidos, y no se ve afectado por el tratamiento experimental. Los ARN usados con frecuencia para normalizar los patrones de la expresión génica son ARNm para los genes de limpieza gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y β -actina. El análisis por PCR cuantitativa en tiempo real mide la acumulación de producto de PCR a través de una sonda fluorogénica de doble marcado (es decir, sonda TaqMan®). El análisis por PCR en tiempo real es compatible tanto con la PCR competitiva cuantitativa, donde se usa un competidor interno para cada secuencia diana para la normalización, como con la PCR comparativa cuantitativa usando un gen de normalización contenido en la muestra, o un gen de limpieza para RT-PCR. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, Held y col. (1996) *Genome Research* 6: 986-994.

[0058] Otros procedimientos de determinación del perfil de la expresión génica incluye, por ejemplo, el procedimiento MassARRAY desarrollado por Sequenom, Inc. (San Diego, CA) (véase, por ejemplo, Ding y Cantor, (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 3059-3064); visualización diferencial (Liang y Pardee, (1992) *Science* 257: 967-971); polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (iAFLP) (Kawamoto y col., (1999) *Genome Res.* 12: 1305-1312); tecnología BeadArray™ (Illumina, San Diego, CA; Oliphant y col., *Discovery of Markers for Disease* (Suplemento para *Biotechniques*), junio de 2002; Ferguson y col., (2000) *Analytical Chemistry* 72: 5618); BeadsArray for Detection of Gene Expression (BADGE), usando el sistema Luminex100 LabMAP disponible en el mercado y microesferas codificadas con múltiples colores (Luminex Corp., Austin, TX) en un ensayo rápido para la expresión génica (Yang y col., (2001) *Genome Res.* 11: 1888-1898); y análisis de determinación del perfil de la expresión de alta cobertura (HiCEP) (Fukumura y col., (2003) *Nucl. Acids. Res.* 31 (16) e94).

[0059] Se usan anticuerpos o antisueros de procedimientos basados en inmunohistoquímica, preferiblemente antisueros policlonales, y mucho más preferiblemente anticuerpos monoclonales específicos para cada marcador para detectar la expresión. Los anticuerpos pueden detectarse mediante el marcado directo de los propios anticuerpos, por ejemplo, con marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de hapteno, tales como biotina, o una enzima, tal como peroxidasa de rábano rusticano o fosfatasa alcalina. Como alternativa, se usa un anticuerpo primario no marcado junto con un anticuerpo secundario marcado, que comprende antisuero, antisuero policlonal o un anticuerpo monoclonal específico para el anticuerpo primario. Se conocen bien en la técnica y están disponibles en el mercado protocolos y kits de inmunohistoquímica.

[0060] Puesto que un fin de la invención es la identificación de las moléculas de la superficie celular que se activan selectivamente en las células tumorales cuando se exponen a CPT-II, los procedimientos proteómicos, en solitario o junto con análisis de expresión génica, son particularmente adecuados para supervisar dichos cambios de la abundancia polipeptídica. El término "proteoma" se define como la totalidad de las proteínas presentes en una muestra (por ejemplo, tejido, organismo o cultivo celular) en un momento determinado. La proteómica incluye, entre otras cosas, el estudio de los cambios globales de la expresión de proteínas en una muestra (también se denomina como "proteómica de expresión"). La proteómica típicamente incluye las siguientes etapas: (1) separación de proteínas individuales en una muestra mediante electroforesis en gel bidimensional (2-D PAGE); (2) identificación de las proteínas individuales recuperadas del gel, por ejemplo por espectrometría de masas o secuenciación N-terminal, y (3) análisis de los datos usando bioinformática. Los procedimientos proteómicos son suplementos valiosos para otros procedimientos de determinación del perfil de expresión génica, y pueden usarse, solos o en combinación con otros procedimientos, para detectar las moléculas de la superficie celular de la presente invención.

Quimioterapia del cáncer

5 **[0061]** El objetivo del tratamiento quimioterapéutico del cáncer es curar el paciente o, al menos, ralentizar la progresión de la enfermedad, aumentar la supervivencia, reducir la posibilidad de reaparición del cáncer, controlar los síntomas y/o mantener o mejorar la calidad de vida. La quimioterapia varía dependiendo del tipo de cáncer, y, en el caso de tumores sólidos, se puede realizar antes y/o después de la extracción quirúrgica del tumor primario. Para algunos cánceres, existen varias terapias estándar universalmente aceptadas, mientras que el tratamiento de otras no están aún estandarizado.

10 **[0062]** Anteriormente se han indicado agentes quimioterapéuticos y en general se clasifican según su mecanismo de acción. Algunos agentes quimioterapéuticos dañan directamente el ADN y ARN. Mediante la alteración de la replicación del ADN, dichos agentes quimioterapéuticos detienen completamente la replicación o dan lugar a la producción de ADN o ARN anticodificante. Esta categoría incluye, por ejemplo, cisplatino (Platinol®), daunorubicina (Cerubidine®), doxorubicina (Adriamycin®), y etopósido (VePesid®). Otro grupo de agentes quimioterapéuticos
15 contra el cáncer interfieren con la formación de nucleótidos o desoxiribonucleótidos, de manera que se bloquea la síntesis de ARN y la replicación celular. Ejemplos de fármacos en esta clase incluyen metotrexato (Abitrexate®), mercaptopurina (Purinethol®), fluorouracilo (Adrucil®), e hidroxiaurea (Hydrea®). Una tercera clase de agentes quimioterapéuticos realiza la síntesis o rotura de husos mitóticos y, como resultado, interrumpe la división celular. Ejemplos de fármacos en esta clase incluyen vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) y taxenos, tales como, paclitaxel (Taxol®), y docetaxel (Taxotere®). Otras clasificaciones, por ejemplo, basadas en la estructura química de los agentes quimioterapéuticos también son posibles.

25 **[0063]** Para el cáncer de mama, la doxorubicina (Adriamycin®) es considerada por la mayoría el agente quimioterapéutico individual más eficaz. Además, el 5-FU se ha utilizado clínicamente durante varias décadas y es el pilar de muchas terapias de combinación para el cáncer de mama. Otros agentes quimioterapéuticos utilizados habitualmente para el tratamiento del cáncer de mama incluyen, por ejemplo, antraciclinas, derivados de taxano y varias terapias de combinación, tales como quimioterapia con CMF (ciclofosfamida-metotrexato-fluorouracilo). La mayoría de pacientes reciben quimioterapia inmediatamente después de la extirpación quirúrgica del tumor. Esta estrategia se denomina habitualmente como terapia con adyuvante. Sin embargo, la quimioterapia se puede administrar también antes de cirugía, tal como se denomina el tratamiento con neoadyuvante. Aunque la utilización de quimioterapia con neoadyuvante se origina del tratamiento de cánceres de mama avanzados e inoperables, ha ganado aceptación en el tratamiento otros tipos de cáncer. La eficacia de la quimioterapia con neoadyuvante se ha analizado en varias pruebas clínicas. En la prueba entre múltiples centros del National Surgical Adjuvant Breast and
30 Bowel Project B-18 (NSAB B-18) (Fisher y col., J. Clin. Oncology 15: 2002-2004 (1997); Fisher y col., J. Clin. Oncology 16: 2672-2685 (1998)), la terapia con neoadyuvante se realizó con una combinación de adriamicina y ciclofosfamida ("pauta AC"). En otra prueba clínica, la terapia con neoadyuvante se administró utilizando una combinación de 5-fluorouracilo (5-FU), epirubicina y ciclofosfamida ("pauta FEC") (van Der Hage y col., J. Clin. Oncol. 19: 4224-4237 (2001)). Otras pruebas clínicas también han utilizado pautas de tratamiento con neoadyuvante que contienen taxano. Véase, por ejemplo, Holmes y col., J. Natl. Cancer Inst. 83: 1797-1805 (1991) y Moliterni y col., Seminars in Oncology, 24: S17-10-S-17-14 (1999). Para más información sobre quimioterapia con neoadyuvantes para el cáncer de mama, véase, Cleator y col., Endocrine-Related Cancer 9: 183-195 (2002).

45 **[0064]** El 5-FU, CPT-11 (irinotecan), y el oxaliplatino, administrados solos o combinados, han demostrado ser eficaces en el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado (CRC) (véase, por ejemplo, Grothey y col. (2004) J. Clin. Oncol. 22: 1209-15).

50 **[0065]** Se ha observado que el cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC) responde bien a la terapia de combinación con vinorelbina, cisplatino y opcionalmente paclitaxel (véase, por ejemplo Rodríguez y col. (2004) Am. J. Clin. Oncol. 27: 299-303).

[0066] Las pautas terapéuticas para el tratamiento de otros tipos de cáncer también se conocen bien por los expertos en la técnica.

55 **[0067]** El enfoque de la presente invención, que se refiere a tratamiento con CPT-II, también será aplicable en general para determinar el efecto de cualquiera de estos tratamientos en el patrón de expresión génica del tumor tratado, que, a su vez, podrá permitir la identificación de antagonistas que puedan conducir a terapias de combinación más eficaces.

Antagonistas

60 **[0068]** La primera etapa en la identificación de antagonistas de un polipéptido diana, es típicamente el cribado *in vitro* para identificar compuestos que unan selectivamente el polipéptido diana. La unión al receptor puede probarse usando polipéptidos diana aislados a partir de sus fuentes naturales respectivas, o producidos por tecnología de

ADN recombinante y/o síntesis química. La afinidad de unión de los compuestos cantidades puede ensayarse mediante unión directa (véase, por ejemplo, Schoemaker y col., J. Pharmacol. Exp. Ther., 285: 61-69 (1983)) o mediante unión indirecta, por ejemplo unión competitiva. En los experimentos de unión competitiva, la concentración de un compuesto necesario para desplazar el 50% de otro compuesto unido al polipéptido diana (IC50) se usa normalmente como una medida de la afinidad de unión. Si el compuesto de prueba une la diana selectivamente y con alta afinidad, desplazando el primer compuesto, éste se identifica como un antagonista. Pueden usarse ensayos basados en células de una manera similar.

[0069] Un grupo preferido de antagonistas incluye anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido diana. Puede determinarse la "afinidad de unión" al anticuerpo mediante procedimientos de equilibrio (por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)), o cinética (por ejemplo, análisis BIACORE™), por ejemplo. Además, el anticuerpo puede someterse a otros "ensayos de actividad biológica", por ejemplo, para evaluar su "potencia" o actividad farmacológica y su eficacia potencial como un agente terapéutico. Dichos ensayos se conocen en la técnica y dependen del antígeno diana y el uso pretendido para el anticuerpo.

Anticuerpos

[0070] Se conocen bien en la técnica técnicas para producir anticuerpos.

(1) Preparación de Anticuerpos

(i) Preparación del Antígeno

[0071] Pueden usarse antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembrana, tales como receptores, pueden usarse fragmentos de estos (por ejemplo el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. Como alternativa, las células que expresan la molécula transmembrana pueden usarse como el inmunógeno. Dichas células pueden obtenerse a partir de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares cancerosas) o pueden ser células que se han transformado mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana. Serán evidente para los expertos en la técnica otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos.

(ii) Anticuerpos Policlonales

[0072] Los anticuerpos policlonales se desarrollan preferiblemente en animales mediante inyecciones múltiples subcutáneas (se) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente con una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar, por ejemplo, la hemocianina de la lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoi sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂.

[0073] Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante la combinación de, por ejemplo, 100 µg o 5 µg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y la inyección por vía intradérmica de la solución en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días más tarde, los animales sangran y el suero se ensaya para el título de anticuerpo. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Preferiblemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden producir en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, los agentes de agregación, tales como el alumbre, se utilizan de forma adecuada para potenciar la respuesta inmune.

(iii) Anticuerpos Monoclonales

[0074] Los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., Nature, 256: 495 (1975), o pueden hacerse mediante procedimientos de ADN recombinante (patente de Estados Unidos N° 4.816.567). En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster o un mono macaco, se inmunizan como se ha descrito anteriormente en el presente documento para conseguir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-103 (Academia Press. 1986)).

- 5 **[0075]** Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se desarrollan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirán habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes de HGPRT.
- 10 **[0076]** Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, contribuyen a una producción estable a un nivel elevado de anticuerpo por las células seleccionadas productoras de los anticuerpos, y son sensibles a un medio, tal como medio HAT. Entre éstas, las líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol. 133: 3001 (1984); y Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).
- 15 **[0077]** Se ensaya el medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante la inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).
- 20 **[0078]** Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos contra la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante procedimientos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academia Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPM1-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.
- 25 **[0079]** Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.
- 30 **[0080]** El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células E. coli, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de ningún otro modo producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. A continuación, se describirá en más detalle la producción recombinante de anticuerpos.
- 35 **[0081]** En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos generados utilizando las técnicas descritas en McCafferty y col., Nature, 348: 552-554 (1990). Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Las posteriores publicaciones describen la producción de anticuerpos humanos de alta elevada (intervalo de nM) mediante intercambio de cadenas (Marks y col., Biol. Technology, 10: 779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., Nuc. Acids. Res., 21: 2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas convencionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.
- 40 **[0082]** El ADN también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante de los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de secuencias murinas homologas (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison y col. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)), o mediante unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es inmunoglobulina.
- 45 **[0083]** Habitualmente, dichos polipéptidos que no son inmunoglobulinas se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo divalente quimérico que comprende un sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno
- 50
- 55
- 60

diferente.

(iv) Anticuerpos Humanizados y Humanos

5 **[0084]** Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que habitualmente se obtienen de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y col. (Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de CDR de roedor o secuencias CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

20 **[0085]** La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para utilizar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el procedimiento denominado "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo contra roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. A continuación, la secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta como la FR humana para el anticuerpo humanizado (Sims y col., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia y col., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro procedimiento usa una FR particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma FR se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta y col., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

30 **[0086]** Es también importante que los anticuerpos se humanicen manteniendo una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos conceptuales humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles normalmente y son familiares para los expertos en la técnica. Existen programas informáticos que muestran y visualizan probables estructuras conformaciones tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La observación de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir del receptor y secuencias importadas, de manera que se consiga la característica del anticuerpo deseado, tal como una mayor afinidad para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos CDR están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

40 **[0087]** Como alternativa, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que con capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada del anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógena. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación del antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann y col., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993); y Duchosal y col. *Nature* 355: 258 (1992). Los anticuerpos humanos también pueden obtenerse a partir de bibliotecas de visualización de fagos (Hoogenboom y col., *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991); Vaughan y col. *Nature Biotech* 14: 309 (1996)).

(v) Fragmentos de Anticuerpos

55 **[0088]** Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Habitualmente, estos fragmentos se obtuvieron mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) y Brennan y col., *Science* 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir actualmente directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos de fagos que se han descrito anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E coli* y pueden acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(Ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de

anticuerpos serán evidentes para el experto en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase el documento WO 93/16185.

(vi) Anticuerpos Multiespecíficos

5

[0089] Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Aunque dichas moléculas normalmente se unirán sólo a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAbs), anticuerpos con especificidades adicionales, tales como anticuerpos trispecíficos se incluyen por esta expresión cuando se usan en el presente documento. Por lo tanto, se incluyen específicamente anticuerpos biespecíficos que se unen a dos moléculas de la superficie celular, cuya expresión se regula por aumento por un agente quimioterapéutico.

10

[0090] Se conocen en la técnica procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos. La producción habitual de anticuerpos específicos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein y col., Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda y los rendimientos de producto son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker y col., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

15

20

[0091] De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se produce preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para la unión a cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen particular importancia.

25

30

35

[0092] En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera sencilla de separación. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., Methods in Enzymology 121: 210 (1986).

40

45

[0093] Según otro enfoque descrito en el documento WO96/27011, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante del anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

50

55

[0094] Entre los anticuerpos biespecíficos se incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, y el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir las células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos Nº 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados se conocen bien en la técnica y se desvelan en la Patente de Estados Unidos Nº 4.676.980 junto con varias técnicas de reticulación.

60

[0095] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han

descrito en la bibliografía. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan y col., Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab)_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenita sódica, para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab' -TNB se reconvierte a continuación en Fab' -tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab' -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0096] El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab' -SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., J. Exp. Med, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico $F(ab)_2$ completamente humanizado. Cada fragmento de Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor de HER2 y linfocitos T humanos normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

[0097] Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny y col., J. Immunol. 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber y col., J. Immunol. 152: 5368 (1994).

[0098] Se consideran los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt y col., J. Immunol. 147: 60 (1991).

(vi) Diseño por Ingeniería de Funciones Efectoras

[0099] Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora para, por ejemplo, aumentar la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, se puede introducir uno o más residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces de tipo disulfuro entre las cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una mejor capacidad de interiorización y/o una mayor capacidad de matar células mediada por complementos y una citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (CCDA). Véase Caron y col., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con una mayor actividad antitumoral usando entrecruzamientos heterobifuncionales según lo descrito en Wolff y col., Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, se puede diseñar por ingeniería un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y pueda así tener mayores capacidades de lisis de complementos y de CCDA. Véase Stevenson y col., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989).

(viii) Inmunoconjugados

[0100] La invención también pertenece a inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo descrito en el presente documento conjugado con un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

[0101] Los agentes quimioterapéuticos generalmente útiles en la generación de dichos inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden utilizarse se incluyen la cadena A diftérica, los fragmentos activos no ligantes de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modeccina, la alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), inhibidor de *Nomordica charantia*, la curcina, la crotina, el inhibidor de *Saponaria officinalis*, la gelonina, la

mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y los tricotecenos. Están disponibles una diversidad de radionucleidos para la producción de anticuerpos de radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{133}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

5 **[0102]** Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se preparan mediante la utilización de una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazonio-benzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta y col., Science 238: 1098-1104, 1987. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de nucleótidos radioactivos al anticuerpo. Véase el documento WO 94/11026.

15 **[0103]** En general, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en la selección de dianas previa de tumores en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación y después la administración de un "ligando" (por ejemplo avidina), que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo un radionucleótido). Dentro del marco de la invención, el agente quimioterapéutico/citotóxico que se ha descrito anteriormente es CPT-II.

(ix) Inmunoliposomas

25 **[0104]** Los anticuerpos también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); y las patentes de Estados Unidos 4.485.045 y 4.544.545. Se desvelan liposomas con un tiempo de circulación aumentado en la patente de Estados Unidos 5.013.556.

30 **[0105]** Pueden generarse liposomas particularmente útiles por el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, el colesterol y la fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de poro definido para conseguir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse con los liposomas como se describe en Martin y col., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Como se describe en la técnica anterior, un agente quimioterapéutico (tal como la Doxorubicina) se halla opcionalmente dentro de los liposomas. Véase Gabizon y col., J. National Cancer Inst. 81 (19): 1484 (1989).

40 (iv) Terapia de profármacos mediados por enzimas dependientes del anticuerpo (ADEPT)

[0106] Los anticuerpos de la presente invención también se pueden usar en ADEPT mediante la conjugación del anticuerpo con una enzima de activación del profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento WO 81/01145) en un fármaco contra el cáncer activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la patente de Estados Unidos 4.975.278.

[0107] El componente de la enzima del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal manera que lo convierte en su forma citotóxica más activa.

50 **[0108]** Las enzimas que son útiles en el procedimiento de esta invención incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina, útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa, útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina deaminasa, útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco contra el cáncer, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de aminoácidos D; enzimas de escisión de carbohidratos, tales como beta-galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; beta-lactamasa, útil para compartir fármacos derivados con beta-lactamas en fármacos libres; y amidasas de penicilina, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Como alternativa, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", se pueden utilizar para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima se pueden preparar como se describe en el presente documento para el suministro de la abzima

con una población celular tumoral.

(xi) Fusiones de Epítipo de Unión del Receptor de Salvamento a Anticuerpo.

5 **[0109]** En ciertas realizaciones de la invención puede ser deseable usar un fragmento de anticuerpos, en lugar de un anticuerpo intacto, para aumentar la penetración del tumor, por ejemplo. En este caso, puede ser deseable modificar el fragmento de anticuerpos a fin de aumentar su semivida en suero. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión del receptor de salvamento al fragmento de anticuerpo (por ejemplo, mediante mutación de la región apropiada del fragmento de anticuerpo o bien incorporando el epítipo a un marcador peptídico que después se fusiona con el fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en el centro, por ejemplo, mediante síntesis peptídica o de DNA).

15 **[0110]** El epítipo de unión del receptor de salvamento constituye preferiblemente una región en la que uno cualquiera o más residuos aminoacídicos de uno o dos bucles de un dominio Fc se transfieren a una posición análoga del fragmento de anticuerpo. Aun más preferiblemente, se transfieren tres o más residuos de uno o dos bucles del dominio Fc. Todavía más preferiblemente, el epítipo se toma del dominio CH2 de la región Fc (por ejemplo de una IgG) y se transfiere a la región CH1, CH3 o V_H, o a más de una región de este tipo, del anticuerpo. Como alternativa, el epítipo se toma del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere a la región C_L o a la región V_L, o a ambas, del fragmento del anticuerpo. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.739.277 expedida el 20 14 de abril de 1998.

(xii) Modificaciones Covalentes

25 **[0111]** Las modificaciones covalentes del anticuerpo se incluyen dentro del alcance de esta invención. Pueden hacerse por síntesis química o por escisión enzimática o química del anticuerpo, si es aplicable. Otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se introducen en la molécula haciendo reaccionar residuos aminoacídicos seleccionados como diana del anticuerpo con un agente de derivatización orgánico que sea capaz de reaccionar con las cadenas laterales seleccionadas o los residuos N-terminal o C-terminal.

30 **[0112]** La eliminación de cualquier resto de carbohidrato presente en el anticuerpo puede realizarse química o enzimáticamente. La desglucosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto, ácido trifluorometansulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayor parte o todos los azúcares salvo el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que queda el anticuerpo intacto. La desglucosilación química se describe en Hakimuddin y col., Arch Biochem Biophys 259: 52 (1987) y en Edge y col., Anal Biochem 118: 131 (1981). La escisión enzimática de los restos de carbohidrato en los anticuerpos puede lograrse mediante el uso de una diversidad de endoglucosidasas y exoglucosidasas como se describe, por ejemplo, en Thotakura y col., Meth Enzymol 138: 350 (1987).

40 **[0113]** Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende el enlace del anticuerpo a uno de una diversidad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxilalquilenos, de la manera expuesta en las patentes de Estados Unidos N^o 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

(2) Producción recombinante de anticuerpos

45 **[0114]** Los anticuerpos de la presente invención pueden hacerse, por ejemplo, mediante técnicas de tecnología de ADN recombinante.

50 **[0115]** Las células huésped apropiadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores en el presente documento son las células procariotas, de levadura, o de eucariotas superiores que se han descrito anteriormente. Las procariotas apropiadas para este propósito incluyen las eubacterias, tales como los organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, enterobacterias tales como Escherichia, por ejemplo, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Kleibsell, Proteus, Salmonella, por ejemplo, Salmonella thyphimurium, Serratia, por ejemplo, Serratia marcescans, y Shigella, así como Bacilli tales como B. subtilis y B. licheniformis (por ejemplo, B. licheniformis 41P, desvelado en DD 266.710, publicada el 12 de abril de 1989), Pseudomonas, tales como P. aeruginosa, y Streptomyces. Un huésped de clonación E. coli preferido es E. coli 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como E. coli B, E. coli X 1776 (ATCC 31.537) y E. coli W3110 (ATCC 27.325) son apropiadas. Estos ejemplos son ilustrativos en vez de limitantes.

60 **[0116]** Además de las procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión apropiados para vectores que codifican el anticuerpo. Saccharomyces cerevisiae, o levadura común de panadería, es el más comúnmente usado entre los microorganismos huéspedes eucariotas inferiores. Sin embargo, un cierto número de otros géneros, especies y cepas están comúnmente

disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes *Kluyveromyces*, tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolipocladium*, y huéspedes *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

[0117] Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen las células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus, y las correspondientes células huésped de insecto permisivas, a partir de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca del vinagre), y *Bombyx mori*. Hay una variedad de cepas víricas disponibles para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 del NPV de *Autographa californica* y la cepa Bam-5 del NPV de *Bombyx mori* NPV, y tales virus podrían usarse como el virus en el presente documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también pueden usarse como huéspedes.

[0118] No obstante, el interés en las células de vertebrados ha sido mayor, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) ha devenido un procedimiento rutinario. Son ejemplo de líneas celulares huéspedes de mamíferos útiles la línea CV1 de riñón de mono, transformada por el SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea renal embrionaria humana (células 293 o 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., *J. Gen. Virol.* 36: 59 (1977); células renales de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células ováricas de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4126 (1980)); células sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); células renales de mono (CV1, ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario del ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0119] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación, que se conocen bien en la técnica, para la producción del anticuerpo, y se cultivan en medio nutritivo convencional, modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[0120] Las células huéspedes usadas para producir los anticuerpos de esta invención pueden cultivarse en una diversidad de medios. Los medios disponibles en el mercado, tales como F10 de Ham (Sigma), el Medio Esencial Mínimo (MEM, Sigma), el RPMI-1640 (Sigma), y el Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma) son apropiados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., *Meth. Enz.* 58: 44 (1979), Barnes y col., *Anal. Biochem* 102: 255 (1980), las patentes de Estados Unidos N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; los documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o la Re. de patente de Estados Unidos 30.985 puede usarse como medio de cultivo para las células huésped. Cualquier de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor del crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, cálcico, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualesquier otros suplementos necesarios pueden incluirse también en las concentraciones apropiadas que serán conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, pH, y similares, son aquellas que se han usado previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.

[0121] Cuando se usan técnicas recombinantes, los anticuerpos pueden producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o pueden secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los restos de material particulado, ya sea células huésped o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter y col, *Bio/Technology* 10: 163 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, la pasta de células se derrite en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos de células pueden eliminarse por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión en primer lugar se concentran generalmente usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración

Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, en cualquiera de las siguientes etapas para inhibir la proteólisis, y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

5 **[0122]** La composición de anticuerpos preparada de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la técnica de purificación preferida la cromatografía de afinidad. La conveniencia de la proteína A como un ligando de afinidad, depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio F_c de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. Puede usarse proteína A para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas de γ 1, γ 2 o γ 4 humanas
10 (Lindmark y col., J Immunol Meth 62: 1 (1983)). Se recomienda proteína G para todos los isotipos de ratón y para γ 3 humana (Guss y col., EMBO J 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la que el ligando de afinidad se une es con más frecuencia agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio poroso controlado o poli(estirendivinil)benceno, permiten magnitudes de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden lograrse con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un
15 dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (JT Baker; Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. También están disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas, tal como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina, SEPHAROSA™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo de la variante de anticuerpo que se va a recuperar.

Formulaciones Farmacéuticas

25 **[0123]** Los agentes quimioterapéuticos se administran típicamente siguiendo dosificaciones y rotas de administración usadas en la práctica clínica actual. Por ejemplo, 5-fluorouracilo (5-FU, Adrucil®) está en uso clínico para el tratamiento de cáncer de mama, cánceres gastrointestinales, incluyendo anal, esofágico, de páncreas y cánceres gástricos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado y cáncer de ovario, y se administra típicamente como una inyección en bolo i.v. o por infusión continua. La cantidad de tiempo y horario varía dependiendo del tipo y estadio del cáncer, el historial de tratamiento y la condición global del paciente, y otros factores considerados típicamente por los especialistas. Para su administración como una infusión continua, una programación de dosificación típica es una infusión continua semanal a 1.300 mg/m², que puede modificarse durante el tratamiento.

35 **[0124]** El agente antineoplásico de la invención, clorhidrato de irinotecan trihidrato (CPT-11, Camptosar, PNU-101440E; ácido (S)-[1,4'-bipiperidin]-1'-carboxílico, 4,11-dietil-3,4,12,14-tetrahidro-4-hidroxi-3,14-dioxo-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino(1,2-b)quinolin-9-il éster, monoclóhidrato, trihidrato; C₃₃H₃₈N₄O₆·HCl·3H₂O), es un derivado semisintético de la camptotecina de producto natural (Kunimoto y col. (1987) Cancer Res. 47: 5944-5947; Sawada y col. (1991) Chem. Pharm. Bull. 39: 1446-1454). La CPT-11 se ha apropiado por la U.S. Food and Drug Administration para el tratamiento de pacientes con carcinoma metastásico del colon o recto cuya enfermedad haya reaparecido o progresado tras la terapia basada en 5-fluorouracilo. La dosificación de partida recomendada de CPT-11 es 125 mg/m² i.v. durante 90 min una vez a la semana durante 4 semanas, seguido de un resto de 2 semanas, o 350 mg/m² administrado una vez cada 3 semanas. Las modificaciones de la dosificación después de la dosis inicial se basan en la tolerancia individual del paciente.

45 **[0125]** Las formulaciones, dosificaciones y protocolos de tratamiento usados para administrar los antagonistas de la presente invención variarán dependiendo del antagonista específico, el tipo y fase del cáncer, y otros factores considerados típicamente en la práctica clínica, y pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica. Si el antagonista es un anticuerpo, se preparan formulaciones terapéuticas para almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato u otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); un polipéptido de bajo peso molecular (menor de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de proteína Zn); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

5 [0126] La formulación también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación concreta que esté siendo tratada, preferiblemente, aquéllos con actividades complementarias que se no afecten negativamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar adicionalmente un agente inmunosupresor. Dichas moléculas se presentan adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces a los efectos deseados.

10 [0127] Los ingredientes activos se pueden también entrapar en una microcápsula preparada, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, una microcápsula de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en microemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª Edición, Osol, A. Ed. (1980).

15 [0128] La formulación que se usará para la administración *in vivo* debe ser estéril. Esto se cumple fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

20 [0129] Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la variante de anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos con una determinada forma, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o alcohol poli(vinílico), poliláctidas (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico y ácido glicólico y acetato de leuprólido) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como acetato de etilvinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos más cortos de tiempo. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios de la inmunogenicidad. Pueden preverse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de un enlace S-S intramolecular a través de intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando los residuos de sulfhidrilo, mediante liofilización en soluciones ácidas, controlando el contenido en humedad, usando los aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

35 [0130] La formulación se administra a un mamífero que necesita el tratamiento con el anticuerpo, preferiblemente un ser humano, de acuerdo con los procedimientos conocidos, tales como una administración intravenosa como un bolo o mediante infusiones continuas durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intra-arterial, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. En realizaciones preferidas, la formulación se administra al mamífero por administración intravenosa. Para tales fines, la formulación puede inyectarse usando una jeringa y mediante una línea IV, por ejemplo.

45 [0131] La dosificación apropiada ("cantidad terapéuticamente eficaz") del anticuerpo dependerá, por ejemplo, de la afección a tratar, la gravedad y el transcurso de la afección, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, el tipo de anticuerpo usado, y la discreción del especialista. El anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente una vez o durante una serie de tratamientos, y puede administrarse al paciente en cualquier momento desde el diagnóstico en adelante. El anticuerpo puede administrarse como el único tratamiento o junto con otros fármacos o terapias útiles en el tratamiento de la afección en cuestión.

50 [0132] Como una proposición general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo administrado estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente ya sean una o más administraciones, siendo el intervalo típico de anticuerpo usado de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 20 mg/kg, más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 15 mg/kg, administrado diariamente, por ejemplo. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se supervisa fácilmente mediante técnicas convencionales.

60 [0133] La presente invención incluye mezclas terapéuticas de CPT-11 y uno o más antagonistas de un gen o genes, como se define en las reivindicaciones, que se regulan por aumento selectivamente por CPT-11. Pueden prepararse formulaciones que comprenden dichas mezclas terapéuticas usando procedimientos e ingredientes conocidos en la técnica, tales como los que se han analizado anteriormente. De forma análoga, se espera que las dosificaciones estén dentro de los intervalos que se han analizado anteriormente, aunque en una combinación, las dosis eficaces de los principios activos pueden ser inferiores que la dosificación para el mismo principio activo cuando se usa en solitario.

[0134] La administración "en combinación" incluye la administración en forma de una mezcla, una administración simultánea usando formulaciones separadas, y una administración consecutiva en cualquier orden.

5 **[0135]** Los procedimientos de la presente invención pueden combinarse con otras opciones de tratamiento, incluyendo procedimientos quirúrgicos, radiación y/o la administración de cualquier tipo de agente anticanceroso.

[0136] Se ilustran detalles adicionales de la invención mediante el siguiente Ejemplo.

Ejemplo

10 El tratamiento de xenoinjertos tumorales colorrectales con irinotecan (CPT-11) activa genes expresados normalmente por el epitelio de células escamosas

15 **[0137]** Este estudio se diseñó para identificar transcritos génicos expresados con precisión por adenocarcinomas colorrectales humanos tras la exposición *in vivo* al irinotecan quimioterapéutico de atención estándar. Se usaron xenoinjertos Colo205 y DLD-1 como modelos p53 de tipo natural (wt) y p53 tumoral mutante, respectivamente, y también se analizó la expresión génica mediante tejido de colon murino normal resecado de los mismos animales. Los niveles de expresión de numerosos transcritos se alteraron de forma reproducible mediante el tratamiento farmacológico de los tumores, incluyendo, pero sin limitación, los genes expresados normalmente por el epitelio de
20 células escamosas.

Materiales y Procedimientos

25 **[0138]** *Líneas celulares* - Colo205, HCT116, HT29 (ATCC N° CCL222, CCL221, CCL247, HTB38, respectivamente) son líneas celulares colorrectales de adenocarcinoma humano. 293 es una línea celular de riñón embrionario inmortalizado humano (ATCC CRL1573). PC-3 es una línea celular de adenocarcinoma de próstata humano (ATCC CRL1435) y HT1080 es una línea celular de fibrosarcoma humano (ATCC CCL-121). Se generaron las líneas celulares estables PC-3 por transfección (Effectene, Qiagen) con un vector activado por CMV que codifica una forma etiquetada de epítipo gD NH2-terminal de LY6D/E48 o un vector vacío y se seleccionan en 400 µg/ml de
30 G418 (Geneticin, Life Technologies, Inc.). Las condiciones de crecimiento se adecuaron a las directrices de la Colección de cultivos tipo Americana (ATCC (*American Type Culture Collection*), Manassas, VA). Para todas las líneas celulares, los tratamientos con CPT11 se hicieron en placas de 10 cm para los puntos de tiempo indicados. Las células se cosecharon y el ARN se preparó usando el kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania). Se realizó un análisis por PCR cuantitativo en tiempo real TaqMan® como se describe a continuación.

35 **[0139]** *Crecimiento y tratamiento de xenoinjertos tumorales humanos* - Se mantuvieron ratones hembra sin pelo (Charles River Laboratories, Hollister CA) de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio "*Care and Use of Laboratory Animals*", se cosecharon células de cáncer colorrectal humano Colo205, se suspendieron de nuevo en HBSS y se inyectaron s.c. en el costado (5×10^6 células/costado) de ratones de 6-8
40 semanas de edad. Los tumores se dejaron crecer durante dos semanas momento en el que se administraron 0,1 ml de CPT-11 (80 mg/kg de ratón) o 0,1 ml de control de solución salina por vía intraperitoneal (IP) a cada animal tres veces consecutivas a intervalos de 4 días. Veinticuatro horas después de la dosis final de CPT-11 o de solución salina, los tumores se resecaron de los animales. Cada uno de tres tumores de animales tratados con CPT-11 con masas de 0,23, 0,18 y 0,50 gramos, y tres de los controles de solución salina con masas de 0,23, 0,36 y 0,38 gramo,
45 se dividieron por la mitad. La mitad de cada tumor se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para la extracción posterior de ARN y la otra mitad se fijó en formalina tamponada neutra al 10% durante una noche, y después se transfirió 24 horas más tarde a etanol al 70% para su división por lotes, un análisis microscópico y análisis por hibridación *in situ*. Los xenoinjertos tumorales de la línea celular colorrectal DLD-1 se trataron y se prepararon básicamente de la misma manera. Las masas de los xenoinjertos de tumores colorrectales DLD-1 en el momento de
50 la resección fueron 0,24, 0,10 y 0,21 para los controles de solución salina y de 0,21, 0,1 y 0,12 para los tumores tratados con CPT-11.

55 **[0140]** Para estudios de eficacia *in vivo*, los ratones se inocularon con células Colo205, 5 millones de células/ratón, en el área del flanco dorsal derecho por vía subcutánea, en un volumen de no más de 0,2 ml.

[0141] Cuando los tumores alcanzaron un volumen tumoral medio de aproximadamente $100-200 \text{ mm}^3$, los ratones se agruparon en grupos de tratamiento de 8 a 10 ratones, para comenzar cada uno los siguientes tratamientos. A todos se les administró una inyección IV en la vena de la cola.

60 Grupos:

[0142]

Sólo vehículo (PBS) - IV, volumen de 0,1 ml, 1 vez/semana durante 4 semanas.

Sólo anti-E48-vc-MMAE - 4 mg/kg, IV, volumen de 0,1 ml, 1 vez/semana durante 4 semanas.

5 Sólo anti-IL8-vc-MMAE - 4 mg/kg, IV, volumen de 0,1 ml, 1 vez/semana durante 4 semanas.

Vehículo (PBS) + CPT-11 - IV, volumen de 0,1 ml, 1 vez/semana durante 4 semanas + CPT-11, 80 mg/kg, IP, volumen de 0,2 ml, tratamiento sólo los días 0, 4 y 8.

10 Anti-IL8-vc-MMAE + CPT-11 - 3 mg/kg, IV, volumen de 0,1 ml, 1 vez/semana durante 4 semanas + CPT-11, 80 mg/kg, IP, volumen de 0,2 ml, tratamiento sólo los días 0, 4 y 8.

Anti-E48-vc-MMAE - 3 mg/kg, IV, volumen de 0,1 ml, 1 vez/semana durante 4 semanas + CPT-11, 80 mg/kg, IP, volumen de 0,2 ml, tratamiento sólo los días 0, 4 y 8.

15 **[0143]** Los volúmenes tumorales se midieron por rasurado dos veces por semana durante una duración de 8 semanas o hasta que los tumores se ulceraron o alcanzaron un volumen de más de 1000 mm³. El volumen tumoral (mm³) se calculó como $a \times b^2 \times 0,5$, donde a y b son el diámetro largo y el corto del tumor, respectivamente.

20 **[0144]** *Preparación y análisis del ADN tumoral* - Los especímenes de xenoinjerto tumoral se homogeneizaron en 3,5 ml de tampón de lisis (tiocianato de guanidina 4 M, citrato sódico 25 mM, N-laurilsarcosina al 0,5%, 2-mercaptoetanol al 0,7%) y se estratificaron en 1,5 ml de una solución de cloruro de cesio 5,7 M, EDTA 50 mM (pH 8,0). Tras la centrifugación a 150.000 x g durante una noche, el gránulo de ARN se secó, se suspendió de nuevo en agua, se extrajo el fenol-cloroformo y se precipitó en etanol. Finalmente, el ARN se suspendió de nuevo en agua y la integridad de las preparaciones de ARN se supervisó mediante visualización del ARN ribosomal 18S y 28S sobre geles de Agarosa y se descubrió que era de buena calidad.

30 **[0145]** *Análisis de Matrices de Oligonucleótidos* - Aproximadamente 10 µg de ARN total purificado del espécimen tumoral sirvieron como material de partida para la preparación de sondas necesarias para el análisis de matrices de oligonucleótidos en el conjunto Affymetrix Human Genome U95 Gene Chip®. Las sondas se prepararon de acuerdo con los protocolos que se han descrito previamente (Wodicka y col. (1997) Nat. Biotechnol. 15: 1359-1367) y según las recomendaciones del fabricante. Después de la hibridación, las matrices se lavaron y se tiñeron con estreptavidina-ficoeritrina y después se exploraron con el escáner de matrices génicas (Agilent Technologies). Los parámetros por defecto proporcionados por el paquete de software de análisis de datos Affymetrix (Micro Analysis Suite versión 4) se emplearon en la determinación de las intensidades de señal, denominado como diferencia media. La normalización de muestras se hizo usando una escala global (como se indica en el "Expression Analysis Technical Manual" de Affymetrix) y se usó una intensidad de diana de 1500 para determinar los valores de expresión de la diferencia media. La diferencia media obtenida con las sondas obtenidas de tumores tratados con CPT-11, eran lineales en su base frente a las diferencias medias obtenidas de sondas preparadas a partir de tumores de control de solución salina para generar el valor de diferencia para cada llamada del gen. Se determinó un valor de diferencia comparando cada una de las tres muestras tratadas con CPT-11 para cada una de las tres muestras de control dando como resultado nueve valores de diferencia posibles para cada llamada del gen. La diferencia para cada una de las nueve comparaciones pareadas y una media con una desviación típica se presenta para cada conjunto de genes enumerado en la Tabla I. También se reseco tejido de colon normal de ratón de animales experimentales y de control, y el ARN extraído se sometió a análisis en un conjunto de chip Mu74Av2 de Affymetrix básicamente como se describe para los xenoinjertos tumorales humanos. Los datos de ratón presentados en la Tabla II sólo enumeran las diferencias medias y las desviaciones típicas para los genes indicados.

50 **[0146]** *PCR en Tiempo Real (TaqMan®)* - La fuente de ARN usada para el análisis por RT-PCR era la misma que la usada para la preparación de sondas para el análisis de micromatrices de oligonucleótidos. Se realizó un análisis por PCR de transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR) usando reactivos de ensayo TaqMan® de Perkin-Elmer, Applied Biosystems, 50 µl de reacciones por RT-PCR consistían en 5 µl de Tampón A 10 x TaqMan, 300 µM de cada dNTP, MgCl₂ 5 mM, 10 unidades de inhibidor de ARNasa, 12,5 unidades de Transcriptasa Inversa MuLV, 1,25 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold, una sonda de 200 nM, cebadores de 500 nM y 100 ng de ARN. Las condiciones de reacción consistían en transcripción inversa a 48 °C durante 10 minutos, desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, y 40 ciclos térmicos de 95 °C durante 25 segundos, y a 65 °C durante 1 min. Los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa al 4% (Invitrogen). La inducción para cada gen de interés se determinó usando el procedimiento $\Delta\Delta Ct$ y el resultado se presenta relativo tanto a GAPDH como a actina en cada figura. Se usaron las siguientes sondas específicas y conjuntos de cebadores para MFGE8 (Nº de Entrada U58516): cebador directo: GGTACCATGTGCCACAACTG (SEQ ID NO: 1), cebador inverso: GAGGCAACCAGGGAGACA (SEQ ID NO: 2), y sonda: CCCCTGTCCCCAAGAACAATTCC (SEQ ID NO: 3); GPC1 (Nº de Entrada X54232): cebador directo: GCT-GTCCTGAACCGACTGA (SEQ ID NO: 4), cebador inverso: GGGACGGTGATGAAAAGC (SEQ ID NO:

5), y sonda: AGCAGCACTAAGCGGCCTCCC (SEQ ID NO:6); AQP3 (Nº de Entrada N74607): cebador directo: CTGGCAGTCTCCTCCATGT (SEQ ID NO: 7), cebador inverso: CCCATCTGTGCCATAAGGA (SEQ ID NO: 8), y sonda, AAGCCCTGGAAACATA-CACACCC (SEQ ID NO: 9); CDH17 (Nº de Entrada 83228): cebador directo: CCTACTCTGCAAACCTTGGTAA (SEQ ID NO: 10), cebador inverso: TGTATGCATGGCAGGTAGTG (SEQ ID NO: 11), y sonda: AAATCTGGCCAGCTGACTGGTTCC (SEQ ID NO: 12); Ly6D/E48 (Nº de Entrada Y12642): cebador directo. GGGGATTCCACACCTCTCT (SEQ ID NO: 13); cebador inverso: CCAAGTCATCAGCATTCCAT (SEQ ID NO: 14); y sonda: CCAGACTTTCGGGGAAGCCCTC (SEQ ID NO: 15); y Ly6E/SCA-2 (Nº de Entrada U66711): cebador directo: CAGTGCATGCACTTCAA (SEQ ID NO: 16); cebador inverso: AGGACTGGCTGGATTGG (SEQ ID NO: 17); y sonda: CCTAGACCCGGAAGTGGCAGAAAC (SEQ ID NO: 18).

[0147] *Hibridación in situ* - Todas las ribosondas marcadas con ³³P de sentido contrario y de sentido directo se generaron a partir de productos PCR obtenidos a partir de bibliotecas de ADNc. Las ribosondas de sentido contrario y de sentido directo para *Periplakina* tenían 633 pb de longitud y se cebaron con los oligonucleótidos que contenían las secuencias superior 5'GACTGGACAACCTGGGATGC3' (SEQ ID NO: 19) e inferior 5'GACTCCAGCCACCAGGTTTAT3' (SEQ ID NO: 20), respectivamente. Las ribosondas de sentido contrario y de sentido directo para la *Acuaporina-3* tenían 425 pb de longitud y se cebaron con los oligonucleótidos que contenían las secuencias superior 5'CAAGCTGCCATCTACACCCT3' (SEQ ID NO: 21) e inferior 5'GCTGGCCGGTCTGTGAA3' (SEQ ID NO: 22), respectivamente. Las ribosondas de sentido contrario y de sentido directo para la *Antileucoproteinasasa* tenían 378 pb de longitud y se cebaron con los oligonucleótidos que contenían las secuencias superior 5'TGCCAGTGCCTTAGATACAA3' (SEQ ID NO: 23), e inferior 5'CCCCAAAGGATATCAGTG3' (SEQ ID NO: 24), respectivamente. Los experimentos de hibridación se realizaron como se ha descrito previamente (Holcomb y col. (2000) EMBO J. 4046-4055).

[0148] *Preparación de anticuerpos monoclonales anti-E48 e Inmunoconjugado Anti-E48-val cit-MMAE*. Se inmunizaron ratones BALB/c (Charles River Laboratories, Wilmington, DE) con proteína LY6D/E48 marcada con his8 obtenida de Baculovirus y diluida en adyuvante Ribi (Corixia; Hamilton, MT) dos veces a la semana, a través de la planta, 5 dosis. Se cultivaron linfocitos B de ganglios linfáticos de 5 ratones que mostraron altas titulaciones en suero que se condensaron con células de mieloma de ratón (X63.Ag8.653; disponibles en ATCC). Después de 10-14 días, los sobrenadantes se cribaron para la producción de anticuerpos por ensayo ELISA directo y por citometría de flujo en células PC-3 que expresan de forma estable E48 marcado con gD. Los positivos se subclonaron dos veces para conseguir monoclonalidad. Para una producción a gran escala de un anticuerpo purificado, se inyectaron i.p. células de hibridoma en ratones Balb/c cebados con pristina. Los fluidos ascíticos se agruparon y se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A (Pharmacia Fast Protein Liquid Chromatography; Pharmacia, Uppsala, Suecia).

[0149] Para la citometría de flujo, las células crecieron a una confluencia del 90% y se eliminaron de las placas usando EDTA 2 mM en PBS. Las células se lavaron, se suspendieron de nuevo en tampón FACS (PBS con BSA al 1%) y se incubaron durante 60 min con anti-anticuerpo monoclonal LY6D/E48 15A5 o 17H7 o anti-gD (Genentech, Inc.) seguido de 60 min con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con PE. El análisis se realizó en FACS scan.

[0150] El conjugado del anticuerpo anti-E48 y el anticuerpo de control anti-IL8 con MMAE se realizaron por Seattle Genetics Inc., como se describe en otras partes del presente documento (Doronina, 2003: Nat Biotechnol 21; 778-84).

Resultados

[0151] Se inocularon ratones sin pelo con células de cáncer colorrectal colo205 y se establecieron tumores durante un periodo de dos semanas. En este momento, se administraron inyecciones intraperitoneales de CPT-11 o solución salina cada cuarto día, y 24 horas después de la tercera inyección se resecaron el tumor y los tejidos normales. La masa media de los tumores en este momento fue de aproximadamente 300 mg y no diferían significativamente entre el grupo de control y el tratado con el fármaco.

[0152] Para examinar la inducción de transcritos de ARNm a nivel celular, se realizó una hibridación *in situ* en secciones obtenidas de los tumores tratados con CPT-11 o control de solución salina. Mediante tinción H&E, las células en los tumores de Colo205 y DLD-1 tratados con CPT-11 parecían ligeramente hinchadas y los núcleos agrandados en relación con los controles tratados con solución salina (Figura 7). Sin embargo, las células eran viables en gran medida con sólo un menor aumento en el número de cuerpos apoptóticos. Esto es consistente con las observaciones macroscópicas brutas que no indican disminución del volumen tumoral en el momento de la resección.

[0153] El ARN purificado de tres de los tumores de solución salina y tres de los tumores tratados con CPT-11 se sometió a análisis de micromatrices de oligonucleótidos para la expresión del transcrito. Los valores de cambio para

5 cada tumor tratado con fármaco en comparación con cada tumor de control se presentan para los 43 transcritos tip
 10 identificados como regulados por aumento en el chip U95Av2 (Tabla I). Un acuerdo del 100% indica que las 9
 comparaciones pareadas posibles puntuaron positivo para la regulación por aumento del transcrito indicado,
 mientras que el 89% indica que 8/9 comparaciones fueron positivas, y así sucesivamente. En este estudio, se centró
 en los transcritos que puntuaron positivo en al menos 6/9 comparaciones posibles. Los transcritos que
 experimentaron una regulación por aumento significativa en los tres tumores tratados con CPT-11 relativos a los
 controles, identificados y confirmados por PCR en tiempo real, incluyeron proteína de factor 8 de glóbulo de grasa de
 leche-EGF (MFGE8), Glipicano-1 (GPC1), Acuaporina-3 (AQP3), cadherina-17 (CDH17), antígeno E48 (LY6D) y el
 homólogo LY6D SCA-2 (LY6E) (figura 1A). Entre estos, LY6D/E48 mostró la inducción más consistente y fuerte y se
 seleccionó para estudios adicionales como una diana de anticuerpos potencial.

15 **[0154]** Para validar los datos de expresión por un segundo procedimiento, se escogieron 20 transcritos que
 puntuaron positivo en el chip U95Av2, y sus niveles de expresión relativa se examinaron por PCR en tiempo real
 (TaqMan) usando las mismas 6 muestras de ARN empleadas para el análisis de micromatrices. Mediante este
 procedimiento, se confirmó que los 20 transcritos estaban regulados por aumento significativamente. Aunque el
 grupo de regulación por aumento de un transcrito dado varió algo entre los dos procedimientos, la fidelidad global de
 los datos de micromatrices se soporta fuertemente por los resultados del análisis por PCR en tiempo real.

20 **[0155]** Los niveles de expresión relativa de algunos de los genes inducidos por CPT-11 se compararon en un
 análisis paralelo usando ARN extraído de los tumores Colo205 y DLD-1. A grados variables, la mayor parte de los
 genes se indujeron por tratamiento con CPT-11 de ambos tipos de tumor (figura 2). Tanto la Periplekina como la
 Antileucoproteínasa se expresaron fuertemente por los tumores DLD-1 de control, pero se indujeron por SPT-11 a un
 grado menor que el observado para los tumores Colo205. Por el contrario, el ARNm de Galectina-7 era indetectable
 tanto en tumores DLD-1 tratados como de control, pero estaba presente y se indujo por CPT-11 en el Colo205. La
 25 activación de Keratina 23 y E48 tuvo lugar en ambos tipos de tumores en respuesta a CPT-11, pero estos dos
 transcritos eran aproximadamente 100 veces inferiores en los tumores de control DLD-1 con respecto a los tumores
 de control Colo205. Neuromedina U, Anexina VIII, Transglutaminasa, Acuaporina-3 y Maspina se indujeron por SPT-
 11 y se expresaron a niveles comparables en los tumores Colo205 y DLD-1.

30 **[0156]** Los resultados de la hibridación *in situ* demuestran que los genes regulados por aumento por CPT-11 se
 expresan por las células tumorales humanas y no por células estromales murinas que podrían infiltrar
 potencialmente los xenoinjertos tumorales. Además, en las células Colo205 y DLD-1 tratadas *in vitro* con CPT-11, de
 nuevo, se observó la regulación por aumento de algunos de los genes enumerados en la Tabla I (datos no
 mostrados). Como se ha apreciado anteriormente, entre los genes que muestran una fuerte respuesta a CPT-11 *in*
 35 *vitro* estaba el que codificaba el antígeno LY6D/E48. Se ha indicado que este antígeno se regula por aumento en los
 cánceres de cabeza y cuello y se ha propuesto como una diana para una terapia basada en anticuerpos en esta
 enfermedad (Brankenhoff y col. (1995) Cancer Immunol. Immunother. 40: 191-200).

40 **[0157]** Para determinar si la inducción de LY6D/E48 por CPT-11 era autónoma celular, se midieron los niveles del
 transcrito LY6D/E48 en células Colo205 cultivadas tras la adición de CPT-11 10 μ M. Esta concentración
 relativamente alta de fármaco se requiere *in vitro* debido a la conversión ineficaz de CPT-11 por carboxilesterasas en
 el resto SN-38 más activo (Oosterhoff y col., Mol Cancer Ther. 2: 765-71 (2003)). El transcrito LY6D/E48 se elevó 24
 horas después del tratamiento con una mejora adicional por 48 horas (figura 1B). Era posible que Colo205 fuera una
 línea celular inusualmente sensible con respecto a la activación de LY6D/E48 por CPT-11. Por lo tanto, se
 45 investigaron líneas celulares adicionales. El transcrito LY6D/E48 no puede detectarse en ausencia o presencia de
 CPT-11 en la célula PC3 de cáncer de próstata humano ni en la línea celular de riñón embrionario humano 293. Sin
 embargo, además de la Colo205, tres líneas celulares de cáncer colorrectal, DLD-1, HCT116 y HT29, y la línea
 celular de fibrosarcoma HT1080, expresaron en exceso ARNm LY6D/E48 en respuesta a CPT-11 (figura 1C).

50 **[0158]** Una suposición crítica en la determinación de las proteínas de la superficie celular tumoral inducida por
 productos quimioterapéuticos es que el fármaco no inducirá tampoco la diana en el tejido normal. Para examinar
 esto, se reseco intestino normal de los ratones con tumores a los que se les administró CPT-11 o control de solución
 salina y se realizó un análisis de micromatrices de oligonucleótidos en chips específicos de ratón.

55 **[0159]** Se realizó un análisis por PCR en tiempo real con cebadores específicos para transcritos de ratón
 correspondientes y, con las excepciones de SPRR3 y Acuaporina-3, todos los homólogos de ratón se detectaron
 fácilmente en el ARN de colon de ratón. Sin embargo, no se detectó diferencia en la expresión de estos genes
 cuando el tejido de colon normal de ratones tratados con CPT-11 se comparó con el del grupo de control (datos no
 mostrados). Para identificar cualquier ratón que experimentó cambios significativos en la expresión en respuesta a
 60 CPT-11, se realizó un análisis de micromatrices de oligonucleótidos usando la matriz de oligonucleótidos específica
 de ratón Mu74Av2. El tratamiento de animales con CPT-11 dio como resultado la activación de un pequeño número
 de genes en el colon, pero no se relacionaban con la mayor parte de los inducidos en los xenoinjertos tumorales

humanos (Tabla II). Muchos de los genes inducidos en colon normal reflejan probablemente una respuesta inmunológica aguda a la lesión tisular. Por ejemplo, los transcritos de cadena variable de Ig son altamente específicos de células linfoides y probablemente emanan de células inmunes presentes en el intestino. Se ha descubierto adicionalmente que algunos de los genes de criptidina, que se expresan por células intestinales de paneth con el propósito de una defensa microbiana (Ayabe y col. (2002) J. Biol. Chem. 277: 5219-5228), se activaron en dos de los tres animales tratados con CPT-11. Estos resultados sugieren que las células de tumor colorrectal y las células de colon normales responden de forma muy diferente a los agentes que dañan el ADN.

[0160] Análisis más detallados han mostrado que, aparte de la metalotioneína (MT1G), ninguno de los transcritos que se indujeron en los tumores por CPT-11, se indujeron en el intestino normal de ratón (figura 2, Tablas I y II). El análisis adicional de transcritos de ratón individuales por PCR en tiempo real también son coherentes con esta falta de respuesta (datos no mostrados). De forma sorprendente, el intestino normal de ratón era bastante refractario a los cambios en la expresión génica en respuesta al tratamiento con CPT-11, según lo evidenciado por una representación de matriz bidimensional de solución salina frente a CPT-11 para la totalidad de un chip del gen Mu74A (figura 8). Sin embargo, una prueba de estrés fisiológico era evidente a partir de los genes que se indujeron según codificaban en gran medida las proteínas involucradas en la desintoxicación (citocromo p450, metalotioneína), la defensa microbiana (defensinas) y las respuestas inmunológicas (inmunoglobulinas) (Tabla II).

[0161] Para obtener anticuerpo monoclonales para LY6D/E48, los ratones se inmunizaron con proteína recombinante purificada. Se identificaron hibridomas que producían inmunoglobulinas con fuerte reactividad a células transfectadas que expresaban LY6D/E48. Cuando se expusieron células Colo205 a concentraciones en aumento de CPT-11 *in vitro*, la intensidad de la señal medida por clasificación de célula activada por fluorescencia aumento de una forma dependiente de la dosis (figura 4B). Además, la intensidad de señal y el porcentaje de células reactivas observado por microscopía inmunofluorescente de células intactas aumento con la dosificación de la dosis (figura 4A).

[0162] Para determinar si la inducción del gen que codifica la proteína de la superficie celular puede aprovecharse en una terapia del cáncer dirigida, se ensayaron los efectos de un anticuerpo monoclonal LY6D/E48 conjugado con fármaco en el crecimiento tumoral. Se inocularon células Colo205 en ratones sin pelo, y se administró CPT-11 cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 200 mm³. CPT-11 se administró en solitario o en combinación con anti-LY6D/E48-vc-MMAE o como un control negativo, anti-IL8-vc-MMAE. Aunque CPT-11 redujo de forma transitoria en solitario la velocidad del crecimiento tumoral, tuvo lugar un rebrote a rápida velocidad tras la última administración. Sin embargo, en combinación con anti-LY6D/E48-vc-MMAE, pero no con anti-IL8-vc-MMAE, el crecimiento tumoral se retrasó durante un periodo de tiempo significativamente mayor (figura 5, figura 6A). En los animales que recibieron CPT-11 más el conjugado anti-LY6D/E48-vc-MMAE, 6 de 8 mostraron respuestas completas con una masa tumoral mínima en el resto de los animales en 8 semanas. El conjugado anti-LY6D/E48-vc-MMAE no mostró ninguna actividad antitumoral con respecto al vehículo o el conjugado MAb de control en ausencia de la coadministración de CPT-11 (figura 6B). Estos resultados indican una actividad sinérgica entre CPT-11 y el conjugado anticuerpo-fármaco dirigido contra un agente inducido por CPT-11.

Análisis

[0163] Los regímenes quimioterapéuticos actuales para el cáncer colorrectal implican la administración concomitante de antimetabolitos y agentes dañinos para el ADN que producen errores en la replicación de ADN (Tebbutt y col. (2002) Eur. J. Cancer 38: 1000-1015). El índice terapéutico de estos fármacos probablemente se refiere al aumento de la velocidad relativa de la proliferación de células cancerosas y puede que a la capacidad deteriorada de las células cancerosas para corregir o eliminar el daño. La respuesta de los tumores a estos fármacos varía ampliamente y tumores resistentes a los fármacos surgen con frecuencia tras su administración. Disponer de un entendimiento detallado de la manera en que las células tumorales responden a los agentes quimioterapéuticos ayudaría en el desarrollo de terapias más eficaces. Sin embargo, la supervisión de la respuesta al tratamiento farmacológico a nivel de la expresión génica es difícil, ya que las muestras de tumor de pacientes tratados recientemente no se obtienen fácilmente. En los experimentos presentados en este Ejemplo, las circunstancias clínicas se han dado de forma aproximada desarrollando tumores humanos en ratones y evaluando cambios en la expresión génica que se producen poco después del tratamiento farmacológico. Un hallazgo sustancial de estos estudios es que ciertos tumores colorrectales, particularmente aquellos con p53 de tipo natural, inician un programa de expresión génica fuerte que se asemeja al que se desprende de las células epiteliales escamosas.

[0164] El experimento que se presenta aquí se diseñó para identificar genes que se activaron con precisión CPT-11 antes del inicio de las respuestas más dramáticas al fármaco, como se determina por los cambios en el volumen tumoral. En el momento de la resección del tumor, las células tumorales parecían en gran medida viables y los volúmenes de los tumores no se redujeron con respecto a los controles tratados con solución salina.

[0165] Las alteraciones específicas en la expresión génica que se observaron en los xenoinjertos tumorales de

5 colon en respuesta a la CPT-11 no se observaron en el colon normal de ratón. La exposición al fármaco tuvo lugar probablemente en este tejido ya que eran evidentes cambios apreciables en la expresión génica en los animales tratados con CPT-11. Los resultados sugieren que el tejido de colon normal se protege contra las respuestas radicales a ataques genotóxicos, mientras que las células cancerosas experimentan respuestas dramáticas y rápidas a nivel de la inducción génica. La explotación de la respuesta diferencial entre las células normales y las células cancerosas para un producto terapéutico primario puede aprovecharse para proporcionar terapias de combinación novedosas con eficacia mejorada. En particular, se espera que la terapia de combinación con un fármaco quimioterapéutico primario y un antagonista de un gen inducido diferencialmente en las células cancerosas como resultado del tratamiento con el fármaco quimioterapéutico primario mejore la eficacia del tratamiento contra el 10 cáncer. Así, por ejemplo, los anticuerpos o pequeñas moléculas dirigidas a dianas inducidas selectivamente en las células cancerosas por los productos terapéuticos primarios mantiene la promesa de mejorar el índice terapéutico de la combinación de fármacos.

15 **[0166]** En un aspecto particular, los resultados presentados en el presente documento demuestran que LY6D/E48, que se regula por aumento habitualmente en una diversidad de líneas celulares cancerosas en respuesta a CPT-11, es una diana eficaz para un inmunoc conjugado cuando se usa con el fármaco inductor.

Tabla I. Genes regulados por aumento por tratamiento de xenoinjertos tumorales Colo205 con CPT-11

ID de la sonda Affy	C N° 1		C N° 2		C N° 3		Cambio Med.	DT	% DE ACEPTACIÓN	N° de Entrada/Descripción					
	S N° 1ª	S N° 2	S N° 1	S N° 2	S N° 1	S N° 2									
39230_at	8	9,6	13,6	9,2	10,4	16,4	17,3	19,3	28,7	3	28,7	15	7	100	AL022318/Forbolina 3
36284_at	12	10,1	7,9	14	12	7,9	13	12	8,2	12	8,2	11	2	100	Y12642/E48
38608_at	7,9	7,8	7,5	6,7	6,8	8	11,9	12	11,2	12	11,2	9	2	100	AA010777/galectina-7
38388_at	4,7	5,9	4,9	6	6,8	6	6,2	7,7	6,4	6	6,4	6	1	100	M11810/(2-5) oligoA sintetasa E
926_at	7,8	5,1	5,8	7,1	5	6,6	5,5	3,3	4,6	6	4,6	6	1	100	J03910/metalotioneina-IG (MT1G)
36890_at	5,2	2,5	3,5	7,7	3,8	5,1	9,9	4,8	7,6	6	7,6	6	2	100	AF001691/Periplakina
915_at	4,4	5,9	4,4	5,3	7,1	5,3	4,5	6	4,5	5	4,5	5	1	100	M24594/Proteína 56 Kd inducible por Interferón Humano
39545_at	6,9	4	4,2	7,2	4,1	4,4	7,2	4,1	4,4	5	4,4	5	1	100	U22398/p57KIP2 del inhibidor Cdk
34823_at	4,5	3	3,3	5,2	3,4	4,7	6,1	4	4,5	4	4,5	4	1	100	X60708/dipeptidil peptidasa IV
1358_s_at	3,6	3,9	3,6	4,9	5,3	4,9	3,8	4,1	3,8	4	3,8	4	1	100	U22970/Péptido inducible por interferón Humano (6-16)
40031_at	1,8	3,6	4,1	2,1	4,4	4,9	2,6	6,9	7,3	4	7,3	4	2	100	M74542/aldehído deshidrogenasa de tipo III
37014_at	2	3,6	7,3	2,1	3,9	7,9	1,8	3,3	5,3	4	5,3	4	2	100	M33882/proteína p78 (MxA)
32275_at	2,5	2,3	4,7	2,6	2,4	5	3,8	3,5	8,1	4	8,1	4	2	100	X04470/antileucoproteasa
34965_at	3,2	3	2,6	3,9	3,7	3,2	4,5	4,2	3,6	4	3,6	4	1	100	AF031824/leucocistatina
36922_at	5,2	3	4	4,1	2,5	3,3	3,6	2,2	3	3	3	3	1	100	X59618/ribonucleótido reductasa de unidad pequeña
577_at	3,3	3,6	3,7	3,1	3,3	3,5	2,9	3,2	3,3	3	3,3	3	0	100	M94250/factor inducible de ácido retinoico (MK)
1787_at	4,4	3,3	2,8	3,7	3	2,6	4	2,8	2,4	3	2,4	3	1	100	U22398/p57KIP2 Cdk-Inhibidor
32814_at	3,3	2,9	2,9	3,9	3,5	3,4	2,7	2,4	2,3	3	2,3	3	1	100	M24594/proteína 56 Kd inducible por interferón (IFIT1)
33338_at	2,7	2,9	4,2	2,5	2,6	3,8	2	2,1	3,2	3	3,2	3	1	100	M97936/Factor de transcripción ISGF-3 (STAT1)
36780_at	3,6	2,7	2,8	3,2	2,4	2,5	3,2	2,4	2,5	3	2,5	3	0	100	M25915/Inhibidor citosis complementaria (CLI)
39119_s_at	1,6	2,6	2,4	2,4	4	3,7	1,9	3,2	2,9	3	2,9	3	1	100	AA631972/Transcrito célula asesina natural 4

38389_at	1,9	2,5	2,2	2,5	3,3	2,9	2,2	2,9	2,5	3	0	100	X04371/2-5A sintetasa inducida por interferón
39331_at	2,2	2,1	2,1	2	1,9	1,9	2,8	1,9	2,7	2	0	100	X79535/beta tubulina
37420_i_at	2	2,7	2	1,8	2,4	1,8	2,1	1,8	2,8	2	2	100	AL022723/MHC, clase I, F (CDA12)
1375_s_at	2	1,9	2,2	2,2	2,1	2,4	2,1	2,1	1,9	2	0	100	M32304/TIMP2
39677_at	1,9	2,1	2	2	2,2	2	2,1	2	2,3	2	0	100	D80008/KIAA0186
296_at	1,8	1,8	1,9	1,9	1,9	2	2,1	2	2,1	2	0	100	X79535/Tubulina, Beta
770_at	7,6	8	2,9	7,3	8,1	3,4	6,3	6,1	6,5	6	2	100	D00632/glutation peroxidasa
39248_at	5,8	7,9	8,1	7	5,8	5,9	3,9	5,5	5,6	6	1	100	N74607/Acuaporina-3
38673_s_at	3,6	3,8	3,8	5,1	3,4	5,6	5	2,8	5	4	1	89	D64137/p57KIP2
38124_at	3,8	3,7	3,6	3,7	3,7	3,7	3,7	3,6	3,5	4	0	89	X55110/proteina promotora del crecimiento de neurito (midkina)
34363_at	2,1	1,5	1,5	3,1	2,8	2,7	5,4	4,9	4	3	1	89	Z11793/selenoproteina P
39263_at	2,3	4,1	3,8	2,3	4	3,7		2,8	2,6	3	1	89	M87434/oligo A sintetasa (p692-5A sintetasa)
425_at		2,3	2,5	2,1	2,7	3	2,1	2,8	3	3	0	89	X67325/Proteina 27 inducible por Interferón alfa
32106_at		2	1,7	2,6	3	2,5	2,6	3	2,4	2	0	89	L28101/kalostatina (PI4)
37954_at	4,7			6,2	5,2	5,4	9,5	7,8	7,4	7	2	78	X16662/Anexina VIII
34403_at	4,6	2,3	1,8	12	5,8	4,6	10,6			6	6	78	1158516/antígeno epitelial de mama BA46
33399_at	5,5	3,4	3	4,4			7,1	3,6	3,7	4	1	78	AA142942/Proteina ribosomal S6
35099_at	4,8	4,1	4,1	3,4		3,6	5	3,1	4,1	4	1	78	AF019225/apolipoproteina L
608_at			3	2,9	3,1	3,9	4,4	4,8	4,7	4	1	78	M12529/Apolipoproteina E humana
37039_at	3,4	4	3		3,5		4,1	4,9	3,5	4	1	78	J00194/cadena antígeno alfa hla-dr humano
38432_at	1,6	3	5,2			5,5	1,8	3,4	5,7	4	2	78	AA203213/Proteina 15 estimulada por Interferón
879_at	2,6	3,3	3,5		4,3	4,2		4,1	3,5	4	1	78	M30818/(MXB) inducido por interferón

^aCada tumor tratado con CPT-11 (C) se comparó con cada tumor tratado con solución salina (S) para generar un aumento.

Tabla II. Genes regulados por aumento en colon de ratón por CPT-11.

ID de Sonda AFFY	% de ACEPTACIÓN	Cambio Med. a	Entrada/Descripción
92202_g_at	100,00	2,25	AI553024/PLZF, ZNF145
93996_at	100,00	1,93	X01026/citocromo P450 2e1
93573_at	100,00	1,68	V00835/Metalotioneína 1
102155_f_at	88,89	3,82	K03461/Cadena ligera kappa Ig
160841_at	88,89	2,07	AW047343/Promotor BP de albúmina del sitio D
94516_f_at	88,89	1,58	M55181/Preproencefalina 2
99369_f_at	77,78	6,73	AF029261/ Cadena ligera kappa Ig (Vk10c)
102154_f_at	77,78	5,64	M13284/región V de cadena kappa activa de Ig de ratón (V139-J1)
102157_f_at	77,78	4,48	M15520/V-kappa10-Ars-A de Ig de ratón
99405_at	77,78	4,38	U30241/hibridoma de ARNm de cadena kappa Ig 84.15
101720_f_at	77,78	4,15	U30629/hibridoma de ARNm de cadena kappa Ig 84.20
98765_f_at	77,78	1,98	U23095/clon de cadena pesada de CB17 SCID Ig 58-92
101561_at	77,78	1,72	K02236/Metalotioneína 2
104451_at	77,78	1,68	AI852578/est
160117_at	77,78	1,64	AI850638/est
103294_at	77,78	1,54	U67188/regulador RGS5 de señalización de proteína G
95766_f_at	66,67	9,90	U03066/criptidina-16 (Defcr16)
100351_f_at	66,67	9,57	U02997/criptidina-2 (Defcr2)
93879_f_at	66,67	9,49	U02999/criptidina-3 (Defcr3)
92812_f_at	66,67	9,13	U02995/Péptido de criptidina relacionado con defensina
99551_f_at	66,67	7,01	U12560/gen 5 criptidina
102814_f_at	66,67	6,76	M33226/Secuencia relacionada con defensina
93863_f_at	66,67	6,64	U03003/criptidina-6 (Defcr6)
101794_f_at	66,67	3,96	U12562/Gen i criptidina
100360_f_at	66,67	3,11	X02466/gen N17 de V(H)II de Ig de línea germinal
103654_at	66,67	2,84	AB018374/GARP45
102016_at	66,67	2,38	M61737/ARNm específico de adipocito
93213_at	66,67	2,05	AB007986/ScFv de anticuerpo monocatenario
93294_at	66,67	2,01	M70642/Proteína secretada inducible por fibroblasto
95611_at	66,67	1,89	AA726364/est
99959_at	66,67	1,76	AW061337/est
93619_at	66,67	1,75	AF022992/Homólogo Periodo (Drosophila)
100144_at	66,67	1,69	X07699/Nucleolina
98084_at	66,67	1,66	AI849834/est
99965_at	66,67	1,63	D31969/Receptor Vitamina D
104154_at	66,67	1,61	AB021961/p53
96854_at	66,67	1,60	AJ010391/gen copa
94688_at	66,67	1,60	X83106/Proteína dimerización Max
160378_at	66,67	1,58	AI853127/est
93836_at	66,67	1,56	AF041054/E1B 19K/(Nip3)
99076_at	66,67	1,54	U09504/Receptor alfa hormona tiroideos
103275_at	66,67	1,51	U13836/adenosina trifosfatasa Ac116 vacuolar
160088_at	66,67	1,51	U90535/monooxigenasa 5 que contiene flavina (FMO5)

^a Aumento medio de la comparación de 3 ratones tratados con cpt-11 con respecto a 3 ratones tratados con solución salina.

LISTA DE SECUENCIAS

[0167]

5 <110> Polakis, Paul Genentech, Inc,
 <120> Tratamiento de Tumor
 <130> 39766-0150PCT
 10 <140> No asignado
 <141> 17/06/2005
 <150> 60/580.745
 15 <151> 18/06/2004
 <160> 24
 <170> FastSEQ para windows, versión 4.0
 20 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 25 <220>
 <223> cebador directo
 <400> 1
 30 ggtaccatgt gccacaactg 20
 <210> 2
 <211> 18
 35 <212> ADN
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> cebador inverso
 40 <400> 2
 gaggcaacca gggagaca 18
 45 <210> 3
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 50 <220>
 <223> sonda
 <400> 3
 55 ccctgtccc caagaacct tcc 23
 <210> 4
 <211> 19
 <212> ADN

<213> desconocido
 <220>
 <223> cebador directo
 5 <400> 4
 gctgtcctga accgactga 19
 10 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 15 <220>
 <223> cebador inverso
 <400> 5
 20 gggacggtga tgaaaagc 18
 <210> 6
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> sonda
 30 <400> 6
 agcagcacta agcggcctcc c 21
 35 <210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> cebador directo
 40 <220>
 <223> cebador directo
 <400> 7
 45 ctggcagctc ctccatgt 18
 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 50 <213> Desconocido
 <220>
 <223> cebador inverso
 55 <400> 8
 cccatctgtg ccataagga 19
 <210> 9

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 5 <220>
 <223> sonda
 <400> 9
 10 aagccctgga aacatacaca ccc 23
 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Desconocido
 <220>
 <223> cebador directo
 20 <400> 10
 cctactctgc aaaccttgg aa 22
 <210> 11
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 <220>
 30 <223> cebador inverso
 <400> 11
 tgtatgcatg gcaggtagtg 20
 35 <210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 40 <220>
 <223> sonda
 <400> 12
 45 aaatctggcc agctgactgg ttcc 24
 <210> 13
 <211> 19
 50 <212> ADN
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> cebador directo
 55 <400> 13
 ggggattcca cacctctct 19

<210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 5
 <220>
 <223> cebador inverso

 <400> 14
 10 ccaagtcatc agcattccat 20

 <210> 15
 <211> 22
 15 <212> ADN
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> sonda
 20
 <400> 15

 ccagactttc ggggaagccc tc 22

 25 <210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Desconocido

 30 <220>
 <223> cebador directo

 <400> 16

 35 cagctgcatg cacttcaa 18

 <210> 17
 <211> 18
 <212> ADN
 40 <213> Desconocido

 <220>
 <223> cebador inverso

 45 <400> 17

 aggactggct ggattgg 18

 <210> 18
 50 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Desconocido

 <220>
 55 <223> sonda

 <400> 18

 cctagaccgg gaagtgccag aaac 24

<210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 5 <213> Desconocido

 <220>
 <223> cebador superior

 10 <400> 19

 gactggacaa ctgggatgc 19

 <210> 20
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Desconocido

 <220>
 20 <223> cebador inferior

 <400> 20

 gactccagcc accaggtta t 21
 25
 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 30
 <220>
 <223> cebador superior

 <400> 21
 35
 caagctgccc atctacacc t 21

 <210> 22
 <211> 16
 40 <212> ADN
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> cebador inferior
 45
 <400> 22

 gctggccggt cgtgaa 16

 50 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Desconocido

 55 <220>
 <223> cebador superior

 <400> 23

tgcccagtc ctagataca a 21
<210> 24
<211> 18
5 <212> ADN
<213> desconocido

<220>
<223> cebador inferior
10
<400> 24

ccccaagga ttcagtg 18

REIVINDICACIONES

1. Una sustancia para su uso en un procedimiento de tratamiento de un tumor, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto diagnosticado con dicho tumor una cantidad eficaz de camptotecina-11 (CPT-11, irinotecan) y un antagonista de un producto génico codificado por un gen cuya expresión se ha determinado que se regula por aumento de forma selectiva en dicho tumor con respecto a las células normales correspondientes por CPT-11, en el que la sustancia es CPT-11, y en el que el gen se selecciona entre el grupo que consiste en LY6D/E48 (Nº de Entrada Y12642); galectina-7 (Nº de Entrada AA010777); periplakina (Nº de Entrada AF001691); antileucoproteinasas (Nº de Entrada X04470); acuaporina (Nº de Entrada N74607); anexina 8 (Nº de Entrada X16662); neuromedina U (Nº de Entrada X76029); maspina (Nº de Entrada U04313); acuaporina 3 (Nº de Entrada AA630981); keratina 23 (Nº de Entrada AI961431); est (Nº de Entrada AI769930); SPRR3 (Nº de Entrada AI278521); proteína del tipo S100 (Nº de Entrada AI963434); keratina 10; keratina 1; proteína asociada a la diferenciación de queratinocitos; GSPT2; plakofilina; lorricrina; est GB AI739528; keratina 14; est GB W73855; profilagrina; C4.4a; desmocolina 3; keratina 5; LY6D/E48; sulfotransferasa HNK-1; maspina; clúster de Unigene Hs.201446; proteína asociada a un grupo D de ataxia-telangiectasia; y anexina VIII.
2. Una sustancia para su uso en un procedimiento de tratamiento de un tumor, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto diagnosticado con dicho tumor una cantidad eficaz de camptotecina-11 (CPT-11, irinotecan) y un antagonista de un producto génico codificado por un gen cuya expresión se ha determinado que se regula por aumento de forma selectiva en dicho tumor con respecto a las células normales correspondientes por CPT-11, en el que la sustancia es dicho antagonista, y en el que el gen se selecciona entre el grupo que consiste en LY6D/E48 (Nº de Entrada Y12642); galectina-7 (Nº de Entrada AA010777); periplakina (Nº de Entrada AF001691); antileucoproteinasas (Nº de Entrada X04470); acuaporina (Nº de Entrada N74607); anexina 8 (Nº de Entrada X16662); neuromedina U (Nº de Entrada X76029); maspina (Nº de Entrada U04313); acuaporina 3 (Nº de Entrada AA630981); keratina 23 (Nº de Entrada AI961431); est (Nº de Entrada AI769930); SPRR3 (Nº de Entrada AI278521); proteína del tipo S100 (Nº de Entrada AI963434); keratina 10; keratina 1; proteína asociada a la diferenciación de queratinocitos; GSPT2; plakofilina; lorricrina; est GB AI739528; keratina 14; est GB W73855; profilagrina; C4.4a; desmocolina 3; keratina 5; LY6D/E48; sulfotransferasa HNK-1; maspina; clúster de Unigene Hs.201446; proteína asociada a un grupo D de ataxia-telangiectasia; y anexina VIII.
3. Una combinación de sustancias para su uso en un procedimiento de tratamiento de un tumor, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto diagnosticado con dicho tumor una cantidad eficaz de camptotecina-11 (CPT-11, irinotecan) y un antagonista de un producto génico codificado por un gen cuya expresión se ha determinado que se regula por aumento de forma selectiva en dicho tumor con respecto a las células normales correspondientes por CPT-11, en el que la combinación de sustancias es una combinación de CPT-11 y dicho antagonista, y en el que el gen se selecciona entre el grupo que consiste en LY6D/E48 (Nº de Entrada Y12642); galectina-7 (Nº de Entrada AA010777); periplakina (Nº de Entrada AF001691); antileucoproteinasas (Nº de Entrada X04470); acuaporina (Nº de Entrada N74607); anexina 8 (Nº de Entrada X16662); neuromedina U (Nº de Entrada X76029); maspina (Nº de Entrada U04313); acuaporina 3 (Nº de Entrada AA630981); keratina 23 (Nº de Entrada AI961431); est (Nº de Entrada AI769930); SPRR3 (Nº de Entrada AI278521); proteína del tipo S100 (Nº de Entrada AI963434); keratina 10; keratina 1; proteína asociada a la diferenciación de queratinocitos; GSPT2; plakofilina; lorricrina; est GB AI739528; keratina 14; est GB W73855; profilagrina; C4.4a; desmocolina 3; keratina 5; LY6D/E48; sulfotransferasa HNK-1; maspina; clúster de Unigene Hs.201446; proteína asociada a un grupo D de ataxia-telangiectasia; y anexina VIII.
4. La sustancia para su uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o la combinación para su uso de la reivindicación 3, en la que el tumor es un cáncer.
5. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 4, en la que dicho sujeto es un ser humano.
6. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 5, en la que dicho cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma, cáncer de cerebro y cáncer de piel.
7. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 6, en la que dicho cáncer es cáncer de pulmón.

8. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 6, en la que dicho cáncer es cáncer de mama.
- 5 9. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 6, en la que dicho cáncer es cáncer colorrectal.
10. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 9, en la que dicho cáncer colorrectal es adenocarcinoma.
- 10 11. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 10, en la que dicho cáncer de colon es adenocarcinoma metastásico.
12. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 6, en la que dicho cáncer es carcinoma
15 de células escamosas.
13. La sustancia o combinación para su uso de cualquier reivindicación anterior, en la que el antagonista se selecciona entre el grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, inmunoconjugados, péptidos, moléculas orgánicas pequeñas no peptídicas, moléculas antisentido y señuelos oligonucleotídicos.
- 20 14. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 13, en la que el antagonista se une a dicho producto génico.
15. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 14, en la que el antagonista es un
25 anticuerpo.
16. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 14, en la que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpos.
- 30 17. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 13, en la que el fragmento de anticuerpos se selecciona entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, fragmentos Fv, dímeros, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.
- 35 18. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 13, en la que el antagonista es un inmunoconjugado.
19. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 18, en la que el antagonista es un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo monoclonal LY6D/E48.
- 40 20. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 19, en la que el inmunoconjugado es un inmunoconjugado LY6D/E48-MMAE.
21. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 15, en la que el anticuerpo está
45 humanizado.
22. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 15, en la que el anticuerpo es humano.
23. La sustancia o combinación para su uso de cualquier reivindicación anterior, en la que el gen regulado
50 por aumento por CPT-11 se selecciona entre el grupo que consiste en LY6D/E48 (Nº de Entrada Y12642); galectina-7 (Nº de Entrada AA010777); periplakina (Nº de Entrada AF001691); maspina (Nº de Entrada U04313); y acuaporina 3 (Nº de Entrada AA630981).
24. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 23, en la que el gen regulado por
55 aumento por CPT-11 es LY6D/E48 (Nº de Entrada Y12642) o galectina-7 (Nº de Entrada AA010777).
25. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 24, en la que el gen regulado por aumento por CPT-11 es LY6D/E48 y el antagonista es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpos o un inmunoconjugado anti-LY6D/E48.

26. La sustancia para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o la combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el procedimiento sirve para inhibir la proliferación de células tumorales y comprende: (a) confirmar la presencia de al menos uno de dicho gen que está regulado por aumento selectivamente en dichas células tumorales con respecto a las células normales por CPT-11; y (b) tratar dichas células tumorales con CPT-11 y dicho antagonista.
27. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 26, en la que dichas células tumorales son las de un tumor sólido.
28. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 27, en la que dicho tumor sólido es un cáncer.
29. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 28, en la que dicho cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma y cáncer de cerebro.
30. La sustancia o combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en la que dicho antagonista es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpos o un inmunoconjugado.
31. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 30, en la que dicho tratamiento es conjunto.
32. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 30, en la que dicho tratamiento es consecutivo.
33. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 30, en la que dichas células se tratan en primer lugar con CPT-11 seguido de tratamiento con dicho anticuerpo, un fragmento de anticuerpos o un inmunoconjugado.
34. La sustancia o combinación para su uso de la reivindicación 30, en la que el tratamiento con CPT-11 continua conjuntamente con el tratamiento con dicho anticuerpo, un fragmento de anticuerpos o un inmunoconjugado.
35. Un procedimiento *ex vivo* para inhibir la proliferación de células tumorales que comprende: (a) confirmar la presencia de al menos un gen que está regulado por aumento selectivamente en dichas células tumorales con respecto a las células normales por CPT-11; y (b) tratar dichas células tumorales con CPT-11 y un antagonista de al menos uno de dichos genes, en la que dicho al menos un gen se selecciona entre el grupo que consiste en LY6D/E48/ (Nº de Entrada Y12642); galectina-7 (Nº de Entrada AA010777); periplakina (Nº de Entrada AF001691); antileucoproteínasa (Nº de Entrada X04470); acuaporina (Nº de Entrada N74607); anexina 8 (Nº de Entrada XI 6662); neuromedina U (Nº de Entrada X76029); maspina (Nº de Entrada U04313); acuaporina 3 (Nº de Entrada AA630981); keratina 23 (Nº de Entrada AI961431); est (Nº de Entrada AI769930); SPRR3 (Nº de Entrada AI278521); proteína del tipo S100 (Nº de Entrada AI963434); keratina 10; keratina 1; proteína asociada a la diferenciación de queratinocitos; GSPT2; plakofilina; loricrina; est GB AI739528; keratina 14; est GB W73855; profilagrina; C4.4a; desmocolina 3; keratina 5; LY6D/E48; sulfotransferasa HNK-1; maspina; clúster de Unigene Hs.201446; proteína asociada a un grupo D de ataxia-telangiectasia; y anexina VIII.
36. El procedimiento de la reivindicación 35, en el que el tumor, el antagonista y el tratamiento son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 34.
37. Una composición terapéutica que comprende una cantidad eficaz de CPT-11 y un antagonista de un producto génico codificado por un gen cuya expresión se regula por aumento en las células tumorales con respecto a las células normales correspondientes por CPT-11, en el que el gen se selecciona entre el grupo que consiste en LY6D/E48 (Nº de Entrada Y12642); galectina-7 (Nº de Entrada AA010777); periplakina (Nº de Entrada AF001691); antileucoproteínasa (Nº de Entrada X04470); acuaporina (Nº de Entrada N74607); anexina 8 (Nº de Entrada XI 6662); neuromedina U (Nº de Entrada X76029); maspina (Nº de Entrada U04313); acuaporina 3 (Nº de Entrada AA630981); keratina 23 (Nº de Entrada AI961431); est (Nº de Entrada AI769930); SPRR3 (Nº de Entrada AI278521); proteína del tipo S100 (Nº de Entrada AI963434); keratina 10; keratina 1; proteína asociada a la diferenciación de

queratinocitos; GSPT2; plakofilina; lorricrina; est GB AI739528; keratina 14; est GB W73855; profilagrina; C4.4a; desmocolina 3; keratina 5; LY6D/E48; sulfotransferasa HNK-1; maspina; clúster de Unigene Hs.201446; proteína asociada a un grupo D de ataxia-telangiectasia; y anexina VIII.

- 5 38. La composición de la reivindicación 37, en la que dicho tumor es cáncer colorrectal.
39. La composición de la reivindicación 38, en la que dicho tumor es adenocarcinoma colorrectal.
40. La composición de la reivindicación 39, en la que dicho gen se selecciona entre el grupo que consiste
10 en LY6D/E48 (Nº de Entrada Y12642); galectina-7 (Nº de Entrada AA010777); periplakina (Nº de Entrada AF001691); maspina (Nº de Entrada U04313); y acuaporina 3 (Nº de Entrada AA630981).
41. La composición de la reivindicación 40, en la que dicho antagonista es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpos o un inmunoconjugado.
15
42. La composición de la reivindicación 40, en la que dicho antagonista es una molécula pequeña no peptídica.
43. Un procedimiento de pronóstico, que comprende: (a) determinar *ex vivo* el nivel de expresión de uno o
20 más genes seleccionados entre el grupo que consiste en LY6D/E48 (Nº de Entrada Y12642); galectina-7 (Nº de Entrada AA010777); periplakina (Nº de Entrada AF001691); maspina (Nº de Entrada U04313); y acuaporina 3 (Nº de Entrada AA630981), o su producto de expresión, en células tumorales de un sujeto diagnosticado con adenocarcinoma, antes y después del tratamiento con CPT-11, con respecto a las células normales correspondientes; e (b) identificar dicho paciente como susceptible de responder convenientemente a un tratamiento
25 de combinación con CPT-11 y un antagonista de un gen, cuya expresión se ha inducido selectivamente por tratamiento con CPT-11.

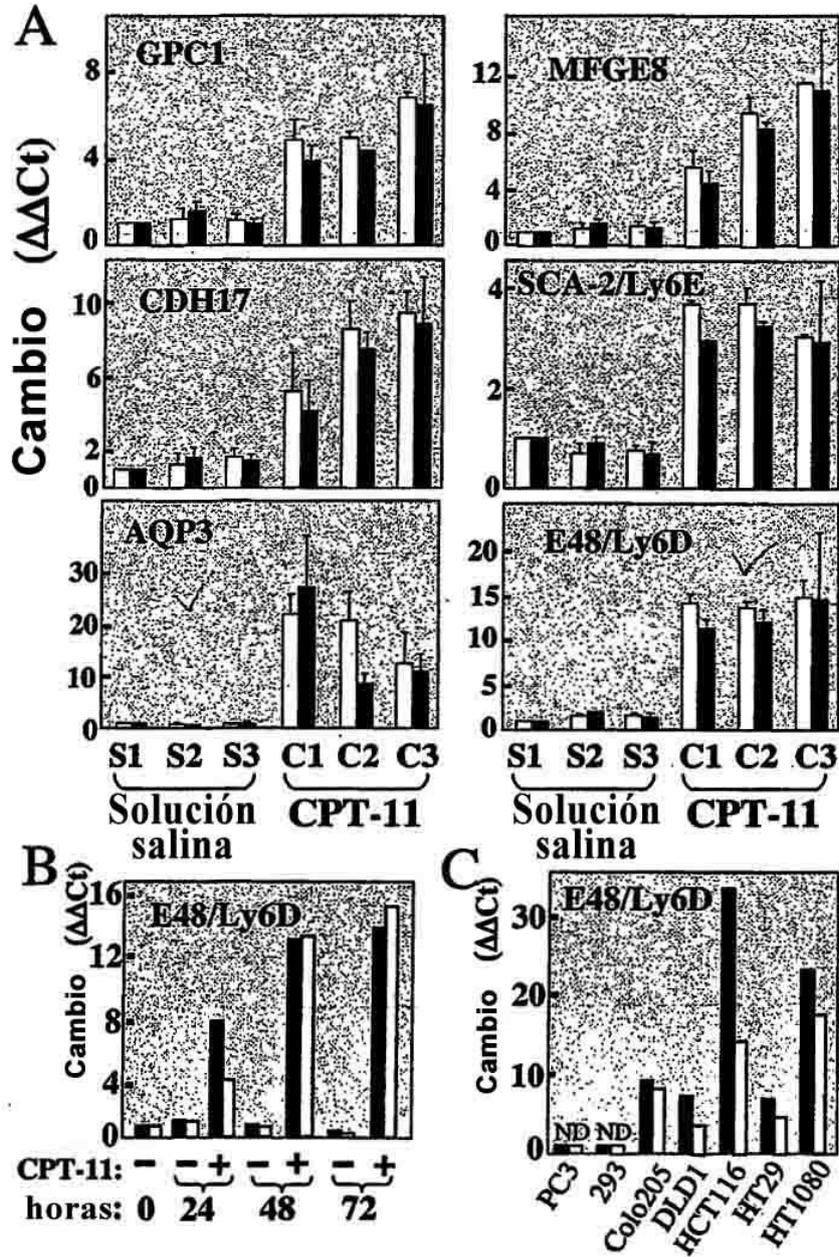


Figura 1

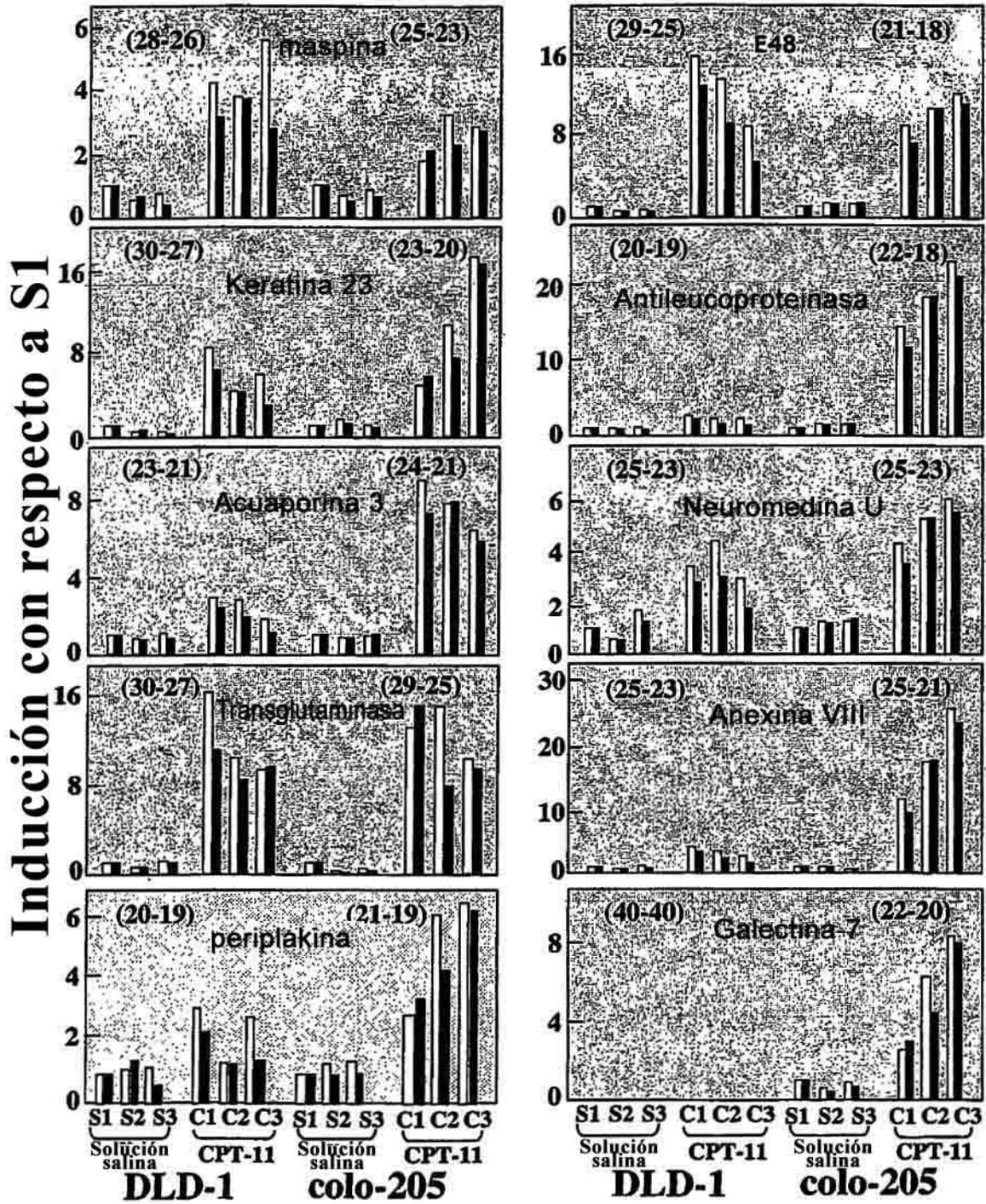


Figura 2

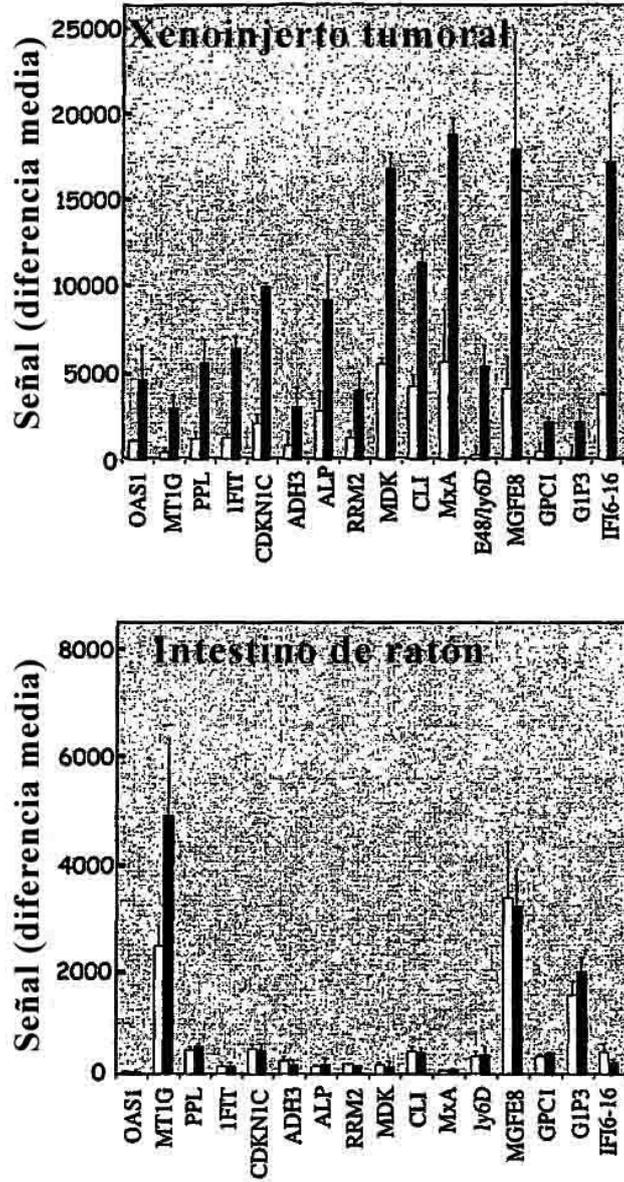


Figura 3

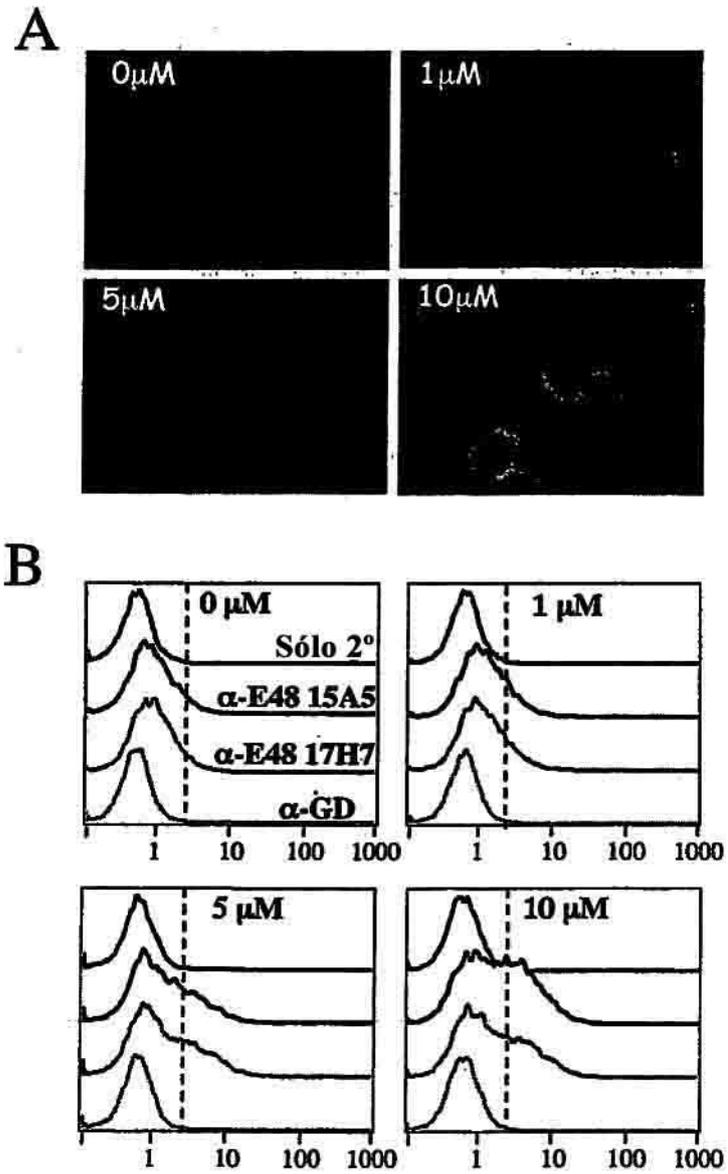


Figura 4

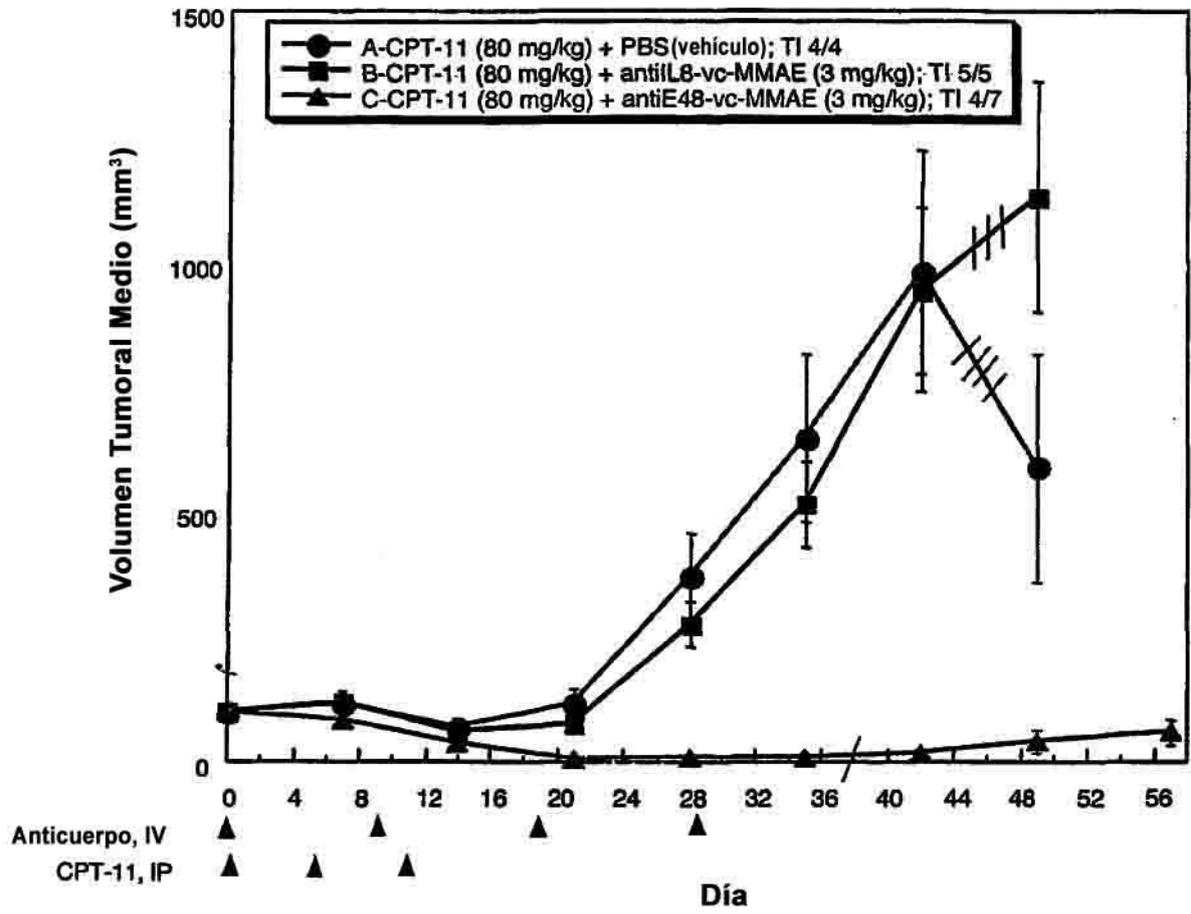


Figura 5

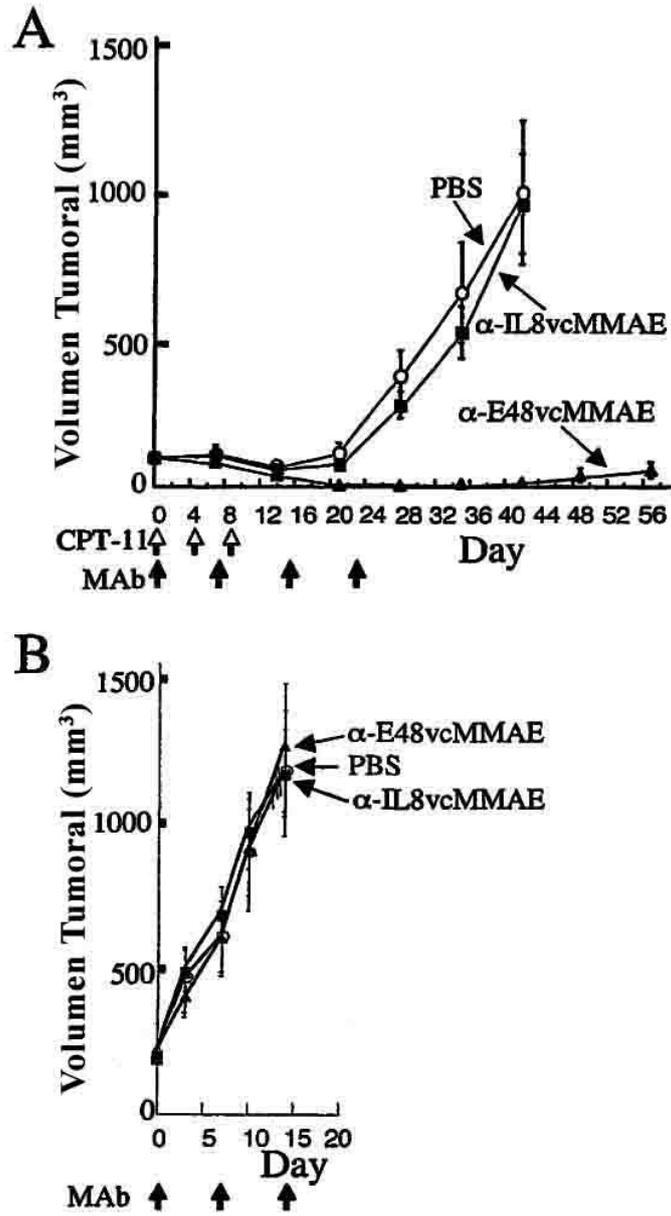
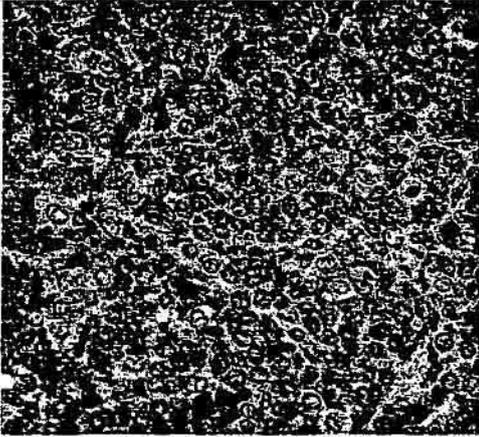


Figura 6

Solución salina



CPT-11

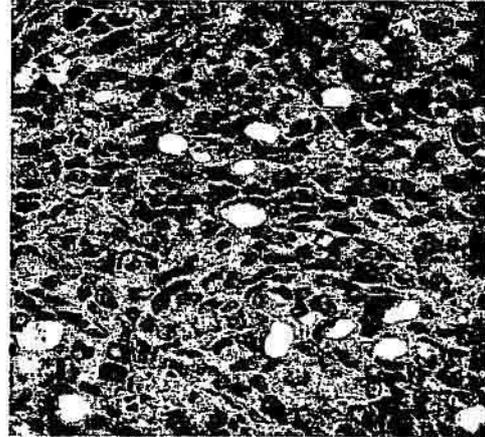


Figura 7

